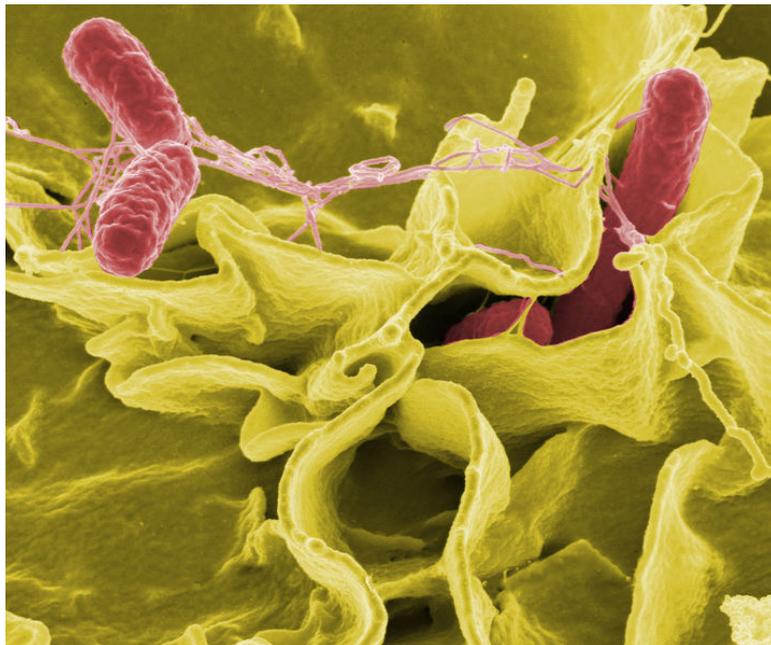




Departamento de Genética
Universidad de Sevilla

Análisis de la función de SlrP, un efector de los sistemas de secreción de tipo III de *Salmonella enterica*, en la interacción con la célula hospedadora



Joaquín Bernal Bayard

Tesis Doctoral

2010

Departamento de Genética
Universidad de Sevilla



Análisis de la función de SlrP, un efector de los sistemas de secreción de tipo III de *Salmonella enterica*, en la interacción con la célula hospedadora

Trabajo presentado para optar al
Grado de Doctor en Biología por el Licenciado

Joaquín Bernal Bayard

Sevilla, Octubre de 2010

Director:

Dr. Francisco Ramos Morales
Profesor Titular de Genética

He aprendido que todo el mundo quiere vivir en la cima de la montaña, sin saber que la verdadera felicidad está en la forma de subir la escarpada

Gabriel García Márquez

Afronta tu camino con coraje, no tengas miedo de las críticas de los demás. Y, sobre todo, no te dejes paralizar por tus propias críticas.

Paulo Coelho

AGRADECIMIENTOS

Sin duda esta es la parte de la Tesis que más me ha costado escribir. No sé por qué, pero me resulta difícil encontrar las palabras para expresar los sentimientos. De todas formas, no quiero dejar pasar esta oportunidad de mostrar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que, en mayor o menor medida, han colaborado en este trabajo.

Gracias a Charo Espuny, que me aceptó como alumno interno en el departamento de Microbiología, a pesar de no haber sitio para nadie más. Allí, junto a mi amiga María (gracias Mery) aprendí a trabajar en un laboratorio. Charo me contagió su entusiasmo por la ciencia y me enseñó a hacer ensayos de nodulación en soja con *Rhizobium* (anda que no he contao nodulitos ni na. Ahora confieso que, a veces, no sabía si algunos eran verdaderos nódulos o granos de vermiculita). Allí aprendí también a hacer medios de cultivo y mis primeros geles de agarosa para ¡¡ver el ADN!! Luego, durante la Tesis haría decenas de ellos en los que no se vería nada. Tengo que agradecer también a otros miembros del departamento de Micro que se encargaron de enseñarme a moverme por un laboratorio de investigación: Ramón Bellogín, Javier Ollero, Javi, Corín, Nuria, Rocío, Ángeles, José Mari, Ana, Edu y Cris. Gracias también a Paco Romero y Rosa Ríos por los plásmidos, estirpes de bacterias y líneas celulares con los que han contribuido a la realización de este trabajo.

En octubre del 2004 empecé como doctorando del departamento de Genética, donde he pasado 6 años. Durante este tiempo he conocido a un montón de personas maravillosas que han hecho que se me pase el tiempo volando:

Por supuesto, quiero agradecer a Paco Ramos, mi director de Tesis, el haber confiado en mí para desarrollar su primer proyecto. Nunca he conocido a nadie tan constante y ordenado en el trabajo, y con las ideas tan claras. Espero que se me haya pegado algo de tu manera cartesiana de trabajar. Nunca se me olvidará cuando se me resistía algún experimento esa frase tuya de “eso tiene que salir”, y al final salía...casi siempre. Gracias por ponerte la bata siempre que ha sido necesario. Estoy seguro que sin tu ayuda esto no hubiera salido adelante.

Como no agradecer también a Pepe Casadesús, que me haya tratado como a uno más de sus doctorandos. Gracias por tus ideas durante las reuniones de grupo (que ahora son lab meetings, gracias a Marcello), revisiones de artículos, consejos sobre el post-doc, etc.

Ahora le toca el turno al biofilm bacteriano que, aunque es criticado por los demás grupos, somos la envidia del departamento. Tengo que agradecer a mis compañeros de grupo, a los que siguen aquí y a los que se fueron, el que me hayan hecho todo esto mucho más fácil. A Eva, que ya era doctora cuando yo llegué y a mi me parecía algo tan lejano. Gracias por enseñarme a cortar

bloques de ADN de los geles de agarosa con infinita paciencia. Recuerdo tu cara cuando viste la carnicería que hice con mi primer gel. A Anabel, alias “Teniente O’Neil”, que mandaba más que el jefe, pero con la que el laboratorio funcionaba mucho mejor. Anda que se iba a ir uno un viernes sin rellenar las cajas de puntas o limpiar la zona de bromuro. Yo intenté suplirte, pero no tengo tus dotes de mando y estos pasan de mí tres kilos. Gracias por estar dispuesta a ayudarme cada vez que te he necesitado. A Ana, con la que me he reído hasta no poder más. Gracias Ana por tu alegría y por tu capacidad de contagiarla a los que te rodean. Recuerdo que los primeros días después de irte, esto parecía un velatorio. A Clarita, la persona más servicial que conozco. Gracias Clarita por tu ayuda en todos estos años, nunca me dijiste un “ahora no puedo”, “luego lo vemos” cada vez que te he necesitado. También se te echa mucho de menos. A Meritxell, que no puede ser más buena. Gracias por enseñarme a hacer conjugaciones y espero que te vaya muy bien en el mundo de las vacunas (siempre pensando en ayudar a los demás). A Robe, el crack, llegamos al mismo tiempo y nos vamos casi a la vez. Gracias por mostrarme cómo se defiende una Tesis. Has puesto el listón muy alto. A Marcello, “il capo” de la Mafia. A Javi, sin duda la persona más inteligente que conozco. Cuando seas jefe lo mismo tengo que pedirte trabajo. A Nacho, que puede ser una de las personas más diferentes a mí y con la que mejor me llevo. Te echaré de menos cuando me vaya. En el fondo creo que no somos tan distintos. A Sarita, que también vino desde Micro. Siempre con una sonrisa en la boca para alegrarnos a los demás. A Elenita, gracias por gastarme el nombre con el “oye Juakiiii” diario. Bromas aparte, Gracias Elenita por hacernos reír a diario, en cierto modo creo que has ocupado el hueco que dejó Ana. Creo que acertaste al quedarte con Paco, estoy seguro de que te irá muy bien. Gracias también por tus aportaciones a este trabajo. A Elenaza, por aguantar estoicamente mis bromas pesadas sin enfadarse. A Mar, la última incorporación al grupo de Paco. Apenas hemos coincidido, pero espero que te vaya bien en esta etapa que acabas de comenzar.

Fuera del biofilm, también hay gente con las que he compartido grandes momentos y a las que me gustaría dar las gracias por hacer más amenos los larguísimos días de la vida del doctorando. Como sois muchos y yo tengo la cabeza a las 3 de la tarde voy a hacer un tour por el departamento, a ver si no se me olvida nadie. Si es así, pido perdón. Al entrar en el departamento a la izquierda están las Anas, las secretarías. Muchas gracias por encargarnos tan eficientemente de todo el papeleo que supone una tesis y que para mí sería una locura.

Si seguimos de frente, llegamos al 103a, que ahora se llama L1, en fin, el laboratorio de Sebastián Chávez. Gracias a Alfonsito, siempre dispuesto a resolver los problemas informáticos de todo el mundo. A Fernandito, por servicial y por tus chistes malos (estoy seguro que te irá muy bien en Inglaterra), Gonzalo, que va para crack, a Douglas, que ya lo es, A Lola, que es más nerviosa que el rabo de un chivo, a Iñaki, que nos dio la solución para la última peli de navidad. Gracias a Mari Cruz, por dejarme dormir en sus clases. Más adelante está el laboratorio de Jesús de la Cruz (Jesús, otro año igual).

Gracias a Iván, “el kinki”, a Reyes, “the chunguiest”, que a mí no me lo parecían tanto, a Juanjo, que poco a poco se va quitando la careta, a Patricio y a Olga.

Un poco más adelante, nos adentramos en “territorio comanche”: la cocina. Gracias a Pepe y a Luis, que con su trabajo facilitan el de los demás. Gracias también por hacerme reír con vuestras bromas. Gracias a Isabel la limpiadora, la insustituible y no lo digo sólo por su eficiencia en el trabajo.

El siguiente laboratorio es el de Luis Corrochano. Gracias a Julio, que me enseñó mucho sobre proteínas, a María y a Laura, que me costó 4 años saber quién era cada una, a Víctor, el del potorro, a la peque, por despeinarme cada día, aunque tuviera que estirarse y a Ale.

Pasando de largo el laboratorio del biofilm, llegamos al del Cánovas. Gracias David por ser un doctorando más. Gracias a Ana y a María, a Raulito, por incombustible en la banda. Y más adelante el laboratorio de Veit (lo siento Veit, pero tuvisteis la mala suerte de cruzaros con la roja). Gracias a él y a Ale. Gracias a Machupi, por imprimir en nuestra impresora porque le da la gana.

Haciendo esquina está el laboratorio de Tahía. Gracias a Ana Rincón, por sus mallas y por el encanto que le caracteriza, a Rafa, el tanque, a Fierrito, el fiestero y pulmón del equipo, a Felipe, “el fuc...” y a Leandro, por mandar en el centro del campo y por artista (¿al final mató al oso?).

En el laboratorio de Javier Ávalos, gracias a Ale y Alfonsito, a Robe Mex, porque ser naco es chido, a Violeta, universitaria del año, a Marta y a Jorge (vaya par de dos) y a Miyuki, por exótica. ¡Ah! y a Carmen Limón, que se me olvidaba.

El último es el laboratorio de Enrique Cerdá, que una vez me llamó “gilipollas” ¡¡por entregar un documento oficial sin firmar en la universidad!! Gracias a las rubias, a Silvia por encantadora y a Lola por auténtica, al Güelfo, por golfo, a Eugenio por castizo, a Humberto y a Alejandra.

Gracias a los que emigraron en busca de laboratorios más modernos, con comedores dignos y neveras con fruta fresca.

Gracias a las viejas glorias del departamento: Felipe, grande entre los grandes, More y su don de palabra, Eduardinho y cómo conducir una bicicleta con una tasa de alcohol de 4 g/l.

Gracias a María Molina y Víctor Jiménez, en cuyo laboratorio del departamento de Microbiología de la Universidad Complutense de Madrid, realicé una estancia. Aunque los experimentos que se llevaron a cabo allí no están descritos en esta Tesis, me sirvieron para ampliar mis conocimientos en el manejo de las levaduras. Gracias a Isa, a Tere y a Almu, que me ayudaron con estos experimentos y me llevaron de cañas.

Tuve la oportunidad durante la realización de esta Tesis de realizar otra estancia, en el LEBS, en Gif sur Yvette (Francia). Gracias a Sylvie Nessler por

darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y enseñarme parte del complicado mundo de la cristalografía. Muchas gracias también por tus correcciones de esta Tesis. Agradezco a todos los miembros del grupo que me hicieran sentir como en casa, especialmente a Samira, que, pacientemente, me enseñó a purificar y cristalizar proteínas.

A mis amigos, que me apoyaron en los momentos duros y que también me acompañaron cuando hubo algo que celebrar. A mi hermano Marquiño, además de gran amigo, gran científico. Gracias por estar ahí siempre y por enseñarme cómo se hace una buena pared. A los componentes del “Clan de la República Independiente de Triana”: Pipa, Carol, Nacho, Andrea, Yeyo, Ale, Juan, Fernan y todos los demás. Gracias a los amigos del pueblo, que no saben a lo que me dedico o si realmente me dedico a algo. A los compañeros de la carrera, felicidades a los que ya son doctores y ánimo a los que les queda poco.

No quiero dejar pasar esta oportunidad sin dar las gracias a las personas más importantes en mi vida y las que más me han apoyado no sólo durante estos años, sino durante toda la vida. Quiero dar las gracias a mi familia. A mis padres, trabajadores incansables y a quienes debo todo lo que soy. De mi padre he aprendido que las claves de todo éxito son el trabajo, el trabajo y, finalmente, el trabajo. Siempre digo que mi madre ha estudiado cuatro carreras, una por cada hijo. Cada vez que me tenía que pasar la noche estudiando, ella se levantaba una y otra vez para ver si me quedaba dormido y me decía: “anda hijo, otro palito a la burra”. A mis hermanas Rosario y Pilar, con las que he convivido todos estos años y me han tratado como a un rey. Las echaré de menos cuando nos separemos. A mi hermana M^a José, por ser como es, por querer tanto a sus hermanos. A Migue. A mis dos enanos, Miguel Ángel y Simón. Mención especial merece mi tía Claudia, mi segunda madre, que a pesar de los reveses de la vida, sigue luchando para sacar a su familia adelante y que me ha tratado como a uno más de sus hijos. Muchas gracias tita. A mi tío Juan y al resto de la familia. A Puri y a Álvaro.

Por último quiero dar las gracias a la persona más importante en mi vida: Rocío. Sin tu apoyo incondicional esta Tesis nunca hubiera llegado a buen puerto. A pesar de todos los obstáculos que te has encontrado en el camino, nunca me has fallado. Gracias por ser como eres, por quien soy cuando estoy contigo, por estar ahí siempre que te he necesitado, a las duras y a las maduras, porque espero que pasemos juntos el resto de nuestras vidas. Porque la mía sin ti no tendría ningún sentido.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a las ayudas a la investigación recibidas del Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2004-00227 y SAF 2007-60738) y de la Consejería de Innovación Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (P08-CVI-03487).

No puedo responder otra cosa que gracias y gracias

Shakespeare

ÍNDICE

RESUMEN	25
SUMMARY	27
INTRODUCCIÓN	29
1. EL GÉNERO <i>Salmonella</i>	31
2. VIRULENCIA DE <i>Salmonella</i>	32
2.1. Proceso de infección y modelos de estudio	32
2.2. Factores de virulencia e islas de patogenicidad	37
3. INTERACCIÓN <i>Salmonella</i> -CÉLULA HOSPEDADORA: SISTEMAS DE SECRECIÓN DE TIPO III.....	38
3.1 Sistemas de secreción bacterianos.....	39
3.1.1 Ruta general secretora (GSP)	41
3.1.2 La ruta Tat (<i>twin-arginine translocation</i>)	43
3.1.3 Sistemas de secreción de tipo I (SST1).....	43
3.1.4 Sistemas de secreción de tipo II (SST2).....	44
3.1.5 Sistemas de secreción de tipo III (SST3).....	45
3.1.6 Sistemas de secreción de tipo IV (SST4)	48
3.1.7 Sistemas de secreción de tipo V (SST5)	49
3.1.8 Sistemas de secreción de tipo VI (SST6)	50
3.1.9 Sistemas de secreción chaperona-acomodador (CU).....	51
4. EFECTORES DE LOS SISTEMAS DE SECRECIÓN DE TIPO III DE <i>S. enterica</i> ..	52
5. EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LOS EFECTORES DE LOS SST3 DE <i>S. enterica</i> .	56
5.1 Endocitosis inducida por <i>Salmonella</i>	56
5.2 Restauración del citoesqueleto de actina	58
5.3 Biogénesis de la SCV y proliferación intracelular de <i>Salmonella</i>	59
5.4 Respuesta inflamatoria intestinal	65
5.5 Muerte celular inducida por <i>Salmonella</i>	67
6. COMPARTIMENTALIZACIÓN DE FUNCIONES DE LOS SST3-1 Y -2	69
6.1 Cooperación entre efectores	69
6.2 Solapamientos entre sistemas	70
7. BIOLOGÍA ESTRUCTURAL DE LOS SST3	71
8. SLRP.....	73

OBJETIVOS	75
MATERIAL Y MÉTODOS	79
1. MATERIAL BIOLÓGICO	81
1.1 Estirpes bacterianas	81
1.2 Estirpes de levadura	81
1.3 Líneas de células de mamífero	82
1.3.1 Congelación y descongelación de células de mamífero.....	82
2. MEDIOS, SOLUCIONES Y CONDICIONES DE CULTIVO	82
2.1 Bacterias	82
2.1.1 Condiciones de cultivo	82
2.1.2 Medios y soluciones.....	82
2.2 Levaduras.....	83
2.2.1 Condiciones de cultivo	83
2.2.2 Medios y soluciones.....	83
2.3 Células de mamífero	84
2.3.1 Condiciones de cultivo	84
2.3.2 Medios y soluciones.....	84
3. MANIPULACIÓN Y TRANSFERENCIA DEL ADN	85
3.1 Plásmidos	85
3.2 Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	86
3.3 Extracción de ADN plasmídico para secuenciación	86
3.4 Extracción de ADN plasmídico de <i>S. cerevisiae</i>	87
3.5 Digestión, modificación y ligación de fragmentos de ADN.....	87
3.6 Electroforesis de ADN en gel de agarosa	87
3.7 Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	88
3.8. Cebadores.....	88
3.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	90
3.10 Mutagénesis dirigida.....	91
3.10.1 Mutagénesis de <i>trx</i>	91
3.10.2 Mutagénesis de <i>slrP</i>	91
3.11 Secuenciación.....	92
3.12 Análisis y comparación de secuencias	92
3.13 Transformación	92
3.13.1 Transformación de <i>E. coli</i> con alta eficiencia.....	92
3.13.2 Electroporación en <i>E. coli</i> y <i>S. enterica</i>	93

3.13.3 Transformación de levaduras	94
3.14 Transfección de células HeLa.....	94
3.14.1 Transfección transitoria.....	95
3.14.2 Transfección estable.....	95
4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	96
4.1 Preparación de lisados celulares	96
4.2 Obtención de proteínas de fusión con el epítipo 3xFlag en bacterias	96
4.3. Purificación de proteínas de fusión por cromatografía de afinidad	98
4.3.1 Sistema GST	99
4.3.2 Sistema de las 6 histidinas.....	100
4.4 Cuantificación de proteínas	101
4.5 Electroforesis de proteínas.....	102
4.6 Tinción de geles con azul de Coomassie	102
4.7 Inmunodetección de proteínas mediante western.....	103
4.8 Anticuerpos empleados.....	104
5. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA	105
5.1 Sistema del doble híbrido	105
5.1.1 Aislamiento de plásmidos derivados de pGADT7 a partir de los transconjugantes positivos	106
5.2 Cromatografía de afinidad.....	106
5.2.1 Oxidación de GST-Trx con H ₂ O ₂	107
5.2.2 Ensayos de interacción entre ERdj3 y BiP.....	107
5.3. Coinmunoprecipitación.....	108
5.3.1 Coinmunoprecipitación de SlrP y Trx.....	108
5.3.2 Coinmunoprecipitación de SlrP y ERdj3.....	108
5.4 Ensayos de unión a tiroglobulina.....	109
5.5 Ensayos de ITC (<i>isothermal titration calorimetry</i>)	109
6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA	111
6.1 Ensayos de ubiquitinación <i>in vitro</i>	111
6.2 Medida de la actividad reductora de la Trx.....	112
6.3 Ensayos de actividad ATPasa.....	112
7. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR.....	113
7.1 Inmunofluorescencia y microscopía confocal	113
7.2 Medida de la muerte celular	113
7.3 Infecciones de células HeLa con <i>Salmonella</i>	114

7.4 Preparación de microsomas	114
8. TÉCNICAS DE ANÁLISIS ESTRUCTURAL	115
8.1 Cristalización de proteínas.....	115
8.2 Difracción de rayos X.....	119
RESULTADOS.....	121
Capítulo 1. Escrutinio genético para la identificación de proteínas humanas dianas del efector SlrP de <i>Salmonella</i>	123
1.1 El sistema del doble híbrido.....	125
1.2 Descripción de la genoteca, las estirpes y los plásmidos	127
1.2.1 Descripción de la genoteca y los plásmidos.....	127
1.2.2 Descripción de las estirpes	127
1.2.3 Controles previos.....	128
1.3 Escrutinio.....	129
1.3.1 Cálculo del título de la genoteca.....	129
1.3.2 Conjugación	129
1.3.3 Cálculo de la eficiencia de conjugación.....	130
1.3.4 Cálculo del número de clones escrutados	131
1.4 Resultados del escrutinio.....	131
1.5 Análisis de los candidatos positivos	133
1.6 Secuenciación de los candidatos positivos	135
Capítulo 2. Análisis funcional de la interacción SlrP-Trx.....	139
2.1 Confirmación de la interacción SlrP-Trx mediante experimentos de copurificación <i>in vitro</i>	141
2.2 Confirmación de la interacción SlrP-Trx mediante coimmunoprecipitación .	142
2.3 Colocalización de Trx y SlrP en la célula hospedadora	143
2.4 El sitio activo de Trx no es necesario para la interacción con SlrP	143
2.5 El peróxido de hidrógeno inhibe la unión de SlrP a Trx <i>in vitro</i>	144
2.6 SlrP es una ligasa de ubiquitina E3 que usa Trx como sustrato.....	145
2.7 La cisteína 546 es esencial para la actividad catalítica de SlrP.....	147
2.8 La expresión de SlrP en células HeLa disminuye la actividad reductora de Trx	147
2.9 La expresión de SlrP aumenta la tasa de muerte en células HeLa.....	149
2.10 La infección de cultivos celulares por <i>Salmonella</i> disminuye la actividad de Trx y aumenta la citotoxicidad.....	150
Capítulo 3. Análisis funcional de la interacción SlrP-ERdj3	151
3.1 Confirmación de la interacción SlrP-ERdj3 mediante experimentos <i>in vitro</i>	153

3.2 SlrP y ERdj3 interaccionan en células HeLa.....	153
3.3 El dominio II de ERdj3 es esencial para la asociación con SlrP	154
3.3.1 Doble híbrido.....	156
3.3.2 Fusiones GST.....	157
3.4 SlrP se localiza parcialmente en el retículo endoplásmico	157
3.4.1 Experimentos de inmunofluorescencia y microscopía confocal.....	158
3.4.2 Fraccionamiento celular.....	158
3.5 SlrP interfiere con la función de ERdj3 por una vía independiente de la ubiquitinación	160
3.5.1 Efecto de SlrP en la interacción entre ERdj3 y BiP	160
3.5.2 Efecto de SlrP sobre la capacidad de ERdj3 de inducir la actividad ATPasa de BiP.....	161
3.5.3 Efecto de SlrP sobre la capacidad de ERdj3 de unirse a sustratos desnaturalizados	162
Capítulo 4. Análisis estructural de SlrP y del complejo SlrP-Trx.....	165
4.1 Clonaciones en pQE30.....	167
4.2 Purificaciones de 6His-Trx, 6His-N-SlrP y 6His-SlrP-C.....	169
4.2.1 Purificaciones a pequeña escala	170
4.2.2 Purificaciones a gran escala	171
4.3 Ensayos de interacción mediante la técnica ITC	179
4.4 Ensayos de cristalización.....	181
4.5 Ensayos de cristalización en gota suspendida.....	183
4.6 Difracción de rayos X.....	184
DISCUSIÓN	187
CONCLUSIONES.....	209
CONCLUSIONS.....	213
BIBLIOGRAFÍA	217

LISTADO DE FIGURAS

I.1. Biología de la infección de <i>Salmonella</i>	32
I.2. Modelo animal para el estudio de la patogénesis de <i>Salmonella</i>	36
I.3. Esquema de la estructura de los sistemas de secreción bacterianos .	41
I.4. Esquema de las translocasas Sec y Tat	42
I.5. Esquema del SST3-1 de <i>Salmonella</i>	46
I.6. Modelo de la estructura del SST3-2 de <i>Salmonella</i>	47
I.7. El SST3-1 induce cambios en la célula hospedadora	58
I.8. Formación de la SCV e inducción del SST3-2	65
I.9. Vías de muerte celular inducida por <i>Salmonella</i> en macrófagos	69
I.10. Modelo topográfico del complejo aguja del SST3-1	72
I.11. Esquema de los dominios de SlrP y efectores relacionados.....	74
M.1. Construcción de proteínas de fusión con el epítopo 3xFlag	97
M.2. Calorímetro isotérmico ITC200 (Microcal)	111
M.3. Esquema general del proceso de cristalización de una proteína para la obtención de su estructura tridimensional	116
M.4. Robot cartesiano nanogota	117
M.5. Placa de 96 pocillos para escrutinios de cristalización	117
M.6. Esquema representativo de un ensayo manual de cristalización mediante la técnica de la gota colgante.....	118
R.1.1. Esquema del principio básico del sistema del doble híbrido	126
R.1.2. Controles previos del ensayo del doble híbrido	129
R.1.3. Esquema de la selección de clones positivos.....	131
R.1.4. Análisis de los clones positivos mediante PCR y restricción	134
R.1.5. Candidatos positivos del escrutinio del doble híbrido en levaduras	135
R.1.6. SlrP interacciona con las proteínas humanas Trx y ERdj3	137

R.1.7. Interacción de SlrP con Trx y ERdj3 intercambiando los vectores del sistema de doble híbrido	137
R.1.8. Especificidad de la interacción SlrP con Trx1	138
R.2.1. SlrP interacciona con Trx en bacterias	141
R.2.2. Trx interacciona con SlrP en la célula hospedadora.....	142
R.2.3. Colocalización de SlrP y Trx en células HeLa	143
R.2.4. SlrP se une a la versión mutante de Trx (C32S/C35S).....	144
R.2.5. La oxidación inhibe la interacción entre SlrP y Trx	145
R.2.6. SlrP es una ligasa de ubiquitina E3 para SlrP. a, SlrP cataliza reacciones de ubiquitinación	146
R.2.7. La forma de SlrP mutada en la cisteína 546 no posee actividad ligasa de ubiquitina E3	147
R.2.8. La expresión de SlrP en células HeLa disminuye la actividad de Trx	148
R.2.9. Efecto de SlrP sobre la muerte celular	149
R.2.10. La infección por <i>Salmonella</i> disminuye la actividad de Trx y provoca muerte celular tardía en las células epiteliales humanas HeLa	150
R.3.1. Interacción de ERdj3 y SlrP <i>in vitro</i>	153
R.3.2. Coinmunoprecipitación de SlrP y ERd3	154
R.3.3. Diagrama de los distintos dominios de la chaperona ERdj3, tanto de la versión completa, como de las distintas versiones truncadas (1-6)	155
R.3.4. Interacción del efector de <i>Salmonella</i> SlrP con la proteína humana ERdj3 puesta de manifiesto mediante el sistema del doble híbrido.....	156
R.3.5. El dominio II de ERdj3 es esencial para la interacción con SlrP	157
R.3.6. Colocalización de SlrP y ERdj3 en células HeLa.....	158
R.3.7. Detección de SlrP en el retículo endoplásmico de células HeLa transfectadas	159
R.3.8. Comparación de la migración de SlrP presente en las fracciones citosólica y microsómica en células HeLa transfectadas.....	160
R.3.9. Interacción entre ERdj3 y BiP	161
R.3.10. Estimulación de la actividad ATPasa de BiP por ERdj3	162

R.3.11. SlrP influye en la capacidad de ERdj3 de unirse a sustratos desnaturalizados.....	163
R.4.1. Expresión de las fusiones 6His-Trx y 6His-SlrP	168
R.4.2. Expresión de las fusiones 6His-N-SlrP y 6His-SlrP-C.....	169
R.4.3. Purificación a pequeña escala de Trx.....	170
R.4.4. Purificaciones de las fusiones 6His-N-SlrP y 6His-SlrP-C a pequeña escala	171
R.4.5. Purificación de 6His-Trx mediante <i>IMAC</i>	173
R.4.6. Elución de Trx de la columna de exclusión molecular.....	174
R.4.7. Purificación a gran escala de 6His-Trx	174
R.4.8. Purificación de 6His-N-SlrP mediante <i>IMAC</i>	175
R.4.9. Elución de N-SlrP de la columna de exclusión molecular.....	176
R.4.10. Purificación a gran escala de 6His-N-SlrP.....	176
R.4.11 Purificación de 6His- SlrP-C mediante <i>IMAC</i>	177
R.4.12. Elución de SlrP-C de la columna de exclusión molecular	178
R.4.13. Purificación a gran escala de 6His-SlrP-C.....	178
R.4.14. ITC de SlrP-C/Trx.....	180
R.4.15. ITC de N-SlrP/Trx.....	181
R.4.16. ITC de N-SlrP/SlrP-C/Trx	182
R.4.17. Curva de solubilidad de una proteína.....	183
R.4.18. Diseño de un escrutinio de cristalización.....	183
R.4.19. Cristales de SlrP-C y del complejo SlrP-C/Trx	184
D.1. Esquema de la secuencia proteica de Trx en el que se destacan sus residuos de cisteína	192
D.2. Estados de oxidorreducción de Trx	192
D.3. Esquema del sistema Trx.....	193
D.4. Papel del sistema Trx y moléculas relacionadas en la regulación de la apoptosis	196
D.5. Reacción de ubiquitinación.....	198

D.6. Hsp40 estimula la actividad ATPasa de BiP.....	202
D.7. Modelo del mecanismo de acción de SlrP	206
D.8. Estructura del efector de <i>Shigella</i> IpaH	208
D.9. Estructura del efector de <i>S. enterica</i> SspH2.....	209
D.10. Superposición de las estructuras de los efectores IpaH de <i>Shigella</i> y SspH2 de <i>Salmonella</i>	210

LISTADO DE TABLAS

I.1. Efectores del SST3-1	54
I.2. Efectores del SST3-2	55
M.1. Estirpes bacterianas.....	81
M.2. Estirpes de levadura.....	81
M.3. Plásmidos	85
M.4. Oligonucleótidos.....	89
M.5. Anticuerpos.....	104
R.1.1. Eficiencia de conjugación	131
R.1.2. Candidatos obtenidos en el escrutinio	132
R.4. Tabla de datos de difracción.....	186

LISTADO DE ABREVIATURAS

ABC	cassette de unión a ATP (<i>ATP binding cassette</i>)
AD	dominio de activación del factor de transcripción Gal4
Amp	ampicilina; Amp ^r : resistente a ampicilina
AP-1	proteína activadora 1 (<i>activator protein 1</i>)
BD	dominio de unión al ADN del factor de transcripción Gal4
BSA	seroalbúmina bovina (<i>bovine serum albumin</i>)
CIP	fosfatasa de intestino de cordero (<i>calf intestine phosphatase</i>)
DL50	dosis letal media
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	dimetil sulfóxido
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitól
EBI	<i>European Bioinformatics Institute</i>
EEA1	antígeno endosómico 1 (<i>early endosomal antigen 1</i>)
EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico (<i>epidermal growth factor receptor</i>)
GAP	proteína activadora de GTPasa (<i>GTPase-activating protein</i>)
GEF	factores de recambio de nucleótidos de guanina (<i>guanine nucleotide exchange factor</i>)
GSP	ruta general secretora (<i>general secretory pathway</i>)
GST	glutación S transferasa
IL	interleuquina
IPTG	isopropil- β -D-tiogalactósido
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i>
Kan	kanamicina; Kan ^r resistente a kanamicina
LEBS	<i>Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales</i>
LDH	lactato deshidrogenasa
LRR	repeticiones de un motivo rico en leucina (<i>leucine rich repeat</i>)
MAD	<i>multi-wavelength anomalous diffraction</i>
MAPK	kinasa activada por mitógenos (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)

MOTC	centro organizador de microtúbulos (<i>microtubule organizing center</i>)
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NEL	<i>Novel E3 ligase</i>
NF-κB	factor nuclear κB
Ni-NTA	ácido nitrilotriacético con níquel
NP40	Nonidet P-40
PBS	tampón fosfato salino (<i>phosphate buffer saline</i>)
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (<i>polymerase chain reaction</i>)
PCV	volumen del sedimento (<i>packed cell volume</i>)
PMN	neutrófilos polimorfonucleares
ROS	especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
SB	tampón de la muestra de Laemmli
SCV	vacuola que contiene a <i>Salmonella</i> (<i>Salmonella containing vacuole</i>)
SDS	dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS (<i>SDS-polyacrylamide gel electrophoresis</i>)
Sif	filamentos inducidos por <i>Salmonella</i> (<i>Salmonella-induced filament</i>)
SPI-1	isla de patogenicidad 1
SPI-2	isla de patogenicidad 2
SST1	sistema de secreción de tipo I
SST2	sistema de secreción de tipo II
SST3	sistema de secreción de tipo III
SST3-1	sistema de secreción de tipo III de la SPI-1
SST3-2	sistema de secreción de tipo III de la SPI-2
SST4	sistema de secreción de tipo IV
SST5	sistema de secreción de tipo V
SST6	sistema de secreción de tipo VI
ufc	unidad formadora de colonia
X-α-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-α-D-galactopiranosido

RESUMEN

Salmonella enterica es una especie de bacterias patógenas que pueden producir gastroenteritis o enfermedades sistémicas. *Salmonella* posee dos sistemas de secreción de tipo III (SST3) relacionados con la virulencia, que son elementos claves en la interacción con la célula hospedadora. Estos sistemas median la translocación de proteínas efectoras al citosol de la célula hospedadora donde pueden alterar las rutas de señalización y manipular las funciones celulares. Sin embargo, se desconoce el papel específico de muchos de estos efectores. SlrP es un efector de *S. enterica* que puede ser translocado por los dos SST3 de esta bacteria y del que no se conocía su función en el momento de iniciar este estudio. Por tanto, nos planteamos como objetivo realizar un análisis funcional de SlrP en la interacción con la célula hospedadora.

A través de un escrutinio genético se identificaron dos proteínas humanas que interactuaban con SlrP: la tiorredoxina citosólica (Trx) y ERdj3. La primera es una proteína que protege a la célula del daño oxidativo, mientras que la segunda es una chaperona localizada en el retículo endoplásmico. Ambas interacciones se confirmaron por diversos métodos independientes.

Experimentos *in vitro*, demostraron que SlrP tenía actividad ligasa de ubiquitina y era capaz de usar Trx como sustrato. En cultivos celulares que expresaban SlrP de forma constitutiva se observó un descenso en la actividad reductora de Trx y un aumento en la muerte celular. Ambos efectos se observaron también en cultivos de células epiteliales humanas infectadas con *Salmonella*.

Por otro lado, se demostró que el dominio II de ERdj3 era imprescindible para la interacción con SlrP y que la presencia de SlrP impedía la unión de la chaperona a un sustrato desnaturalizado. Además, mediante microscopía confocal y fraccionamiento celular, se demostró que SlrP se localiza parcialmente en el retículo endoplásmico de células HeLa transfectadas.

Todos estos datos sugieren que SlrP podría favorecer la muerte de la célula hospedadora a través de la modulación de la función de dos proteínas dianas, de forma independiente: Trx en el citosol y ERdj3 en el retículo endoplásmico.

La última parte de la Tesis consistió en un análisis estructural, mediante cristalografía de rayos X de SlrP en complejo con Trx. Se obtuvieron cristales del complejo que difractaron a 3,5 Å de resolución con objeto de resolver la estructura del complejo. El análisis se basó, parcialmente, en las estructuras conocidas de efectores de la misma familia de SlrP y de la Trx humana.

SUMMARY

Salmonella enterica is a species of bacterial pathogens that can produce different diseases from gastroenteritis to typhoid fever. *Salmonella* possesses two virulence-related type III secretion systems (T3SS) that are key elements in the interaction with the host cell. These systems mediate the translocation of effector proteins into the cytosol of the host cell where they can alter signal transduction pathways and manipulate cell functions. However, the specific function of many of these effectors is unknown. SlrP is a *S. enterica* effector that can be translocated through the two T3SS present in these bacteria. The function of this effector was unknown at the beginning of this study. Therefore, our objective was to carry out a functional analysis of SlrP in the interaction with the host cell.

A genetic screen identified two human proteins that were able to interact with SlrP: cytosolic thioredoxin (Trx) and ERdj3. The first one is a protein that protects the cell from oxidative damage, the second one is a chaperone located in the endoplasmic reticulum. Both interactions were confirmed by several independent methodologies.

In vitro experiments showed that SlrP possesses E3 ubiquitin ligase activity and that it can use Trx as a substrate for this activity. Stable expression of SlrP in a human cell line resulted in a significant decrease of thioredoxin activity and in an increase of cell death. Both effects were also observed in human cells infected with *Salmonella*.

Additional experiments showed that domain II of ERdj3 was essential for the interaction with SlrP and that the presence of SlrP interfered with the binding of ERdj3 to a denatured substrate. Confocal microscopy and subcellular fractionation demonstrated that SlrP was partially located in the endoplasmic reticulum of transfected HeLa cells.

Taken together, these data suggest that SlrP can promote death of the host cell through the modulation of the function of two independent targets: thioredoxin in the cytosol, and ERdj3 in the endoplasmic reticulum.

In the last part of this Thesis, we carried out a structural analysis of the SlrP-Trx complex using X-ray crystallography. Crystals that diffracted to 3.5 Å resolution were obtained in order to solve the structure of the complex. This analysis was partially based on structures that are already known for effectors of the same family and for human Trx.

INTRODUCCIÓN

1. EL GÉNERO *Salmonella*

Las bacterias del género *Salmonella* son bacilos móviles Gram negativos, pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. El género *Salmonella* se encuentra filogenéticamente próximo a los géneros *Escherichia*, *Shigella* y *Citrobacter*. A gran escala, la organización del genoma de *Salmonella* es similar a la de *Escherichia coli* (Groisman y Ochman, 1994; Sanderson et al., 1995). La secuenciación ha demostrado que la similitud media entre los genomas de *E. coli* no patogénica y *S. enterica* serovar Typhimurium alcanza el 80 % (Blattner et al., 1997; McClelland et al., 2001). Sin embargo, *Salmonella* contiene regiones específicas que no se encuentran en otros géneros cercanos. Algunas de estas regiones están relacionadas con la patogenicidad y reciben el nombre de “islas de patogenicidad”.

El género *Salmonella* se divide en dos especies: *S. enterica* y *S. bongori* (Tindall et al., 2005). Ambas especies son capaces de invadir células epiteliales debido a la presencia de la isla de patogenicidad 1 (SPI-1), pero sólo *S. enterica* es capaz de diseminarse por los tejidos y producir enfermedad sistémica debido a que cuenta también con la SPI-2 (Groisman y Ochman, 1997; Hensel, 2000). *S. enterica* se divide en seis grupos filogenéticos, (Tindall et al., 2005) las subespecies: *enterica* (I), *salamae* (II), *arizonae* (IIIa), *diarizonae* (IIIb), *houtenae* (IV) e *indica* (VI). Los miembros de cada subespecie se clasifican en serovares. Los serovares de *Salmonella* se diferencian mediante pruebas inmunológicas con antisueros generados contra los antígenos O y H, que reflejan la variabilidad de la parte expuesta del lipopolisacárido y de la flagelina, respectivamente (Grimont et al., 2007; McQuiston et al., 2004).

Mientras que *S. bongori* y las subespecies de *S. enterica* II, IIIa, IIIb, IV y VI se encuentran asociadas principalmente con vertebrados de sangre fría, los miembros de la subespecie I, que incluye más de 1300 serotipos (o serovares), se aíslan más frecuentemente de aves y mamíferos (Baumler et al., 1998; Boyd et al., 1996).

2. VIRULENCIA DE *Salmonella*

2.1. Proceso de infección y modelos de estudio

En humanos y animales domésticos y de granja, la infección de *Salmonella* se inicia con la ingestión de agua o alimentos contaminados, habitualmente crudos o poco cocinados. Dependiendo del hospedador y del serovar, la infección puede causar una enfermedad sistémica, una gastroenteritis o un aborto. Ocasionalmente, las infecciones agudas pueden convertirse en persistentes, con carácter temporal o indefinido (“infecciones crónicas”). En la **Figura I.1** se muestra un esquema que representa la biología de la infección con *Salmonella*.

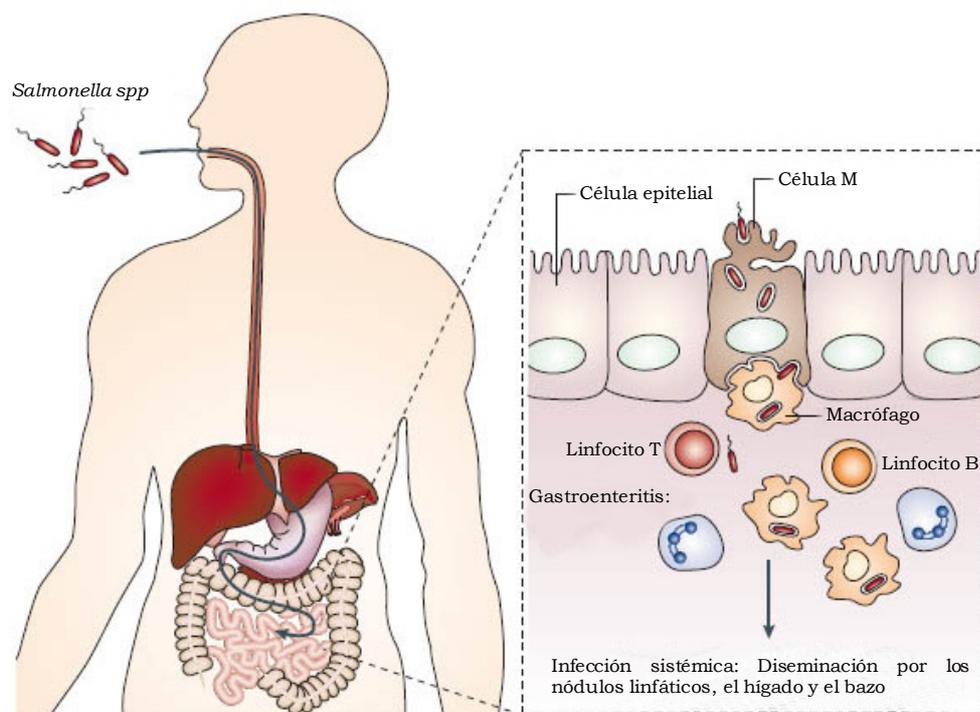


Figura I.1. Biología de la infección de *Salmonella*. *Salmonella* es ingerida por vía oral y es capaz de sobrevivir al pH ácido del estómago y de evadir los sistemas de defensa que encuentra en el intestino delgado hasta llegar al epitelio. Entonces se produce la invasión del epitelio, preferentemente a través de células M, las cuales hacen llegar a las bacterias hasta las células linfoides B y T, que se encuentran debajo de las placas de Peyer. Una vez que atraviesan el epitelio, los serotipos que producen enfermedad sistémica entran en macrófagos intestinales y se diseminan por el organismo. Las estirpes no tifoideas, sin embargo, producen una respuesta inflamatoria temprana y localizada, que induce la infiltración al lumen del intestino de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y que provoca diarrea. Esquema adaptado de Haraga y colaboradores (Haraga et al., 2008)

La fiebre tifoidea es una infección sistémica producida en humanos por los serovares Typhi y Paratyphi de *S. enterica*. Las manifestaciones clínicas de la infección incluyen fiebre, dolor abdominal, diarrea transitoria o estreñimiento y, ocasionalmente, erupción maculopapular. Se calcula que estas infecciones afectan a unos 22 millones de personas en todo el mundo, y llegan a causar alrededor de 200000 muertes cada año (Crump et al., 2004). Se produce principalmente en países subdesarrollados o en vías de desarrollo, y se debe a deficiencias sanitarias (ej: en la potabilización del agua) y a la manipulación y conservación de alimentos en condiciones antihigiénicas.

Aproximadamente, un 3-5% de los individuos infectados con *S. enterica* serovar Typhi se convierten en portadores crónicos asintomáticos, y la vesícula biliar suele ser el órgano habitual donde persiste la infección. En el estado portador, que puede durar muchos años, el organismo excreta continuamente bacterias desde la vesícula biliar al intestino, y desde ahí a las heces, con el consiguiente riesgo de dispersión y contagio. Las anomalías en el conducto biliar o en la vesícula biliar (ej: cálculos biliares) tienen un papel importante en el desarrollo de la infección crónica. Hay datos que indican que la formación de biofilms de *Salmonella* sobre cálculos presentes en la vesícula es un mecanismo que contribuye al establecimiento de este tipo de infecciones crónicas (Crawford et al., 2010). En la mayoría de los casos, los antibióticos no son efectivos (Dutta et al., 2000; Lai et al., 1992), y para eliminar la infección crónica suele ser necesario extirpar la vesícula biliar. Otros datos sugieren la existencia de reservorios intracelulares de *Salmonella*, cuyo papel en las infecciones persistentes aún no ha sido estudiado (Tierrez y Garcia-del Portillo, 2005).

Otros serovares, como Enteritidis y Typhimurium, son responsables de los millones de casos de salmonelosis no tifoidea que se producen anualmente en todo el mundo. Estos serovares, que en humanos causan una gastroenteritis transitoria de gravedad muy variable (pero que, generalmente, no requiere tratamiento para la remisión), también infectan una amplia gama de animales domésticos (ej: aves, ganado vacuno y cerdos) en los que pueden producir diversos tipos de infecciones (desde sistémica a

asintomática). En el África subsahariana son frecuentes las salmonelosis no tifoideas complicadas con bacteriemia (De Wit et al., 1988; Morpeth et al., 2009). Su incidencia ha aumentado en asociación con las infecciones por VIH y por *Plasmodium falciparum* (Bronzan et al., 2007). Ciertos serovares no tifoideos de *Salmonella* pueden causar colecistitis persistente o crónica (Lalitha y John, 1994). Estas infecciones persistentes sintomáticas también son difíciles de erradicar y suele ser necesaria la extirpación de la vesícula.

S. enterica serovar Typhimurium es el organismo modelo más utilizado en el estudio de las infecciones de *Salmonella*. Este serovar infecta una gran variedad de hospedadores. En ciertas razas de ratón doméstico, *Mus musculus*, produce una enfermedad similar a la fiebre tifoidea, que sirve como modelo de estudio para las infecciones sistémicas causadas por el serovar Typhi en humanos (**Figura I.2**).

Los ratones BALB/c son particularmente susceptibles a la infección por *Salmonella* porque llevan una mutación en el locus que codifica la proteína Nramp-1, un componente de la resistencia o susceptibilidad innata a infecciones causadas por patógenos intracelulares. La expresión de este locus está restringida a monocitos y es necesaria para controlar la replicación intracelular de microorganismos como *Salmonella*, *Mycobacterium* y *Leishmania* (Bellamy, 1999; Govoni y Gros, 1998; Gruenheid et al., 1997).

El método clásico para identificar un mutante atenuado en el modelo de ratón es la determinación de su dosis letal media (DL50) comparada con la DL50 de la estirpe silvestre (Reed y Muench, 1938). Un procedimiento más sensible y que requiere un menor número de ratones consiste en infectar el mismo ratón con una mezcla de dos estirpes (generalmente una mutante y una silvestre) para obtener un índice de competitividad. Éste se define como la razón entre el número de unidades formadoras de colonia de la estirpe mutante y la silvestre en la salida (órgano diana) dividido por la razón entre ambas estirpes en la entrada (inóculo inicial) (Freter et al., 1981; Taylor et al., 1987). Este método permite además el estudio de interacciones

génicas *in vivo* mediante el uso de infecciones mixtas con mutantes dobles y simples (Beuzon y Holden, 2001).

Una limitación del modelo de ratón es que el serovar Typhimurium no produce colitis en este organismo. Por ese motivo, se han desarrollado modelos animales alternativos para el estudio de la gastroenteritis causada por *Salmonella* (Wallis y Galyov, 2000). En terneros, la infección oral con los serovares Typhimurium o Dublin desencadena una respuesta similar a la gastroenteritis causada por *Salmonella* en humanos.

Recientemente se ha demostrado que los ratones tratados previamente con antibióticos desarrollan inflamación intestinal aguda en respuesta a la infección oral con *S. enterica* serovar Typhimurium (Barthel et al., 2003; Coburn et al., 2005). Estos estudios han abierto la posibilidad de utilizar el ratón como modelo para el estudio de la gastroenteritis [revisado en (Hapfelmeier y Hardt, 2005)].

En el modelo clásico de ratón, *Salmonella* se multiplica en el tubo digestivo y llega al extremo distal del intestino delgado, el íleon, donde se adhiere preferentemente a las células M del epitelio intestinal (Jones et al., 1994). La invasión se produce generalmente en las células M, aunque también se puede producir en enterocitos. Las células M son células epiteliales especializadas, que transportan antígenos intestinales por pinocitosis a las células linfoides situadas bajo el epitelio intestinal, en las placas de Peyer (Brandtzaeg, 1989). La invasión de *Salmonella* se ajusta a lo que técnicamente se denomina “endocitosis mediada por la bacteria”, caracterizada por una profunda reorganización del citoesqueleto de la célula hospedadora hasta formar una estructura membranosa característica, llamada *ruffle*, que engloba a la bacteria en una gran vesícula. Este proceso recuerda a la macropinocitosis inducida por factores de crecimiento, y es morfológica y funcionalmente distinto de la endocitosis mediada por el receptor, que es el mecanismo por el que otros patógenos entran en células no fagocíticas. Recientemente, sin embargo, se ha sugerido la posibilidad de que *S. enterica* utilice también este último mecanismo de entrada. Esto se

ha visto para el serovar Typhimurium en la invasión de fibroblastos (Aiastui et al., 2010) y para el serovar Enteritidis en diferentes tipos celulares de manera dependiente de la proteína de membrana externa Rck (Rosselin et al., 2010). Una vez dentro de la célula hospedadora, *Salmonella* sobrevive y se replica en el interior de una vacuola (Bakowski et al., 2008).

En los serovares que producen gastroenteritis, tras la invasión se produce una inducción de la respuesta secretora en el epitelio intestinal y se inicia la migración de neutrófilos hacia el lumen del intestino (Galyov et al., 1997). Esta reacción inflamatoria localizada en el sitio de la infección es la principal causa fisiológica de la sintomatología de la gastroenteritis.

Una vez atravesado el epitelio intestinal, los serotipos de *Salmonella* que causan infección sistémica son fagocitados por los macrófagos y activan los mecanismos de virulencia que les permiten evadir las funciones microbicidas del macrófago. Ello les permite sobrevivir e incluso replicarse dentro de las células fagocíticas. Posteriormente los macrófagos infectados emigran hacia otros órganos del sistema retículo-endotelial, facilitando la diseminación de la bacteria por todo el hospedador (Ohl y Miller, 2001).

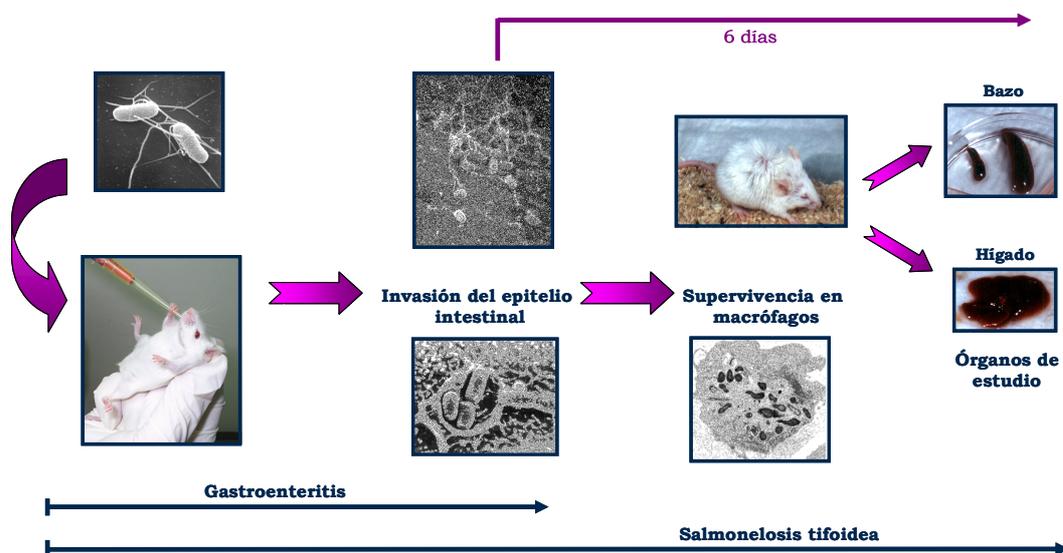


Figura I.2. Modelo animal para el estudio de la patogénesis de *Salmonella*.

Junto a los modelos *in vivo*, se ha utilizado una gran variedad de líneas celulares eucarióticas como modelos *in vitro* para el estudio de la

invasión (líneas epiteliales) o de la supervivencia y proliferación intracelulares (líneas fagocíticas, líneas epiteliales y de fibroblastos). El método más usado para estos estudios *in vitro* es el de la protección frente a gentamicina. Este método se basa en la dificultad de la gentamicina para atravesar la membrana celular eucariótica (Elsinghorst, 1994). Después de una infección *in vitro*, las bacterias extracelulares se eliminan mediante un tratamiento con gentamicina y las bacterias intracelulares se siembran con las diluciones apropiadas para llevar a cabo recuentos que permitan calcular el porcentaje de invasión con respecto al inóculo inicial. Por otro lado, la tasa de proliferación intracelular se calcula como la razón entre el número de bacterias intracelulares viables presentes tras 24 h de infección y el número de bacterias intracelulares que había justo después del tratamiento con gentamicina (Cano et al., 2001). Dada la variabilidad que presentan los resultados de estos experimentos *in vitro*, se ha propuesto una modificación del método de protección frente a gentamicina que incorpora las ventajas de las infecciones mixtas y permite el cálculo de un índice de competitividad para invasión y para proliferación (Segura et al., 2004).

2.2. Factores de virulencia e islas de patogenicidad

En muchos patógenos, los genes de virulencia se encuentran agrupados formando “islas de patogenicidad” (Groisman y Ochman, 1996; Hacker y Kaper, 2000; Lavigne y Blanc-Potard, 2008). Varios indicios sugieren que estas regiones han sido adquiridas por procesos de transferencia horizontal: (a) a menudo tienen un G+C distinto del resto del genoma; (b) se encuentran flanqueadas por genes que están contiguos en especies cercanas evolutivamente pero no patógenas; (c) en algunos casos tienen secuencias en los extremos que presentan homología con elementos de inserción, transposones y profagos, lo que sugiere un posible mecanismo de adquisición (Groisman y Ochman, 1996; Hacker y Kaper, 2000). Se han identificado al menos 12 de estas regiones (denominadas SPI-1 a SPI-10, SGI-1 y HPI) en diversos serovares de *S. enterica* (Hensel, 2004).

A menudo las islas de patogenicidad contienen genes funcionalmente relacionados. Por ejemplo, la SPI-1 y la SPI-2, que son las islas más grandes y mejor estudiadas, contienen los genes necesarios para la síntesis de sendos sistemas de secreción de tipo III (SST3). Estos sistemas están presentes en muchos patógenos Gram negativos de animales y plantas (Hueck, 1998) y, como se explicará más adelante, son claves para la patogénesis de *Salmonella*.

Además de las islas de patogenicidad, se pueden encontrar otras regiones más pequeñas, a veces denominadas islotes de patogenicidad, relacionadas con la virulencia y específicas de *Salmonella* (Groisman y Ochman, 1997). También hay genes de patogenicidad asociados a profagos (Figueroa-Bossi et al., 2001). Además, algunos miembros del género *Salmonella* portan un plásmido requerido para la infección sistémica, conocido habitualmente como “plásmido de virulencia”. El tamaño de este plásmido varía entre 50 y 90 kb, pero sólo una región de 7,8 kb, llamada *spv* (*Salmonella plasmid virulence*), es necesaria para conferir el fenotipo de virulencia en ratones BALB/c (Gulig et al., 1993; Rotger y Casadesus, 1999).

3. INTERACCIÓN *Salmonella*-CÉLULA HOSPEDADORA: SISTEMAS DE SECRECIÓN DE TIPO III

Un elemento esencial en la patogénesis de *Salmonella* es su capacidad para entrar y sobrevivir en células tanto fagocíticas como no fagocíticas. En el caso de *Salmonella* y en el de otros muchos patógenos Gram negativos de plantas y animales (Hueck, 1998), las interacciones con el hospedador están dirigidas por proteínas bacterianas secretadas por SST3. Los aparatos de secreción de tipo III son estructuras en forma de jeringa que atraviesan las membranas interna y externa de la bacteria. Suelen funcionar cuando la bacteria entra en contacto con la célula hospedadora y secretan proteínas al ambiente extracelular o, con el concurso de proteínas que constituyen el denominado “translocón”, las translocan al interior de la célula eucariótica, donde es frecuente que interfieran con vías de transducción de señales del hospedador en beneficio del patógeno. Las proteínas secretadas por los

SST3 y translocadas a las células eucarióticas se denominan efectores de los SST3. Aunque varios de estos efectores están codificados en la SPI-1 o la SPI-2, otros están codificados fuera de estas islas, en regiones cromosómicas con características que indican que también se han adquirido por transferencia horizontal. En *S. enterica* se han identificado dos SST3, codificados en las islas de patogenicidad 1 y 2 (SST3-1 y SST3-2), respectivamente. El SST3-1 se requiere para iniciar la infección intestinal (Ehrbar et al., 2002; Galan et al., 1992; Lostroh y Lee, 2001; Mills et al., 1995) mientras que el SST3-2 parece necesario para la infección sistémica (Ochman et al., 1996; Shea et al., 1996; Waterman y Holden, 2003). Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado que el SST3-1 se requiere para la invasión de células M y de células epiteliales en cultivo (Jones et al., 1994; Penheiter et al., 1997). En la invasión y en los procesos que tienen lugar tras la invasión intervienen también sistemas de secreción de tipo I (SST1) y otros factores como fimbrias, flagelos y transportadores de iones [revisado en (Ibarra y Steele-Mortimer, 2009)]. Por su parte, el SST3-2 es un sistema de virulencia multifuncional que se activa tras la entrada de la bacteria en la célula eucariótica y permite la proliferación bacteriana en todos los tipos celulares probados [revisado en (Ibarra y Steele-Mortimer, 2009; Kuhle y Hensel, 2004)]. En realidad, la regulación de ambos SST3 es compleja y hay pruebas de que existe un considerable solapamiento temporal en la expresión de ambos (ver más abajo).

3.1 Sistemas de secreción bacterianos

En las bacterias Gram negativas han evolucionado diversas maquinarias encargadas de transportar sustratos a través de sus membranas celulares. Estas maquinarias, que se denominan sistemas de secreción, son esenciales para la virulencia y las bacterias las emplean para conseguir nutrientes, para transportar proteínas, ácidos nucleicos y toxinas, y para ensamblar orgánulos en la superficie de la bacteria del tipo de los pelos o las fimbrias. Para atravesar las dos membranas, separadas por el espacio periplásmico, las bacterias Gram negativas poseen al menos siete

sistemas de secreción diferentes clasificados como sistemas de secreción tipo I (SST1) a tipo VI (SST6) y sistema CU (de *chaperone-usher*) (Filloux et al., 2008; Gerlach y Hensel, 2007; Rego et al., 2010; Saier, 2006). Estos distintos sistemas de secreción usan dos mecanismos principales de transporte: un mecanismo de un solo paso (independiente de Sec) o un mecanismo de dos pasos (dependiente de Sec). Los sistemas SST2, SST5 y CU carecen de un transportador que pueda transferir los sustratos a través de la membrana interna. Para ese primer paso del transporte, estos sistemas utilizan la ruta general secretora, también llamada Sec, o la vía Tat para el caso de algunos sustratos de SST2. Posteriormente, utilizan un sistema de secreción específico para el transporte de sustratos del espacio periplásmico a través de la membrana externa. Por ello se dice que éstos son sistemas de secreción en dos pasos. Por otra parte, los sistemas SST1, SST3, SST4 y SST6 realizan una translocación de sus sustratos en un solo paso a través de ambas membranas. En la **Figura I.3** se muestra un esquema de la mayoría de los sistemas de secreción bacterianos.

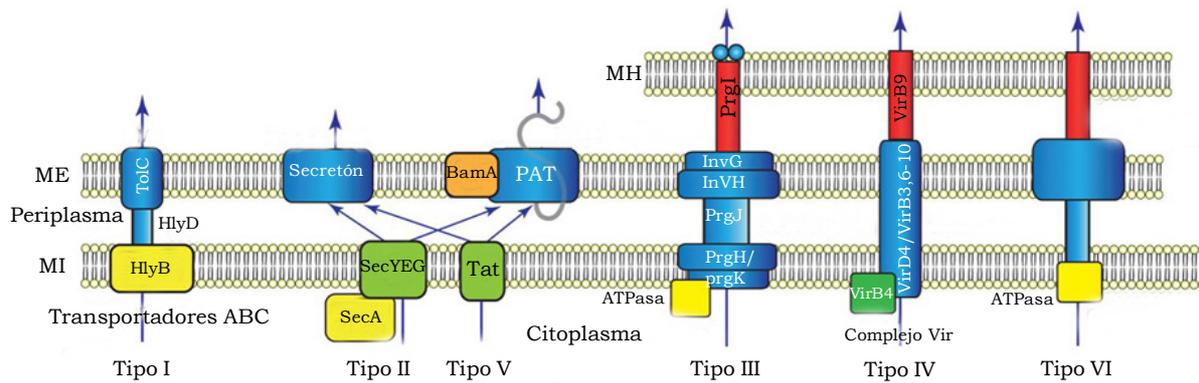


Figura I.3. Esquema de la estructura de algunos de los sistemas de secreción bacterianos. **SST1.** El de la α -hemolisina de *E. coli*, está compuesto por la proteína HlyB, que es un transportador tipo ABC (*ATP-binding cassette*), HlyD, que es una proteína adaptadora que conecta las membranas interna y externa y TolC, que forma el poro en la membrana externa. **SST2.** Es un sistema multicomponente que usa un mecanismo de translocación en dos pasos: en el primer paso el precursor proteico es translocado por la membrana interna a través del poro formado por el complejo SecYEG. Una vez en el periplasma la proteína se transloca a través de la membrana externa por el translocón, formado por 12-16 subunidades proteicas. **SST3.** También son llamados “inyectosomas” y median un mecanismo de translocación en un solo paso. Está formado por más de 20 subunidades proteicas, entre las que están proteínas de la familia Prg e Inv, que forman una estructura supramolecular que atraviesa las membranas de la bacteria y la membrana de la célula hospedadora. **SST4.** Son maquinarias de translocación complejas que, como los SST3 atraviesan las dos membranas de la bacteria y la membrana de la célula hospedadora. Se encuentran en bacterias Gram positivas y Gram negativas. El poro de la membrana interna está formado por un hexámero de la proteína VirD4, el canal periplásmico y el poro de la membrana externa está formado por varias subunidades proteicas de la familia VirB. La energía para la translocación se obtiene gracias a ATPasas como VirB4. **SST5.** En estos sistemas se incluyen autotransportadores, que son proteínas multidominio que se secretan a través de la ruta general secretora hasta el periplasma como precursores. En un segundo paso, el dominio translocador de la proteína se inserta en la membrana externa, tal vez con la ayuda de una proteína como BamA, y facilita la translocación del dominio pasajero. **SST6.** Son sistemas multicomponentes formados por entre 15 y 25 elementos, algunos de los cuales son comunes con elementos del SST4. Algunas bacterias Gram⁻ los utilizan para interactuar con la célula hospedadora aunque no se conoce mucho sobre su estructura y función. MI, membrana interna; ME, membrana externa; MH, membrana plasmática del hospedador; PAT, proteína autotransportadora. Esquema adaptado de Tseng y colaboradores (Tseng et al., 2009).

3.1.1 Ruta general secretora (GSP)

Esta ruta se encuentra en los tres grandes dominios de la vida: en bacterias, en arqueas y en orgánulos eucarióticos (en cloroplastos pero también en el retículo endoplásmico) y proporciona una vía general para el transporte de proteínas no plegadas a través de la membrana plasmática o del orgánulo implicado. Las bacterias Gram negativas usan la GSP para transportar proteínas al espacio periplásmico. En *E. coli*, la GSP está

compuesta por dos complejos heterotriméricos, SecYEG (Yahr y Wickner, 2000) y el complejo integrado por SecD, SecF y YajC, que están insertados en la membrana interna, además de un componente accesorio, SecA (Rusch y Kendall, 2007) (**Figura I.4**). Las proteínas transportadas por esta vía se traducen como pre-proteínas y tienen un péptido señal en el extremo amino terminal. La proteína SecA por sí sola, o junto con la chaperona general SecB, reconoce el péptido señal cuando todavía se está traduciendo la proteína sustrato, y la transporta al poro formado por el complejo SecYEG. La energía necesaria para el transporte se obtiene de la hidrólisis de ATP, catalizada por SecA (Hunt et al., 2002). Se cree que el complejo SecDFYajC potencia la translocación a través de SecYEG facilitando el reciclado de SecA en la membrana (Duong y Wickner, 1997). Tras la translocación, el péptido señal es eliminado por peptidasas periplásmicas específicas, de forma que la proteína madura se libera en el periplasma. Si es una proteína de la membrana externa o extracelular seguirá una de las tres vías ya mencionadas para atravesar la membrana externa: SST2, SST5 o CU.

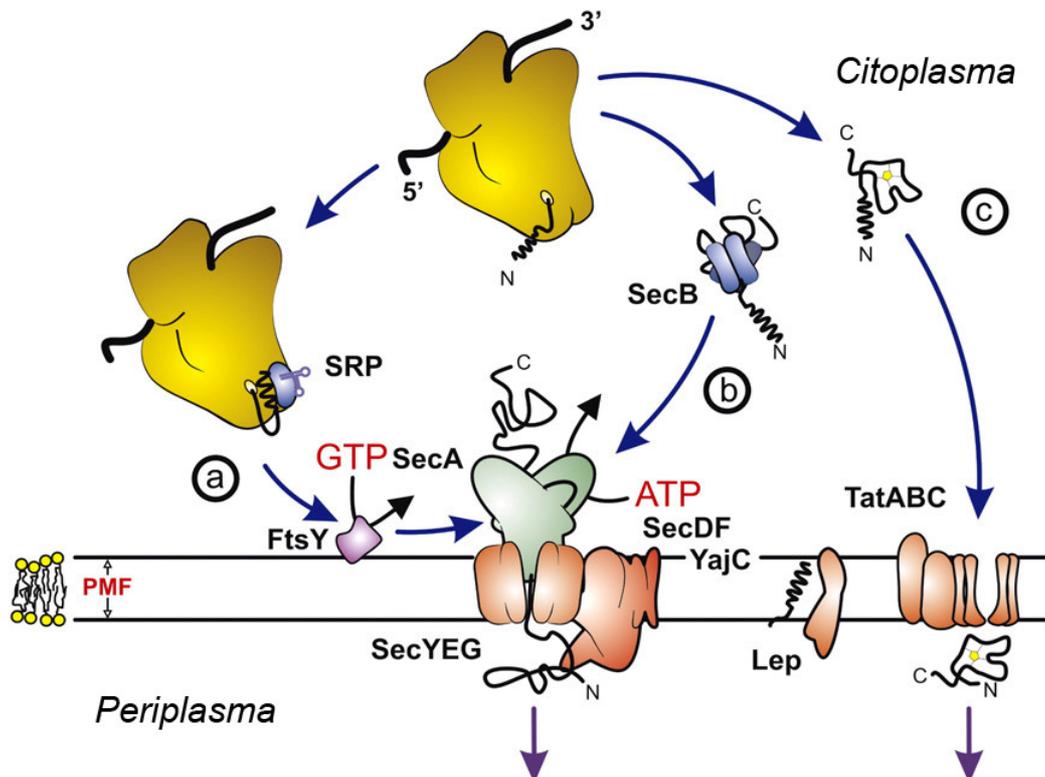


Figura I.4. Esquema de las translocasas Sec y Tat. (a) Ruta cotraduccional y (b) ruta post-traduccional de translocación de sustratos no plegados por la translocasa Sec. (c) Translocación de proteínas plegadas por la translocasa Tat (Natale et al., 2008).

3.1.2 La ruta Tat (*twin-arginine translocation*)

Se trata de una vía de transporte procariótica que funciona en paralelo con la vía Sec y se encarga del transporte de proteínas plegadas (**Figura I.4**). Las proteínas transportadas por este sistema poseen un motivo con dos argininas (*twin-arginine*) en su péptido señal dentro de la secuencia consenso [S/T]RRxFLK. La vía Tat utiliza la fuerza protón-motriz como única fuente de energía. En *E. coli* el sistema Tat está formado por complejos con múltiples copias de las proteínas TatA, TatB y TatC (Palmer et al., 2005).

En un principio se pensó que la ruta Tat se encargaba sólo del transporte de proteínas que se unen a cofactores en el citoplasma y, por tanto, se pliegan antes del transporte, tal es el caso de proteínas que intervienen en varias vías de transporte de electrones respiratorias y fotosintéticas. Luego se encontró que esta ruta transporta otros tipos de sustratos incluyendo algunos que intervienen en la adaptación de las bacterias a ambientes particulares. La función de la ruta Tat en la virulencia se ha convertido recientemente en un importante tema de investigación [revisado en (De Buck et al., 2008)]. El sistema Tat está presente en numerosas bacterias patógenas incluyendo *S. enterica*. Los mutantes *tatB* y *tatC* de *S. enterica* serovar Enteritidis tienen reducida su capacidad de invasión de células Caco-2 polarizadas. Además el mutante *tatB* tarda más que la estirpe silvestre en producir infección sistémica en pollos (Mickael et al., 2010).

3.1.3 Sistemas de secreción de tipo I (SST1)

Los SST1 son también conocidos como transportadores ABC de *ATP binding cassette*. Son complejos heterotriméricos compuestos por una proteína exportadora tipo ABC en la membrana interna, una proteína de fusión a la membrana (MFP) y una proteína en la membrana externa que forma el poro (OMP). Los SST1 permiten la secreción de una gran cantidad de sustratos (proteicos y no proteicos) desde el citoplasma al espacio extracelular en un solo paso. El mecanismo de secreción de tipo I se ha

analizado en gran detalle al estudiar la secreción de la toxina α -hemolisina, encontrada en algunas *E. coli* uropatógenicas. (Thanabalu et al., 1998). En *Salmonella*, una isla de patogenicidad, la SPI-4 codifica una proteína de 600 kDa llamada SiiE que se secreta por medio de un SST1 codificado en la misma isla por los genes *siiC*, *siiD* y *siiF*. Este sistema contribuye a la infección en terneros (Morgan et al., 2007). La proteína SiiE es una adhesina gigante (Gerlach et al., 2007) que media el contacto íntimo de *Salmonella* con las microvellosidades de la membrana apical de las células intestinales y colabora con el SST3-1 para que las bacterias sean capaces de atravesar las barreras epiteliales (Gerlach et al., 2008). BapA es otra proteína de *Salmonella* con función de adhesina que se secreta por medio de un SST1 codificado por los genes *bapBCD*. Esta proteína contribuye a la formación de biofilms y a la invasión en *S. enterica* serovar Enteritidis (Latasa et al., 2005).

3.1.4 Sistemas de secreción de tipo II (SST2)

El SST2 es un sistema de dos pasos en el que las proteínas pasan primero la membrana interna por medio de las vías Sec o Tat y luego se transportan desde el periplasma al exterior por medio de una secretina localizada en la membrana externa. A partir del análisis de los SST2 presentes en 12 géneros bacterianos diferentes se ha concluido que el sistema es muy complejo y contiene no menos de 12 componentes principales conservados y otras varias proteínas que no están presentes en todos los casos (Filloux, 2004; Peabody et al., 2003). Este sistema se encontró por primera vez en *Klebsiella oxytoca* donde se vio que era necesario para la secreción de una lipoproteína denominada pululanasa (d'Enfert et al., 1987). El análisis de los numerosos genomas secuenciados recientemente hace pensar que este sistema se encuentra presente en representantes de al menos 15 géneros de γ -proteobacterias, pero también en varios géneros de α -, β - y δ -proteobacterias [revisado en (Cianciotto, 2005)]. Hay varias pruebas de la importancia de los SST2 en virulencia: (a) el sistema se encuentra en patógenos como *Erwinia*, *Legionella*, *Vibrio* o

Yersinia (sin embargo, parece estar ausente de otros como *Salmonella* o *Shigella*); (b) la mayoría de las enzimas secretadas por estos sistemas tiene propiedades degradativas, lo que hace pensar que puedan provocar daños en las células y tejidos del hospedador; (c) en algunos casos se ha observado la contribución directa a la virulencia de algunos sustratos de estos sistemas, como en el ejemplo de la toxina del cólera; (d) mutaciones en genes de SST2 atenúan la virulencia en modelos animales y vegetales (Rossier et al., 2004; Sandkvist, 2001).

3.1.5 Sistemas de secreción de tipo III (SST3)

Muchas bacterias patógenas Gram negativas, entre las que se encuentran miembros de los géneros *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Escherichia* y *Pseudomonas*, usan SST3 para inyectar proteínas directamente en las células eucarióticas hospedadoras. Los aparatos de secreción de este tipo son estructuras supramoleculares que atraviesan la membrana interna, el espacio periplásmico, la membrana externa, el espacio extracelular y la membrana plasmática de la célula hospedadora. Debido a su forma y a su capacidad de translocar proteínas una vez que entran en contacto con la célula hospedadora, a los SST3 se les conoce también como “inyectosomas” o “agujas moleculares” (Cornelis, 2006). Este complejo montaje está estructural y evolutivamente relacionado con el sistema del flagelo (Macnab, 2003; Tampakaki et al., 2004).

La maquinaria de secreción está altamente conservada y consta de más de 20 proteínas diferentes, muchas de las cuales presentan similitud con proteínas de exportación flagelares. Oligómeros con simetría radial de tres de estas proteínas constituyen el llamado cuerpo basal, al que se ancla una estructura en forma de aguja. En el SST3-1 de *S. enterica* serovar Typhimurium las proteínas del cuerpo basal son PrgH y PrgK, que juntas forman los anillos de la membrana interna, e InvG, que es el único componente de membrana externa y es un miembro de la familia de las secretinas. Proteínas de esta familia están presentes también en el SST2 y el SST4 y ejercen una función estabilizadora y de anclaje del complejo que

forma la aguja. Por debajo del cuerpo basal, en la membrana interna, hay una serie de proteínas altamente conservadas entre las que se cuenta una ATPasa que es crítica para el funcionamiento del sistema. Dentro de la estructura del cuerpo basal, a la altura del espacio periplásmico, la proteína PrgJ forma una barra interna. A partir del cuerpo basal, hacia fuera, surge una estructura filamentosa, con forma de aguja, que está compuesta por una sola proteína, PrgI en el SST3-1 de *Salmonella*. Se trata de un cilindro hueco que presenta un diámetro de entre 20-30 Å. La aguja termina en un extremo formado por varias copias de la proteína SipD. El contacto con la membrana de la célula hospedadora provoca la exportación, a través del aparato descrito, de dos tipos de proteínas: las proteínas translocadoras (SipB y SipC en el SST3-1), que forman un poro o translocón en la membrana eucariótica, y los efectores del sistema, que entran en la célula hospedadora a través del poro, y de los que se hablará más adelante (Hueck, 1998; Kimbrough y Miller, 2000; Marlovits et al., 2004; Marlovits y Stebbins, 2010; Moraes et al., 2008; Muller et al., 2006). En la **Figura I.5** se esquematiza la estructura del SST3-1 de *Salmonella* y en la **Figura I.6**, el SST3-2.

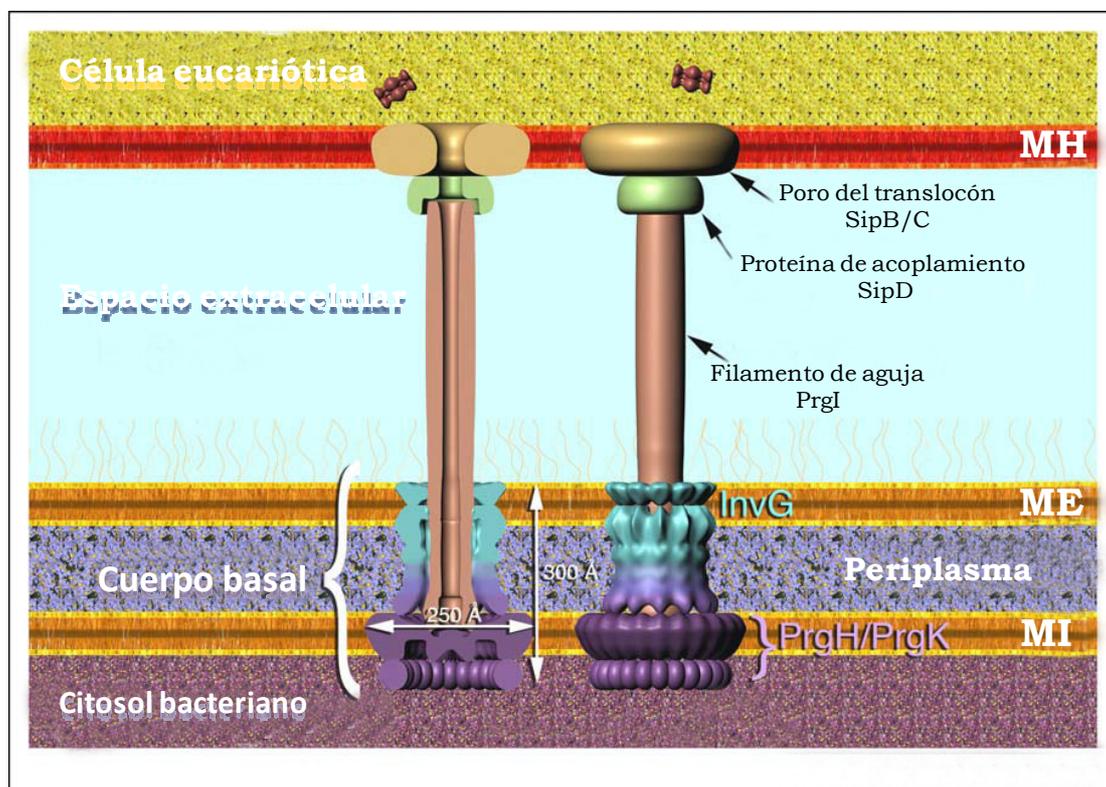


Figura I.5. Esquema del SST3-1 de *Salmonella* (Marlovits y Stebbins, 2010).

Además de los componentes del aparato de secreción y de las proteínas secretadas (efectores), los SST3 incluyen también chaperonas y reguladores citoplásmicos (Deane et al., 2010). Puesto que la síntesis de proteínas componentes del sistema y su secreción no siempre están acopladas, algunas proteínas deben almacenarse en el citoplasma bloqueadas para impedir su interacción prematura con el aparato de secreción. Esta función la cumplen ciertas chaperonas (Parsot et al., 2003; Wilharm et al., 2007).

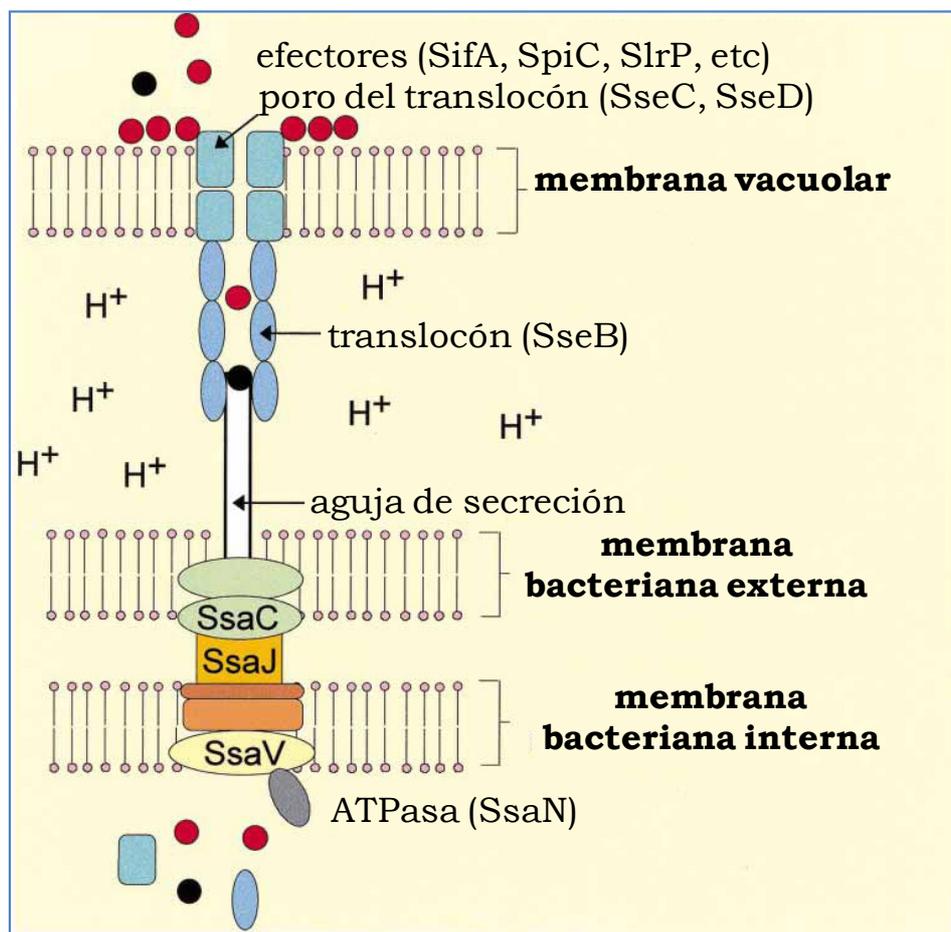


Figura I.6. Modelo de la estructura del SST3-2 de *Salmonella*. La localización de los componentes del secretón está basada en las posiciones de dichos componentes en otros sistemas de secreción (Hueck, 1998). SsaV y SsaC son supuestas proteínas integrales de las membranas bacterianas interna y externa, respectivamente. SsaN es, probablemente, una ATPasa que proporciona la energía para la secreción. SseB es una proteína localizada en la superficie, cuya secreción se induce a pH bajo (Beuzon et al., 1999) y es similar a la proteína EspA de *E. coli*, un componente de una estructura en forma de vaina que se conecta con la aguja de secreción (Knutton et al., 1998; Sekiya et al., 2001). SseC y SseD son proteínas del translocón, que se piensa que están localizadas en la membrana vacuolar y que son necesarias para la translocación de efectores (Klein y Jones, 2001; Nikolaus et al., 2001). SipA, SpiC y SlrP son proteínas efectoras, translocadas por este sistema de secreción. Esquema adaptado de Holden (Holden, 2002).

3.1.6 Sistemas de secreción de tipo IV (SST4)

Los SST4 son los sistemas de secreción bacterianos más polivalentes: a diferencia de la mayoría de los sistemas de secreción, se encuentran tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas y pueden mediar la secreción de proteínas y complejos nucleoproteicos (Alvarez-Martinez y Christie, 2009; Llosa et al., 2009). De acuerdo con su función, se pueden definir tres familias de SST4: 1) sistemas conjugativos que transfieren plásmidos y transposones desde una bacteria donadora a una receptora; 2) sistemas de entrada o salida de ADN que intercambian ADN con el medio extracelular; 3) sistemas de translocación de efectores que transportan ADN o proteínas a células eucarióticas y están implicados en la virulencia de muchos patógenos Gram negativos (Fronzes et al., 2009). A pesar de esta diversidad, todos los SST4 están evolutivamente relacionados, comparten algunos componentes y funcionan, probablemente, de manera similar. Muchos de los SST4 que se encuentran en bacterias Gram negativas son similares al sistema VirB/D de *Agrobacterium tumefaciens*. Este sistema está constituido por 12 proteínas denominadas VirB1 a VirB11 y VirD4. VirB4, VirB11 y VirD4 son ATPasas; VirB6-10 forman el canal que atraviesa el espacio periplásmico, de ellas VirB6, VirB8 y VirB10 son proteínas de membrana interna, mientras que las lipoproteínas VirB7 y VirB9 parecen formar el poro en la membrana externa; la mayoría de los SST4 forman un pelo extracelular constituido por las proteínas VirB2 y VirB5; otros componentes menos estudiados son la posible transglicosilasa lítica VirB1 y la proteína de membrana VirB3 (Rego et al., 2010). Varios patógenos humanos presentan este tipo de sistema de secreción (Backert y Meyer, 2006; Llosa et al., 2009), como por ejemplo, *Bordetella pertussis*, para secretar la toxina pertussis, *Helicobacter pylori*, para secretar la proteína efectora CagA que produce la alteración del citoesqueleto y la inducción de la respuesta inflamatoria en la célula hospedadora y *Legionella pneumophila*, (Vogel y Isberg, 1999) que secreta varios sustratos, entre ellos Ralf1, que

actúa como un factor de recambio de guanidina en la célula hospedadora (Nagai et al., 2002; Segal et al., 2005).

3.1.7 Sistemas de secreción de tipo V (SST5)

Los mecanismos de secreción de este tipo son los más simples de todos los que estamos describiendo. Esta familia incluye el sistema autotransportador, denominado tipo Va o AT-1, la vía de secreción de dos proteínas, tipo Vb, y el sistema Vc, también llamado AT-2 (Henderson et al., 2004). La primera proteína para la que se describió el sistema autotransportador fue la proteasa IgA1 producida por *Neisseria gonorrhoeae* (Pohlner et al., 1987). Las proteínas autotransportadoras en general tienen una composición modular con tres dominios funcionales: una secuencia señal en el extremo amino terminal dirige el transporte a través de la membrana interna por medio de la maquinaria Sec (de la ruta general secretora); el dominio central, llamado pasajero, alberga la función del efector propiamente dicho; y el dominio carboxilo terminal forma la unidad de translocación, la cual, una vez anclada en la membrana externa forma una estructura secundaria de barril β que permite la secreción del dominio central. El sistema Vb se considera un subgrupo dentro de la misma familia ya que el mecanismo de transporte es similar al de los autotransportadores, si bien en este caso el dominio pasajero y el dominio que forma el poro en la membrana externa se traducen como dos proteínas separadas. Por último, la adhesina YadA de *Yersinia* se considera el prototipo de una nueva clase de adhesinas pertenecientes a la familia Oca. Los miembros de esta familia son autotransportadores oligoméricos para los que se ha propuesto la denominación de sistemas de secreción tipo Vc (Desvaux et al., 2004). Entre los autotransportadores bien estudiados en *Salmonella* se encuentran las proteínas ShdA (Kingsley et al., 2000) y MisL (Blanc-Potard et al., 1999). ShdA se expresa cuando la bacteria está en el intestino del hospedador y su dominio pasajero media adhesión a fibronectina. Esta proteína es importante para la persistencia de *Salmonella* y su presencia a largo plazo en las heces en el modelo de ratón (Kingsley et al., 2002). MisL está

codificado en la SPI-3, que contiene genes necesarios para la supervivencia dentro de los macrófagos, la virulencia en ratones y el crecimiento en medios con baja concentración de Mg^{2+} (Blanc-Potard et al., 1999). Esta proteína es una adhesina de la matriz extracelular capaz de unirse a fibronectina e implicada en la colonización intestinal (Dorsey et al., 2005).

3.1.8 Sistemas de secreción de tipo VI (SST6)

Los SST6, recientemente descritos, son un tipo de maquinaria de secreción compleja. Los datos genómicos sugieren que existen SST6 en la mayoría de las bacterias que entran en contacto directo con células eucarióticas, ya sea para establecer una relación simbiótica o patogénica. Los genes que codifican el SST6 suelen estar juntos formando agrupamientos de entre 12 y más de 20 genes (Cascales, 2008). Estos agrupamientos se conocieron inicialmente como agrupamientos IAHP (por *IcmF associated homologous protein*) porque contienen un homólogo de *icmF*, que codifica una proteína asociada con un SST4 presente en *Legionella pneumophila*. La mayoría de los productos de este grupo de genes no se secretan, por lo que se cree que son componentes estructurales de la maquinaria de secreción. Así, las proteínas homólogas a DotU e IcmF son proteínas de membrana interna que parecen tener una función de estabilización del aparato de secreción. Los homólogos de ClpV, por su parte, son ATPasas que podrían proporcionar la energía al sistema. Se sabe que la proteína ClpV de *Vibrio cholerae* interacciona con una estructura tubular formada por otros dos componentes esenciales del SST6, VipA y VipB. Otros componentes se parecen a proteínas de bacteriófagos. Es el caso de Hcp (*hemolysin coregulated protein*) y de VgrG (*valine-glycine repeat protein*), que son homólogas de proteínas del bacteriófago T4. Ambas parecen ser componentes estructurales y secretados, y la detección de ambas proteínas en sobrenadantes de cultivos se considera un indicador de la función de un SST6. Algunas proteínas VgrG presentan una extensión C-terminal que incluye un dominio efector que ha sido relacionado con funciones como la unión a actina del hospedador, la degradación de la capa

de peptidoglicano y la ADP-ribosilación de proteínas del hospedador. La estructura cristalina de Hcp revela la formación de anillos hexaméricos que forman tubos con un diámetro de 4 nm y de más de 100 nm de longitud. Esto concuerda con que el tubo de Hcp forme un conducto del SST6 por el que otras proteínas puedan translocarse desde la bacteria al espacio extracelular o al interior de la célula hospedadora [revisado en (Pukatzki et al., 2009)]. En *Salmonella* el primer SST6 se descubrió con la caracterización de la SPI-6 (antes llamada SCI) (Folkesson et al., 2002). Hay resultados que indican que este sistema limita el crecimiento intracelular en macrófagos, lo que da lugar a una menor tasa de mortalidad en ratones (Parsons y Heffron, 2005). Un estudio reciente (Blondel et al., 2009), en que se han analizado con métodos bioinformáticos los genomas de 24 serovares de *S. enterica*, ha detectado otros tres SST6 que se encuentran en las islas denominadas SPI-19, SPI-20 y SPI-21. La mayoría de los serovares tienen sólo un SST6 codificado en la SPI-6 o la SPI-19, aunque algunos presentan dos.

3.1.9 Sistemas de secreción chaperona-acomodador (CU)

Se trata de sistemas muy simples de translocación en dos pasos que sólo requieren dos proteínas especializadas: una chaperona periplásmica y una proteína de membrana externa (el acomodador). Estos sistemas son responsables del ensamblaje y secreción de pelos (o fimbrias). Estas estructuras, formadas por múltiples subunidades, están presentes en la superficie de numerosas bacterias patógenas Gram negativas entre las que se cuentan *E. coli*, *S. enterica*, *Yersinia species*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se trata de factores de virulencia empleados por las bacterias para el reconocimiento, adhesión e invasión del hospedador y para la formación de biopelículas. Las fimbrias de este tipo son polímeros de subunidades proteicas que requieren para su ensamblaje las dos proteínas especializadas del sistema de secreción: una chaperona periplásmica que estabiliza las subunidades y las prepara para su polimerización y un acomodador en la membrana externa que funciona como plataforma de ensamblaje donde se reúnen los complejos entre subunidades y chaperonas,

se polimerizan las subunidades y se translocan para su presentación en la superficie celular [revisado en (Rego et al., 2010)].

4. EFECTORES DE LOS SISTEMAS DE SECRECIÓN DE TIPO III DE *S. enterica*

Las proteínas secretadas y translocadas al interior de las células eucarióticas a través de los SST3 se llaman “efectores” de los SST3. La inyección de estas proteínas al citosol de la célula hospedadora establece un “diálogo bioquímico” (expresión acuñada por J. E. Galán) entre el patógeno y el hospedador. A menudo, las proteínas efectoras se parecen a factores eucarióticos con funciones de transducción de señales y son capaces de interferir en las rutas de señalización del hospedador.

Las dianas de los efectores de patógenos de plantas son las defensas dependientes de ácido salicílico y de ácido abscísico, el tráfico vesicular o el metabolismo del ARN del hospedador. Los efectores de patógenos de animales modifican el citoesqueleto para facilitar la entrada de la bacteria, modulan la actividad de las GTPasas tipo Rho y la proteína NF- κ B, inhiben la respuesta inflamatoria del hospedador, provocan la muerte de células del sistema inmunitario y afectan a la respuesta inmunitaria innata y adaptativa [revisado en (Hueck, 1998; Stavrinides et al., 2008)].

Los efectores poseen en su extremo amino terminal una secuencia señal necesaria para su translocación por el sistema de secreción (Brumell et al., 2003; Karavolos et al., 2005; Lee y Galan, 2004; Miao y Miller, 2000). Además de esta señal de secreción, muchos efectores contienen un sitio de unión específico para una chaperona, cuya función se piensa que es estabilizar y conducir a su sustrato hasta el aparato de secreción. La mayoría de las chaperonas son específicas de un sólo efector, aunque algunas chaperonas pueden facilitar la secreción de más de una proteína. [revisado en (Haraga et al., 2008)]. La ATPasa que está localizada en la base del aparato, no sólo dirige el proceso de translocación, sino que también

facilita la liberación del efector de la chaperona antes del transporte (Akeda y Galan, 2005). Aunque la mayoría de los componentes de los SST3 son similares en las distintas especies de bacterias Gram negativas, el conjunto de proteínas efectoras es único para cada especie.

Ya se ha mencionado que *S. enterica* posee dos SST3 distintos que son esenciales para la virulencia y que están codificados por genes localizados en las SPI-1 y SPI-2, respectivamente. Entre los dos SST3 secretan más de 30 efectores distintos que manipulan funciones claves en la célula hospedadora y dirigen la infección. Sin embargo, la actividad bioquímica de muchos de ellos y su papel durante la infección está aún por descubrir. En las **Tablas I.1 e I.2** se presenta una relación de los efectores secretados por los SST3-1 y -2, respectivamente de *S. enterica* (McGhie et al., 2009).

Tabla I.1. Efectores del SST3-1 de *Salmonella*

Efactor	Localización	Ligandos en la célula hospedadora	Papel en la infección
AvrA	SPI-1	MKK4/7 IκBα β-catenina	Inhibe la inflamación, reprime la apoptosis y la respuesta inmunitaria innata epitelial
SipA (SspA)	SPI-1	Actina T-plastina	Promueve la polimeración de actina y potencia la actividad de SipC
SipB (SspB)	SPI-1	Colesterol	Translocación de otros efectores e inducción de apoptosis
SipC (SspC)	SPI-1	Actina	Translocación de otros efectores y formación de arrugas en la membrana del hospedador
SipD (SspD)	SPI-1	ND	Regulación de la secreción de efectores de la SPI-1
SlrP*	Fuera de SPI-1/ SPI-2	ND antes de esta tesis	Especificidad de hospedador
SopA	Fuera de SPI-1	HsRMA1	Afecta a la integridad de la SCV (vacuola que contiene <i>Salmonella</i>)
SopB (SigD)	SPI-5	Fosfatos de inositol	Promueve la fisión de la membrana y formación del macropinosoma, promueve la secreción de fluidos
SopE	Bacteriófago SopEΦ	Rac1 Cdc42	Induce la formación de arrugas en la membrana del hospedador y promueve respuesta proinflamatoria
SopE2	Bacteriófago SopEΦ	Cdc42	Induce la formación de arrugas en la membrana del hospedador y promueve respuesta proinflamatoria
SopD*	Fuera de SPI-1/ SPI-2	ND	Promueve la fisión de la membrana y formación de macropinosomas, promueve la secreción de fluidos
SptP	SPI-1	Cdc42 Rac1 Vimentina	Reorganización del citoesqueleto de actina. Inhibe la respuesta proinflamatoria
SspH1*	Bacteriófago Gifsy-3	PKN1	Inhibe la respuesta proinflamatoria
SteA*	Fuera de SPI-1/ SPI-2	ND	Se requiere para una eficiente colonización del bazo en ratones
SteB*	Fuera de SPI-1/ SPI-2	ND	ND

*También se transloca por el SST3-2. ND: no determinado

Tabla I.2. Efectores del SST3-2

Efactor	Localización	Ligando en la célula hospedadora	Papel en la infección
GogB	Bacteriófago Gifsy-1	ND	ND
PipB	SPI-5	ND	ND
PipB2	Fuera de la SPI-2	Kinesina-1	Promueve la extensión de filamentos inducidos por <i>Salmonella</i> (Sif), recluta kinesina-1 a SCV
SifA	Fuera de la SPI-2	SKIP Rab7/9	Se requiere para la integridad de la membrana de SCV y para la formación de Sif. Redirige vesículas exocíticas a SCV
SifB	Fuera de la SPI-2	ND	ND
SopD2	Fuera de la SPI-2	ND	Contribuye a la formación de Sif y se requiere para la replicación bacteriana en macrófagos
SpiC (SsaB)	SPI-2	Hook 3 TassC	Interfiere con el tráfico vesicular. Implicado en la polimerización de actina asociada a la SCV (VAP) y formación de Sif. Regula la secreción por el SST3-2.
SseF	SPI-2	ND	Contribuye a la formación de Sif y de haces de microtúbulos alrededor de SCV, mantiene el posicionamiento perinuclear de SCV. Redirige vesículas exocíticas a SCV
SseG	SPI-2	ND	Igual que SseF
SseI (SrfH/GtgB)	Bacteriófago Gifsy-2	Filamina TRIP6	Reorganización de F-actina alrededor de SCV. Promueve la movilidad del fagocito
SseJ	Fuera de la SPI-2	Colesterol	Regulación negativa de la formación de Sif. Antagonista a SifA
SseK1	Fuera de la SPI-2	ND	ND
SseK2	Fuera de la SPI-2	ND	ND
SseK3 (NleB)	Bacteriófago coliforme ST64B	ND	ND
SseL	Fuera de la SPI-2	I κ B α	Apoptosis de macrófagos. Reprime la respuesta inflamatoria.
SspH2		Filamina Profilina	Reorganización de F-actina alrededor de SCV
SteC	Fuera de la SPI-2	ND	Se requiere para VAP
SpvB	pSLT	Actina	Inhibición de VAP, apoptosis de células infectadas. Se requiere para la virulencia en ratón
SpvC	pSLT	ND	Se requiere para la virulencia en ratón

ND: No determinado

5. EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LOS EFECTORES DE LOS SST3 DE *S. enterica*

5.1 Endocitosis inducida por *Salmonella*

S. enterica es capaz de inducir su propia entrada en células no fagocíticas, gracias al concurso de un conjunto de 6 efectores del SST3-1 (SipA, SipC, SopB, SopD, SopE y SopE2). Mediante la deformación de la membrana de la célula hospedadora y la reorganización del citoesqueleto de actina, la bacteria provoca su internalización en lo que se conoce como “SCV” (de *Salmonella containing vacuole*) (Galan, 2001).

El efector SipC, aparte de ser un componente estructural del translocón, tiene una doble función catalítica, separada espacialmente en dos dominios definidos. El dominio carboxilo terminal es capaz de polimerizar monómeros de actina, provocando un rápido crecimiento del filamento, mientras que el dominio amino terminal une los distintos filamentos, formando haces (Hayward y Koronakis, 2002).

SipA es otro efector que no es imprescindible para la entrada de la bacteria, pero que aumenta la eficiencia de la invasión. Promueve la polimerización de actina mediante la disminución de la concentración crítica necesaria para el ensamblaje de actina y el aumento de la estabilidad de los filamentos. SipA también potencia la actividad nucleadora de actina de SipC [revisado en (Haraga y Miller, 2006)]. Además es capaz de inducir la actividad de la proteína de la célula hospedadora T-plastina (fimbrina), formadora de haces de actina, y de impedir la unión de proteínas despolimerizadoras de los filamentos de actina, como ADF/cofilina (McGhie et al., 2009).

La acción combinada de SipA y SipC permite la formación de filamentos de actina, pero la fuerza necesaria para dirigir la formación del aparato fagocítico requiere la formación de una entramada e interconectada red de filamentos de actina. La formación de tales redes está mediada en la mayoría de las células por pequeñas GTPasas de la familia de Rho, como Rac y Cdc42 (Jaffe y Hall, 2005). Al igual que otras GTPasas, estas proteínas funcionan como interruptores moleculares que ciclan entre el estado activo

unido a GTP y la forma inactiva unida a GDP. La interconversión entre los dos estados se ve facilitada por los factores de recambio de nucleótidos de guanina (GEFs), que catalizan el cambio de GDP por GTP, y las proteínas activadoras de GTPasas (GAPs), que estimulan la hidrólisis del GTP unido. Rac y Cdc42 estimulan a un conjunto de proteínas que dirigen la remodelación del citoesqueleto de actina. Aunque muchas bacterias patógenas pueden activar GTPasas de la familia de Rho manipulando los GEFs del hospedador, *Salmonella* ha evolucionado hasta una forma más directa de activación: SopE y SopE2 son dos efectores que imitan a factores de recambio de guaninas de la célula eucariótica y modulan el citoesqueleto de actina, mediante su unión y acción sobre Rac y Cdc42. SopE y SopE2 no tienen secuencias similares a los GEFs eucarióticos, pero el mecanismo de acción es muy parecido (Buchwald et al., 2002; Schlumberger et al., 2003). SopE y SopE2 tienen especificidad de sustrato diferentes; mientras SopE puede activar tanto a Rac como a Cdc42, SopE2 sólo presenta afinidad por Cdc42 (Friebel et al., 2001). La activación de Rac por SopE, parece ser suficiente para provocar la internalización de la bacteria (Patel y Galan, 2006).

Salmonella también puede provocar la reorganización del citoesqueleto de actina mediante la acción del efector SopB (también conocido como SigD). SopB es una fosfatasa de fosfatos de inositol. La observación de que la actividad catalítica de SopB es necesaria para la remodelación del citoesqueleto y su falta de actividad GEF, sugiere que este efector activa a las GTPasas Rho de una forma indirecta que incluye hidrólisis de fosfoinositoles. Patel y Galán (Patel y Galan, 2006), demostraron que SopB favorece la actividad de otra GTPasa de la familia de Rho, RhoG, a través de un mecanismo que requiere la activación de un GEF de RhoG, la proteína SGEF.

En resumen, gracias a los efectores SipC y SipA que activan la polimerización de los filamentos de actina y los efectores SopE, SopE2 y SopB, que actúan sinérgicamente para estimular varios miembros de la familia Rho de GTPasas, se produce una rápida y eficiente internalización de la bacteria (**Figura I.7**).

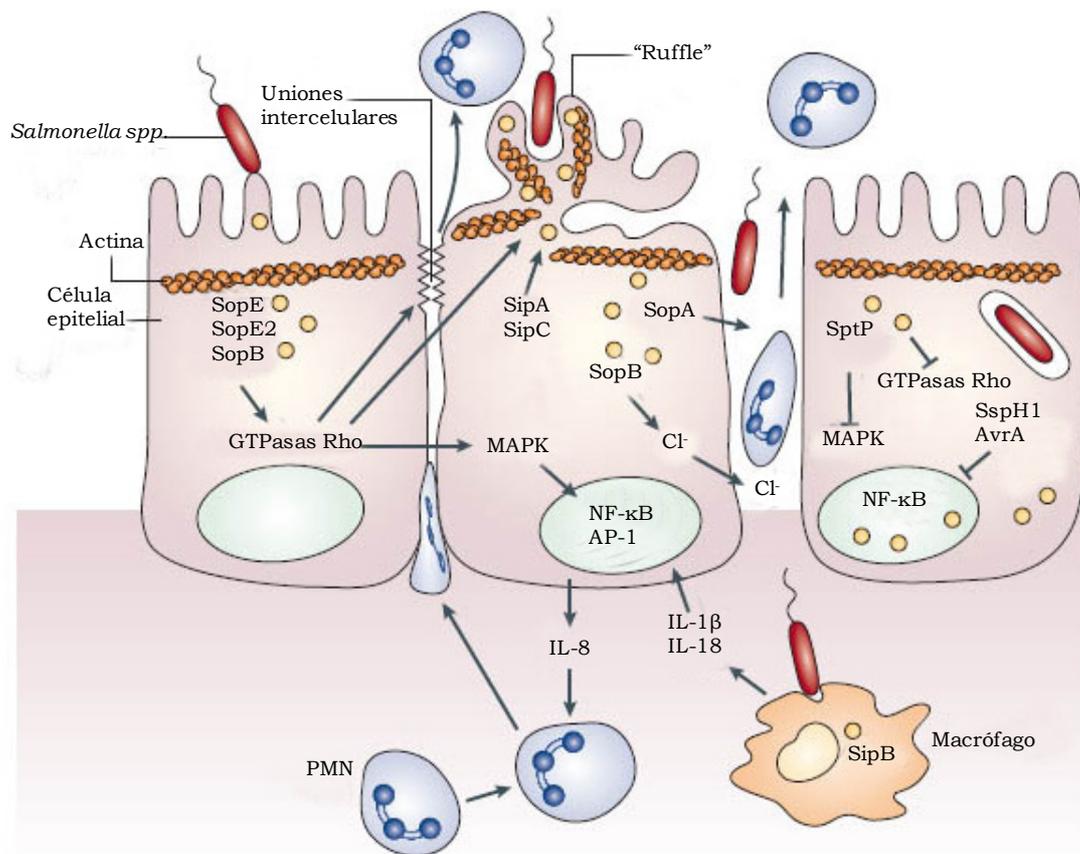


Figura I.7. El SST3-1 induce cambios en la célula hospedadora. Tras el contacto con la célula eucariota, *Salmonella* monta el SST3-1 y transloca efectores al citosol de la célula hospedadora. Algunos efectores como SopB, SopE y SopE2 activan GTPasas tipo Rho, lo cual induce una reorganización del citoesqueleto de actina que da lugar a la formación de prolongaciones o *ruffles* en la membrana, la activación de las rutas de las MAPK y la desestabilización de las uniones intercelulares. Los cambios en el citoesqueleto son, posteriormente modulados por los efectores de unión a actina SipA y SipC y permiten la entrada de la bacteria en la célula eucariótica. La activación de las rutas de MAPK induce la activación de los factores de transcripción AP-1 y NF-κB, los cuales promueven la llegada de PMFs y de IL-8. SipB induce la activación de la caspasa-1 en macrófagos, provocando la liberación de IL-1β e IL-18 y amplificando la respuesta inflamatoria. Además, SopB promueve la secreción de iones Cl⁻ mediante su actividad fosfatasa de inositol. La desestabilización de las uniones intercelulares permite la trans migración de PMFs desde la superficie apical a la superficie basolateral, el escape de fluido paracelular y el acceso de bacterias a la superficie basolateral. El efector SopA también promueve la trans migración de PMFs. Tras la entrada de la bacteria se produce una reestructuración del citoesqueleto de actina mediante la regulación negativa que ejerce el efector SptP sobre las rutas de las MAPK. Este efector, produce una disminución de la respuesta inflamatoria, junto con AvrA y SspH1 que inhiben la activación del factor NF-κB. Figura adaptada de Haraga y colaboradores (Haraga et al., 2008).

5.2 Restauración del citoesqueleto de actina

Poco después de la entrada de la bacteria, el citoesqueleto de la célula hospedadora vuelve a su estado basal. Esta restauración está mediada por la doble función del efector SptP. La proteína SptP contiene dos módulos

catalíticamente distintos, un dominio amino terminal con función activadora de las GTPasas de la familia de Rho y un dominio carboxilo terminal con actividad fosfatasa de tirosina (Kaniga et al., 1996). A diferencia de SopE/SopE2, los cuales son estructuralmente distintos a los GEFs de eucariotas, el dominio GAP de SptP claramente imita a las GAPs eucariotas, tanto estructuralmente, como en su mecanismo de acción (Stebbins y Galan, 2000). El dominio GAP de SptP regula negativamente a Cdc42 y Rac (activadas por SopE, SopE2 y SopB) mediante la estimulación de su actividad GTPasa. La actividad fosfatasa de tirosina de SptP también parece influir en la restauración del citoesqueleto de actina. En relación con esto, un sustrato identificado para la actividad fosfatasa de SptP es la vimentina fosforilada por la kinasa de tirosina ACK (Murli et al., 2001).

Por tanto, algunos efectores tienen funciones antagonistas: SipA, SopB, SopE y SopE2 promueven la polimerización de actina, la formación de arrugas en la membrana y la invasión de la célula hospedadora, mientras que SptP interrumpe estas respuestas y permite que la célula hospedadora recupere su arquitectura normal 1-2 horas después de la invasión. Si todos los efectores se inyectaran al mismo tiempo, SptP podría potencialmente anular la actividad de SipA, SopB, SopE y SopE2. Datos recientes indican, sin embargo, que existe un orden en la inyección de efectores de manera que al menos SipA y SopE se inyectan antes que SptP (Winnen et al., 2008). Además, aunque tanto SopE como SptP se ubiquitinan, SopE se degrada más rápidamente por acción del proteasoma y SptP persiste en el citosol durante horas tras la infección (Collins y Brown, 2010).

5.3 Biogénesis de la SCV y proliferación intracelular de *Salmonella*

La fagocitosis es un paso crítico en la defensa de las células durante una infección bacteriana. Al fagocitar una bacteria, se inicia una cascada de reacciones que llevan a la destrucción del organismo y que incluye producción de radicales superóxidos y óxido nítrico. Al mismo tiempo, el fagosoma se acidifica gracias a la acción de ATPasas vacuolares que se anclan en su membrana. La fusión con un lisosoma desempeña un papel

esencial en este proceso, ya que provoca la liberación de hidrolasas y proteasas que terminan de destruir las partículas fagocitadas [revisado en (Steele-Mortimer, 2008)].

Los patógenos bacterianos intracelulares han adoptado una serie de mecanismos para evadir su eliminación en los fagosomas y poder establecer un nicho para su replicación [revisado en (Haas, 2007)]. Quizás, la forma más obvia de evitar este mecanismo de defensa es escapar del fagosoma hacia el citoplasma, como hacen, por ejemplo *Listeria spp* y *Shigella spp*. Sin embargo, otros patógenos, como *Salmonella*, han desarrollado vías alternativas para evadir las acciones antimicrobianas del hospedador, mientras permanecen en fagosomas modificados donde establecen sus nichos replicativos.

La entrada de *Salmonella* en la célula hospedadora da lugar a la formación de compartimentos membranosos que engloban a las bacterias y que reciben el nombre de SCV. De manera simplificada, la biogénesis de la SCV se puede dividir en tres etapas: temprana, hasta los 30 min tras la infección, intermedia, entre 30 min y 5 h, y tardía. Al principio, la SCV adquiere transitoriamente marcadores asociados a la ruta endocítica temprana, como por ejemplo, el receptor de la transferrina (TfnR), el antígeno temprano endosómico 1 (EEA1) y varias GTPasas de la familia Rab, y comienza un proceso de maduración dependiente de Rab7 en el cual dichos marcadores son reemplazados por otras proteínas de membrana normalmente localizadas en endosomas tardíos y lisosomas entre los que se cuentan Rab7, la ATPasa vacuolar (v-ATPasa) y glucoproteínas de la membrana lisosómica como LAMP-1, LAMP-2, y LAMP-3/LIMP-1 (Beuzon et al., 2000; Garcia-del Portillo y Finlay, 1995). Sin embargo, otros marcadores lisosómicos típicos, como los receptores de la manosa 6-fosfato, o las hidrolasas lisosómicas no aparecen en la SCV, por lo que se sugiere que *Salmonella* regula la biogénesis de la SCV limitando la interacción con la ruta endocítica y, particularmente, bloqueando la fusión con lisosomas [revisado en (Steele-Mortimer, 2008)]. Los cambios descritos en el contenido de las membranas de la SCV van acompañados por un descenso en el pH del lumen por debajo de 4,5 y de la redistribución de la SCV hacia una

posición predominantemente perinuclear, cercana al centro organizador de microtúbulos (MTOC).

No cabe duda de que los efectores de los SST3 son fundamentales para el establecimiento de este nicho intracelular. Sin embargo, la contribución individual de cada efector es difícil de dilucidar, probablemente debido a cierta redundancia funcional, de manera que mutantes individuales tienen poco o ningún efecto en el fenotipo *in vivo* e *in vitro*.

El SST3-2, que se expresa intracelularmente y secreta sus efectores a través de la membrana de la SCV, está claramente implicado en el control de sucesos intracelulares. Sin embargo, el SST3-1, que se expresa extracelularmente y transloca sus efectores a través de la membrana plasmática, continúa translocando efectores desde la SCV y está también implicado en la biogénesis de la SCV. De hecho, al menos 5 efectores del SST3-1 están implicados en este proceso: SipA, SopA, SopB/SigD, SopE y SopD.

Tras la invasión, el efector SopA se transloca a través del SST3 de la vacuola hacia el citosol, donde se ubiquitina y se degrada rápidamente. Este efector está relacionado con la salida de bacterias de la SCV, aunque el significado de esta función no está muy claro (Zhang et al., 2005).

SopE y la actividad inositol fosfatasa de SopB son necesarias para el reclutamiento de Rab5 (Mallo et al., 2008; Mukherjee et al., 2001). SopB provoca la acumulación de PI3P en la SCV, lo que permite el reclutamiento de EEA1, Vamp8 y Lamp1. SopB también inhibe la degradación de receptores de factores de crecimiento epidérmico (EGFR) por el lisosoma (Dukes et al., 2006) y recluta la proteína nexina-1 (SNX-1) que, probablemente contribuye a que no aparezcan marcadores lisosómicos, como, por ejemplo, el receptor de la manosa 6-fosfato en la SCV madura (Bujny et al., 2008). En conjunto, estas observaciones sugieren que SopB desempeña un papel clave en el desvío del tráfico de la SCV de la ruta de maduración endosómica.

SopD (Brumell et al., 2003) es un efector del SST3-1 que puede actuar en cooperación con SopB durante la fase inicial de la formación del fagosoma.

SipA es una proteína de unión a actina. Recientemente se ha demostrado que induce la redistribución del endosoma tardío en células infectadas y, además, coopera con el efector del SST3-2 SifA en el mantenimiento de la SCV (Brawn et al., 2007).

A diferencia de los efectores del SST3-1, los efectores del SST3-2 suelen intervenir en las fases intermedia y tardía de la biogénesis de la SCV, especialmente, en el movimiento de la SCV hacia la zona perinuclear y el mantenimiento en esa posición, la formación de una malla de actina alrededor de la vacuola y la formación de los filamentos inducidos por *Salmonella* (Sifs) a lo largo de los microtúbulos (García-del Portillo et al., 1993).

El único efector de la SPI-2 que interviene en la fase temprana de la biogénesis de la vacuola es SpiC/SsaB, una proteína que inhibe la fusión entre membranas (Shotland et al., 2003; Uchiya et al., 1999). Hay datos que sugieren que SpiC es, además de un efector, un componente estructural del translocón (Yu et al., 2004).

Una vez que la SCV está posicionada, la bacteria empieza a replicarse. El estadio replicativo se caracteriza por la formación de unas estructuras especializadas tubulovesiculares ricas en LAMP que se extienden desde la SCV a lo largo de la red de microtúbulos y se conocen como Sifs. Mutaciones en *sifA* provocan atenuación en la virulencia en ratones y un importante defecto en la proliferación en macrófagos (Beuzon et al., 2000; Brumell et al., 2001; Guy et al., 2000; Stein et al., 1996). Además de ser ricos en LAMP, los Sifs contienen ATPasas vacuolares, el ácido lipídico lisobifosfatídico, típico de endosomas tardíos, Rab7 y catepsina D, por lo que se piensa que se generan por la fusión de endosomas tardíos o lisosomas con la SCV, aunque su papel preciso en la infección no está claro [revisado en (Steele-Mortimer, 2008)]. El mantenimiento de la vacuola en la zona perinuclear parece ser importante para promover la replicación bacteriana. La proximidad de la SCV al aparato de Golgi podría facilitar la intercepción de vesículas de transporte endocíticas y exocíticas para obtener nutrientes y membranas. La redistribución de la SCV desde la periferia de la célula hacia la zona perinuclear está mediada, al menos en parte, por la proteína

pequeña de unión a GTP Rab7, junto con su ligando RILP, el cual es necesario para el reclutamiento de la dineína, proteína motora de microtúbulos. En estos procesos intervienen varios efectores del SST3-2, como se explica a continuación.

SifA se une a la proteína SKIP (proteína de interacción de SifA y kinesina). Este efector resulta esencial en la formación de los Sifs (Stein et al., 1996), ya que mutantes carentes del mismo no forman dichas estructuras y eventualmente escapan de la vacuola (Beuzon et al., 2000). Por otro lado, la expresión transitoria de SifA provoca inflamación, agregación de endosomas tardíos y formación de pseudo-Sifs en células de mamíferos [revisado en (Steele-Mortimer, 2008)]. SifA se asocia a la membrana vacuolar a través de su dominio carboxilo terminal y el hexapéptido de dicho dominio resulta clave para ejercer sus funciones (Boucrot et al., 2003). El efector PipB2 también promueve la extensión de los Sifs, probablemente a través de su interacción con la kinesina-1 (Henry et al., 2006; Knodler y Steele-Mortimer, 2005). El efector SseJ se localiza en la SCV y es necesario durante la infección sistémica en ratones (Ruiz-Albert et al., 2002). Tiene actividad desacilasa *in vitro* (Ohlson et al., 2005) y actividad fosfolipasa A (Lossi et al., 2008) y su ligando en la célula hospedadora es el colesterol. SseJ actúa como antagonista de SifA, ya que regula negativamente la formación de Sifs [revisado en (Steele-Mortimer, 2008)]. Además parece ser necesario para la pérdida de la integridad de la membrana vacuolar, ya que el doble mutante *sifA sseJ* permanece dentro de la SCV, a diferencia del mutante simple *sifA* (Beuzon et al., 2000; Ruiz-Albert et al., 2002). Un efector del SST3-1 antes mencionado, SptP, parece tener un papel también en la formación de Sifs y en la replicación intracelular. Una diana de su actividad fosfatasa de tirosina es una ATPasa de la familia AAA+ denominada VCP (por *valosin-containing protein*). La defosforilación de VCP podría promover la formación de Sifs y la replicación intracelular de *Salmonella* a través de los adaptadores p47 y Ufd1 (Humphreys et al., 2009).

SseG y SseF parecen intervenir en el mantenimiento de la SCV en la región perinuclear mediante la formación de un complejo funcional que une

la SCV al aparato de Golgi a través de la manipulación de la actividad de la dineína. Ésta y la kinesina son las proteínas motoras más importantes de los microtúbulos (Ramsden et al., 2007), y regulan la dinámica de la membrana de la SCV (Guignot et al., 2004)

Otro fenotipo asociado a los efectores del SST3-2 es la formación de una malla de F-actina alrededor de la SCV, conocida como “polimerización de actina asociada a la vacuola” o VAP, un proceso relacionado con la integridad de la membrana de la SCV (Meresse et al., 2001). Los efectores SteC, SseI y SspH2 han sido relacionados con este proceso aunque sus papeles no están muy claros. SteC es homólogo a la kinasa humana Raf1, y su actividad es necesaria para la remodelación de actina, aunque no para la integridad de la membrana de la SCV (Poh et al., 2008). SseI y SspH2 interaccionan con la filamina, proteína encargada de unir filamentos de actina. SspH2 colocaliza con VAP en células infectadas y en experimentos *in vitro* es capaz de unirse a la proteína de unión a actina, profilina, y disminuir la tasa de polimerización de actina. Por otro lado, el efector codificado en el plásmido de virulencia de *Salmonella* SpvB, impide la polimerización de actina, inhibiendo la formación de VAP y afectando, por tanto a la integridad de la membrana de la SCV (Miao et al., 2003).

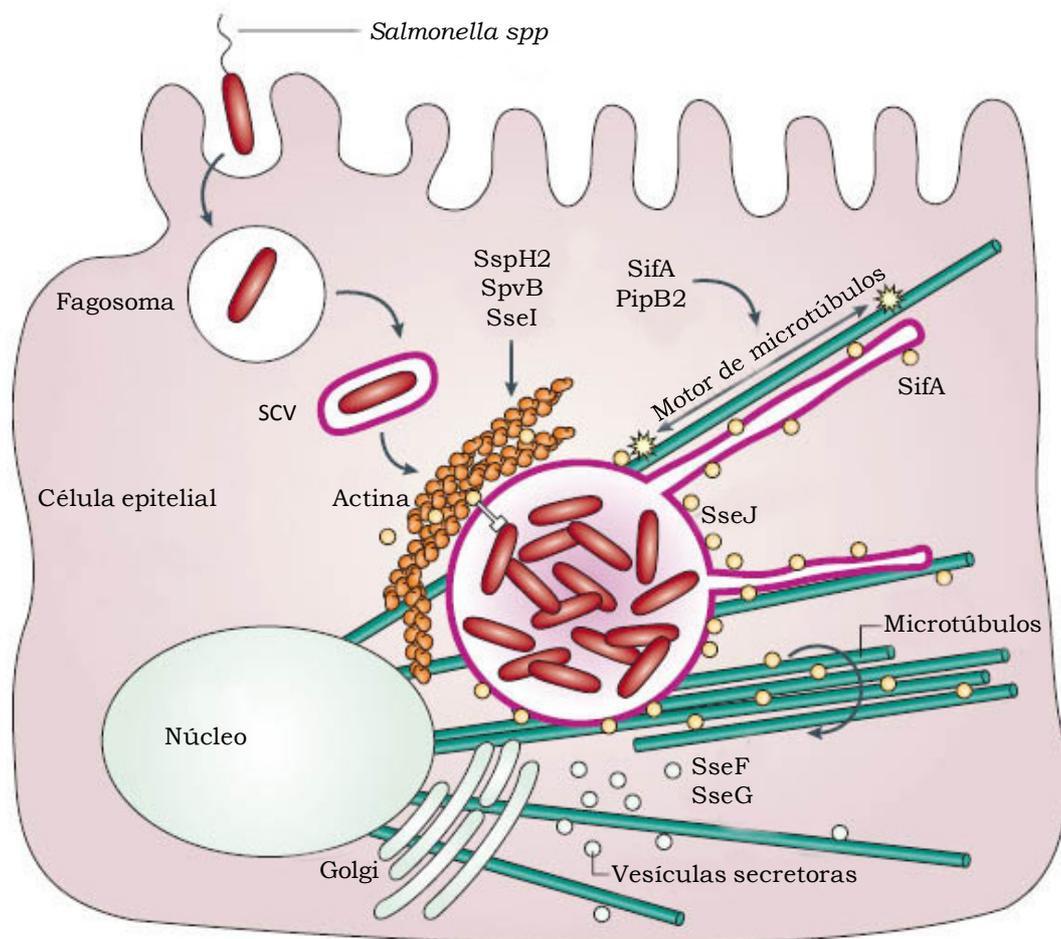


Figura I.8. Formación de la SCV e inducción del SST3-2. Poco después de la internalización mediante macropinocitosis, las bacterias se encuentran encerradas en un compartimento formado por las prolongaciones de la membrana que recibe el nombre de fagosoma. Luego, el fagosoma adquiere marcadores endosómicos, se acidifica y se encoge para formar la SCV (vacuola que contiene a *Salmonella*). Se expresa el SST3-2 y transloca efectores al citosol de la célula hospedadora. Los efectores SifA y PipB2 contribuyen a la formación de Sifs (filamentos inducidos por *Salmonella*) a lo largo de los microtúbulos (en verde) y regulan la acumulación de proteínas motoras de microtúbulos (estrellas amarillas) en los Sifs y en la SCV. SseJ es una desacilasa que es activa en la membrana del fagosoma. SseF y SseG promueven la formación de haces de microtúbulos adyacentes a la SCV y regulan el tráfico vesicular del aparato de Golgi hacia la SCV. Los efectores SspH2, SpvB y SseI contribuyen a la acumulación de actina alrededor de la SCV. Figura adaptada de Haraga y colaboradores (Haraga et al., 2008).

5.4 Respuesta inflamatoria intestinal

La activación de Cdc42 por SopE, SopE2 y SopB además de provocar la remodelación del citoesqueleto de actina, que facilita la entrada de la bacteria en la célula hospedadora, también lleva a la activación dependiente de Raf1 de las proteína kinasas activadas por mitógenos (MAPK), Erk, Jnk y p38, las cuales activan los factores de transcripción AP-1 y NF- κ B. Estos

factores de transcripción dirigen la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como la IL-8, que estimula la trans migración de PMN (leucocitos polimorfonucleares). Al mismo tiempo, SipA, por medio de su dominio amino terminal induce la cascada de señalización de Arf6 y fosfolipasa D que activa a la kinasa Ca, permitiendo la secreción por la zona apical de la célula de hepxilina A3, un potente quimioatrayente de PMN (Layton y Galyov, 2007; Wall et al., 2007). Esto promueve la trans migración de los leucocitos a través del epitelio hacia el lumen del intestino. Esta acción es amplificada por la actividad ligasa de ubiquitina E3 de SopA (Diao et al., 2008). La trans migración de PMN parece contribuir a la aparición de diarrea, lo que favorece la transmisión de *Salmonella* por vía oral-fecal [revisado en (McGhie et al., 2009)]. La actividad inositol fosfatasa de SopB genera inositoles fosfatos que también contribuyen a la inducción de diarrea mediante la secreción de iones cloruro y de fluidos (Layton y Galyov, 2007; Patel y Galan, 2005). La alteración de las uniones celulares del epitelio provocadas por SopB, SopE, SopE2 y SipA también promueve el flujo de fluidos y la trans migración de PMN (Boyle et al., 2006), aunque el efector del SST3-1 AvrA contrarresta esta actividad (Liao et al., 2008).

La muerte de la célula hospedadora inducida por *Salmonella*, de la que se habla en el siguiente apartado, también aumenta las respuestas inflamatorias.

Salmonella también secreta efectores que suprimen la respuesta inmunitaria celular. SptP, con sus actividades catalíticas GAP y fosfatasa de tirosinas, está implicado en revertir la activación de las MAPK (Lin et al., 2003; Murli et al., 2001) y la actividad acetiltransferasa de AvrA impide la activación de la Jnk (Jones et al., 2008). SpvC también inhibe directamente a las MAPKs Erk, Jnk y p38, a través de su actividad liasa de fosfotreonina (Li et al., 2007; Mazurkiewicz et al., 2008).

Finalmente, *Salmonella* secuestra factores de transcripción de la ruta de las MAPK. SseL es una desubiquitinasa que suprime la activación de NFκB, impidiendo la ubiquitinación y degradación de IκBα (Le Negrate et al., 2008), una actividad que también se le adjudica a AvrA (Ye et al., 2007). Además el efector SspH1, que es sustrato de los dos SST3 de *Salmonella*

inhibe la expresión de genes dependiente de NF κ B, posiblemente a través de la ubiquitinación de la quinasa de la célula hospedadora PKN1 (Rohde et al., 2007).

5.5 Muerte celular inducida por *Salmonella*

Durante la infección, *Salmonella* interacciona con varios tipos de células hospedadoras, entre ellos macrófagos, células dendríticas y células epiteliales. Estas interacciones suelen llevar, en último término, a la muerte de las células hospedadoras. La muerte puede ser consecuencia de diferentes mecanismos moleculares y puede dar lugar a distintos resultados fisiológicos [revisado en (Fink y Cookson, 2007)].

Salmonella invade células epiteliales intestinales durante la fase entérica de la infección y es capaz de producir la muerte de células epiteliales cultivadas *in vitro* entre 12 y 18 h después de la infección (Kim et al., 1998). Esta citotoxicidad presenta todas las características morfológicas propias de la apoptosis y se caracteriza por la activación de las caspasas apoptóticas 3 y 8, pero no de la caspasa 1. De hecho, la caspasa 1 no está implicada en la apoptosis, ya que células deficientes en esta caspasa responden normalmente a los estímulos apoptóticos. En las células epiteliales infectadas por *Salmonella* se observan también la proteólisis de la citokeratina 18, la condensación nuclear y la rotura del ADN, que son propios del proceso apoptótico. El SST3-1 y los efectores de este sistema necesarios para la invasión se requieren también para la apoptosis de las células epiteliales ya que sin que haya previamente invasión no puede inducirse la muerte de la célula. Pero además, el SST3-2 y los genes *spv* son también necesarios (Paesold et al., 2002). La producción de óxido nítrico y TNF- α por parte de la célula hospedadora contribuyen a la apoptosis, lo que puede representar un mecanismo del hospedador para eliminar las células infectadas. Sin embargo, esta apoptosis ocurre de manera relativamente tardía y este retraso puede proporcionar el tiempo necesario para la replicación de las bacterias en el nicho intracelular.

A diferencia de lo que ocurre en las células epiteliales, la infección de los macrófagos con *Salmonella* estimula un programa de muerte celular dependiente de caspasa 1 (Brennan y Cookson, 2000; Fink y Cookson, 2006; Hersh et al., 1999). La activación de la caspasa 1 lleva a la rotura de los precursores inactivos de IL-1 β e IL-18 y los convierten en citoquinas maduras. Esto produce lisis rápida con liberación del contenido celular, lo que da lugar a una reacción inflamatoria, que no tiene lugar en la muerte celular por apoptosis. Para este proceso de muerte celular se ha propuesto el nombre de piroptosis (Cookson y Brennan, 2001). Se han descrito dos formas de muerte por piroptosis de los macrófagos infectados con *Salmonella*, una forma rápida y otra retrasada. La muerte rápida requiere la expresión del SST3-1 y de la flagelina y puede ocurrir en la primera hora de infección. Mutantes en elementos del sistema como *invA*, *invG*, *invJ*, *prgH*, *sipB*, *sipC*, *sipD* o *spaO*, y mutantes sin flagelo, no son citotóxicos. En cambio mutantes en genes para efectores individuales como *sipA* o *sptP*, siguen siendo citotóxicos. Se requiere la internalización de las bacterias, pero ésta no es suficiente, ya que las *Salmonella* carentes del SST3-1 entran en los macrófagos por fagocitosis pero no causan esta muerte rápida. La replicación intracelular no es una condición para producir este tipo de muerte celular (Monack et al., 1996). En principio, resulta paradójico que las bacterias maten rápidamente a las células que deben servirle de nicho de replicación y diseminación para producir la enfermedad sistémica. Sin embargo, la expresión del SST3-1 y de la flagelina se ven reprimidas durante la infección sistémica. *In vitro*, esto se puede imitar usando cultivos estacionarios para la infección de líneas celulares de macrófagos. En este caso no se produce la muerte rápida (Lundberg et al., 1999), pero tras 18-24 h de infección se produce una muerte retrasada de los macrófagos infectados. Este tipo de muerte necesita la expresión del SST3-2 (Monack et al., 2001; van der Velden et al., 2003) y se caracteriza, al igual que la muerte rápida, por estar mediada por la caspasa 1. En macrófagos deficientes en caspasa 1, en los que no puede ocurrir ninguna de las dos formas de piroptosis descritas, se da muerte por apoptosis, que implica la activación de las caspasas 2, 3, 6 y 8 y la liberación de citocromo c desde la

mitocondria, varias horas tras la infección con *Salmonella* (Jesenberger et al., 2000). Las tres formas de muerte descritas se esquematizan en la **Figura I.9.**

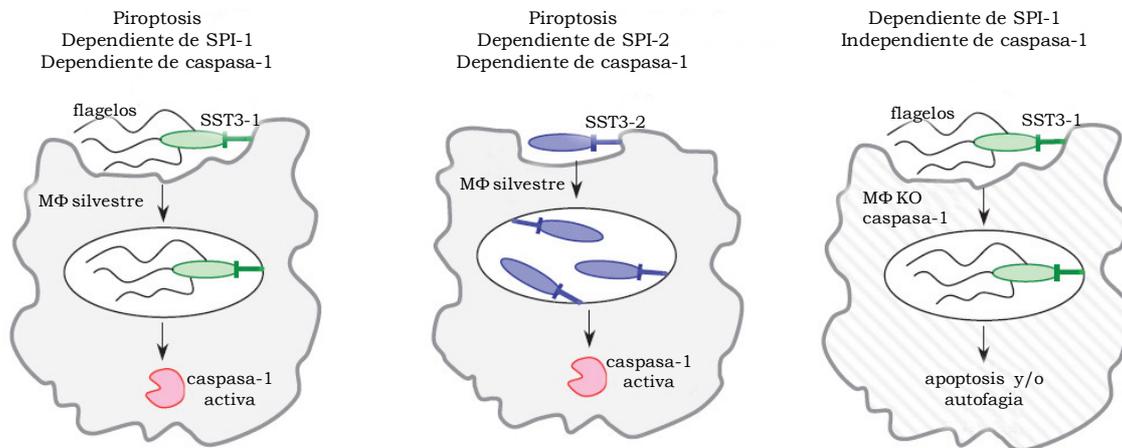


Figura I.9. Vías de muerte celular inducida por *Salmonella* en macrófagos. La representada a la izquierda es una forma de muerte rápida dependiente del SST3-1 de *Salmonella* y de la caspasa 1 del hospedador. La del centro se produce más tardíamente, depende del SST3-2 y también implica la activación de la caspasa 1. Ambas entran dentro de la definición de piroptosis. La última forma de muerte ocurriría en macrófagos deficientes en caspasa 1, pero también en células epiteliales normales, y ocurre por apoptosis. MΦ, macrófago; MΦ KO caspasa-1, macrófago deficiente en caspasa-1 (Fink y Cookson, 2007).

6. COMPARTIMENTALIZACIÓN DE FUNCIONES DE LOS SST3-1 Y -2

6.1 Cooperación entre efectores

Las acciones individuales de los efectores del SST3-1 durante la entrada de *Salmonella* se han estudiado en profundidad. Sin embargo, aún no está claro cuáles de ellos persisten en el citosol de la célula hospedadora, ni se ha establecido la secuencia ni la cinética de la translocación de dichos efectores, aunque hay trabajos que están empezando a dilucidar este complejo proceso (Winnen et al., 2008). Además, no se comprende completamente cómo se controlan las actividades individuales de cada efector. Un factor es que estas proteínas parecen presentar diferentes vidas medias tras su translocación a la célula eucariótica (Patel y Galan, 2005).

Trabajos sobre la localización de efectores han mostrado que, además de la translocasa SipB, otros 6 efectores del SST3-1 se reparten en la membrana plasmática del hospedador (SipA, SipC, SopB, SopE, SopE2 y

SptP), lo que sugiere que pueden proporcionar una plataforma para la cooperación entre efectores (Raffatellu et al., 2005), así como para la interacción entre efectores y ligandos durante la entrada de la bacteria (Cain et al., 2004). Escrutinios combinatorios (Cain et al., 2008) han confirmado interacciones entre efectores ya conocidas, como las cooperaciones SipA-SipC, SopB-SopE y el antagonismo SopE-SptP (Hayward y Koronakis, 2002; Raffatellu et al., 2005) y han sugerido dos nuevas sinergias: SipC-SopB y SipC-SopE (Cain et al., 2008). Sin embargo, las interacciones de los efectores del SST3-2 con sus ligandos de la célula hospedadora, así como entre ellos, apenas se conocen.

6.2 Solapamientos entre sistemas

La visión clásica es que los dos SST3 asociados a la virulencia, que codifica *Salmonella* en las SPI-1 y SPI-2, funcionan en diferentes momentos durante la infección (Hansen-Wester y Hensel, 2001). Mientras que el SST3-1 se activa tras el contacto con la célula hospedadora y transloca los efectores a través de la membrana plasmática, el SST3-2 se expresa dentro de la SCV y transloca efectores a través de la membrana vacuolar. El SST3-1 es necesario para la invasión de células no fagocíticas, la inducción de la respuesta inflamatoria intestinal y la producción de diarrea, así como la colonización del intestino. El SST3-2, en cambio, está implicado en la supervivencia de la bacteria en los macrófagos y en el establecimiento de la enfermedad sistémica [revisado en (Haraga et al., 2008)].

Sin embargo, hay estudios que demuestran que el SST3-2 se expresa en etapas tempranas de la infección de ratones por *S. enterica* serovar Typhimurium, antes de penetrar en el intestino (Brown et al., 2005). Aunque no hay pruebas de que este SST3 esté implicado en la colonización del intestino, es posible que la expresión de dicho sistema sea necesaria para una invasión eficiente, ya que mutaciones en el SST3-2 provocan una importante disminución en la expresión de algunos genes del SST3-1 y perjudican la capacidad de las bacterias de invadir el epitelio intestinal (Deiwick et al., 1998; Hensel et al., 1997). Por otro lado, cada vez hay más

datos sobre efectores del SST3-1 que se expresan o persisten dentro de la célula hospedadora durante largo tiempo tras la invasión y están implicados en procesos tradicionalmente atribuidos exclusivamente a efectores del SST3-2 (Brawn et al., 2007; Drecktrah et al., 2005; Giacomodonato et al., 2007; Hernandez et al., 2004; Lawley et al., 2006; Steele-Mortimer et al., 2002). Los efectores SipA (Brawn et al., 2007), SopB (Wasylnka et al., 2008) y SptP (Humphreys et al, no publicado) persisten en la célula hospedadora varias horas después de la entrada de la bacteria y tienen papeles claves en el posicionamiento de la SCV y en la replicación, lo que sugiere una interacción entre efectores de ambos sistemas de secreción. De hecho, el efector del SST3-1 SipA coopera con SifA, un efector del SST3-2, en el posicionamiento perinuclear de la SCV (Brawn et al., 2007). Los datos anteriores indican que los dos SST3 de *S. enterica* no operan de una forma independiente, como se pensaba con anterioridad, sino que posiblemente cooperan entre sí, para facilitar el proceso de infección de la bacteria. Este hecho resulta particularmente interesante, debido a que la información de las secuencias y la organización genética de las dos SST3 de *Salmonella*, así como su distribución a lo largo de las distintas especies, indican que se adquirieron de forma independiente, en distintos momentos y se obtuvieron de distintas fuentes. Por tanto, es posible que la presión selectiva del ambiente del hospedador provocara la cooperación entre los dos SST3 para optimizar la colonización, invasión y proliferación intracelular en los animales [revisado en (Haraga et al., 2008)].

7. BIOLOGÍA ESTRUCTURAL DE LOS SST3

Cada vez hay más datos de tipo estructural acerca de los aparatos de secreción de tipo III, acerca de sus sustratos y de las chaperonas que interaccionan con esos sustratos. Estos estudios están ayudando a entender la función y la topología de los distintos componentes. La dilucidación de la estructura del aparato de secreción, la parte más conservada del sistema, es, actualmente, un campo muy activo de investigación. El problema comenzó a abordarse hace más de diez años con la primera visualización

mediante microscopía electrónica convencional del complejo aguja del SST3-1 de *Salmonella* (Kubori et al., 1998). Más tarde se ha usado la microscopía electrónica tridimensional para estudiar la estructura del complejo en *Salmonella* (Marlovits et al., 2004) y en *Shigella* (Blocker et al., 2001; Hodgkinson et al., 2009). Recientemente ha habido importantes progresos gracias a los estudios cristalográficos por difracción de rayos X de componentes del aparato de secreción, en particular las tres proteínas del cuerpo basal (Spreter et al., 2009; Yip et al., 2005). La **Figura I.10** presenta la orientación relativa de los distintos componentes caracterizados.

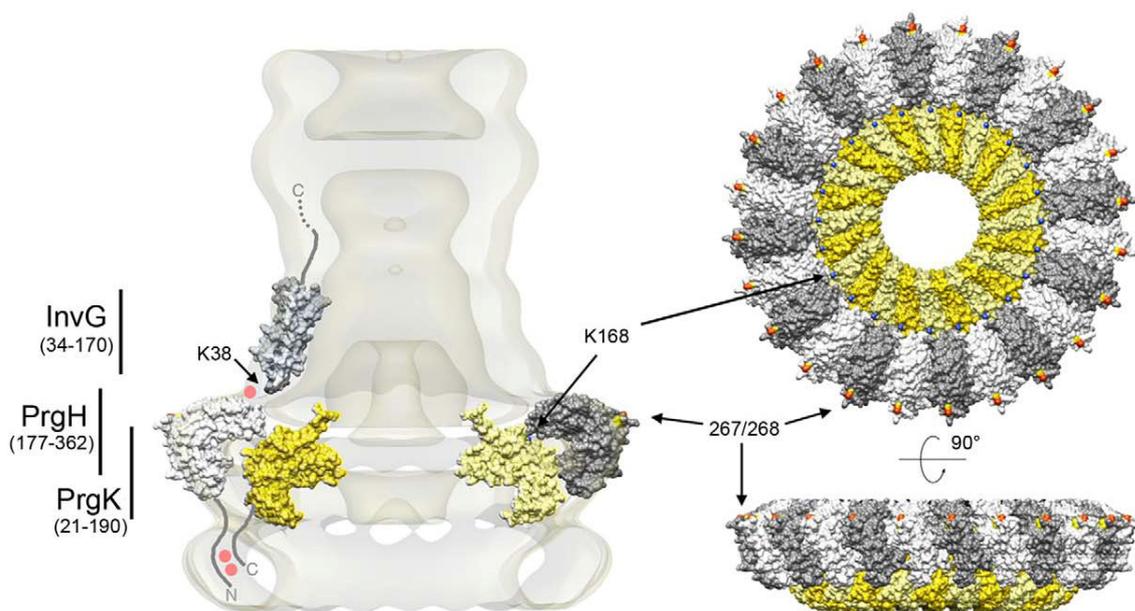


Figura I.10. Modelo topográfico del complejo aguja del SST3-1. Se muestra la localización de InvG, PrgH y PrgK (Schraidt et al., 2010).

Los estudios de cristales mediante análisis de difracción de rayos X están siendo muy útiles también para comprender la estructura y la función de los efectores de los SST3, en particular cuando se estudia la estructura del complejo entre el efector y su ligando eucariótico. Dos ejemplos del poder de esta metodología son la resolución de la estructura del complejo entre SptP y Rac1 (Stebbins y Galan, 2000) y el análisis de la interacción entre el efector SifA y la proteína eucariótica SKIP (Diacovich et al., 2009).

8. SLRP

slrP se identificó al buscar factores genéticos que pudieran influir en la determinación de la gama de hospedadores de un determinado serovar de *S. enterica* (Tsolis et al., 1999). La estrategia consistió en comparar la virulencia de mutantes de un mismo serovar, Typhimurium, en dos hospedadores diferentes, ratón y ternero. Se obtuvo una colección de mutantes mediante la metodología STM (*signature-tagged mutagenesis*) en la que cada mutante se debe a la inserción de un transposón etiquetado individualmente. Se introdujo la colección en los dos hospedadores y se averiguó qué mutantes estaban ausentes de algún tejido diana (placas de Peyer o bazo) varios días tras la infección (mutantes atenuados). Luego se comparó el resultado en uno y otro hospedador. Uno de los mutantes tenía un defecto en la colonización de placas de Peyer (aunque no del bazo) en ratones y no en terneros. Además su DL50 por vía oral era seis veces mayor que la de la estirpe silvestre en ratones y no difería de la silvestre en terneros.

El gen portador de la inserción se localiza en una región de 2,9 kb de ADN con características propias de una adquisición horizontal. Un análisis de su secuencia, reveló que su producto era una proteína que contenía varias repeticiones de un motivo rico en leucinas (LRR) que suele estar implicado en interacciones entre proteínas. Por ello a este gen se le denominó *slrP* por *Salmonella leucine-rich repeat protein*.

La proteína SlrP tiene una secuencia de 765 aminoácidos y se puede dividir en tres dominios (Miao et al., 1999) (**Figura I.11**). El dominio amino-terminal está implicado en la secreción y translocación hacia la célula eucariótica y se parece a los dominios amino de los efectores de *Salmonella* SspH1, SspH2, SseI, SseJ, SifA y SifB (Miao y Miller, 2000). SlrP es uno de los pocos efectores que puede translocarse por medio de los dos SST3 presentes en *S. enterica* (Miao y Miller, 2000). El dominio central (aminoácidos 176-427) contiene varias copias del motivo rico en leucina antes mencionado. Repeticiones de este motivo se encuentran también en otros efectores como SspH1 y SspH2 de *S. enterica* serovar Typhimurium, YopM de *Yersinia spp* y la familia IpaH de *S. flexneri* (Miao et al., 1999).

Finalmente, el dominio carboxilo terminal está conservado en SspH1, SspH2 y la familia IpaH. En el momento de iniciar este estudio, se desconocía la función de este dominio. Tampoco había otros datos sobre la función de SlrP.

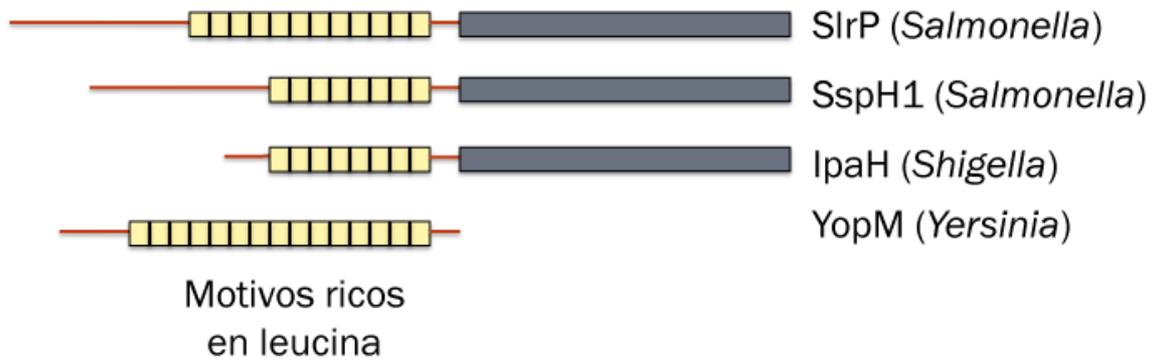


Figura I.11. Esquema de los dominios de SlrP y efectores relacionados.

OBJETIVOS

Los SST3 permiten a las bacterias patógenas Gram negativas secretar e inyectar proteínas que intervienen en virulencia al citosol de las células hospedadoras eucarióticas. Estas proteínas, denominadas efectores, son capaces de alterar las rutas de señalización celular y manipular las funciones celulares del hospedador. Sin embargo, no se conocen las funciones específicas de muchas de estas proteínas efectoras.

El propósito general de esta Tesis ha sido contribuir a un mejor conocimiento de los mecanismos de virulencia de *Salmonella* a través del estudio funcional y estructural de uno de sus efectores, SlrP, cuya función, en el momento de empezar este estudio era desconocida. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Realizar un escrutinio genético para la identificación de proteínas humanas que sirvieran de dianas para el efector SlrP de *Salmonella*
2. Caracterizar la función catalítica de SlrP.
3. Llevar a cabo un análisis funcional de las interacciones entre SlrP y sus ligandos y analizar las consecuencias fisiológicas de estas interacciones para la célula hospedadora.
4. Realizar un análisis estructural mediante cristalografía de rayos X del efector SlrP solo y en complejo con alguna de las proteínas con las que interacciona en la célula hospedadora.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

1.1 Estirpes bacterianas

Todas las estirpes de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Escherichia coli* usadas en esta Tesis se incluyen en la **Tabla M.1**. Las estirpes de *S. enterica* derivan del tipo silvestre ATCC 14028s (también conocida como ATCC14028 o simplemente 14028).

Tabla M.1. Estirpes bacterianas

Estirpe	Genotipo	Referencia
<i>E. coli</i>		
DH5a	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	(Hanahan, 1983)
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdSB</i> (rB ⁻ mB ⁻ ; estirpe <i>E. coli</i> B), con DE3, un profago λ con el gen de la ARN polimerasa de T7	Stratagene
M15	Derivado de K12, <i>thi lac ara mtl F⁻</i>	Qiagen
<i>S. enterica</i>		
14028	Estirpe silvestre	ATCC
SV5193	14028 <i>slrP::3xFlag, Kan^r</i>	Este estudio

1.2 Estirpes de levadura

Las estirpes de *Saccharomyces cerevisiae* usadas en este estudio se describen en la **Tabla M.2**.

Tabla M.2. Estirpes de levadura

Estirpe	Genotipo	Referencia
<i>S. cerevisiae</i>		
AH109	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80 Δ, LYS2 :: GAL1_{UAS}-GAL1^{TATA}-HIS3, GAL2_{UAS}GAL2^{TATA}-ADE2 URA3 :: MEL1_{UAS}-MEL1^{TATA}-LacZ MEL1</i>	Holtz, no publicado
Y187	<i>MATα, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4Δ, gal80 Δ, met⁻, URA3 :: GAL1_{UAS}-GAL1^{TATA}LacZ MEL1</i>	(Harper et al., 1993)

1.3 Líneas de células de mamífero

En este estudio se ha utilizado la línea de células epiteliales humanas HeLa y las líneas derivadas de ésta, transfectadas establemente, HeLa pcDNA3, HeLa pcDNA3-SlrP3xFlag y HeLa pcDNA3-SlrP(C546A)-3xFlag. Estas últimas expresan las versiones silvestre y mutante, respectivamente, de la proteína SlrP con el epitopo 3xFlag.

1.3.1 Congelación y descongelación de células de mamífero

Para la congelación de células HeLa se pusieron, en cada vial de congelación, entre 5×10^6 y 10^7 células resuspendidas en 1,5 ml de medio de congelación. El vial se mantuvo 2 h a -20°C , 24 h a -80°C y, finalmente, se guardó en una atmósfera de nitrógeno líquido.

Para la descongelación, los viales se introdujeron en agua a temperatura ambiente durante pocos minutos (hasta la descongelación). Luego las células se diluyeron en 10 ml de medio de cultivo, se centrifugaron 10 min a 1000 rpm, se resuspendieron en medio fresco y se transfirieron a una caja de cultivo.

Medio de congelación para células de mamífero: 10% de DMSO, 90% de suero fetal bovino

2. MEDIOS, SOLUCIONES Y CONDICIONES DE CULTIVO

2.1 Bacterias

2.1.1 Condiciones de cultivo

Las condiciones habituales de cultivo fueron 37°C con agitación (200 rpm). Para condiciones de microaerofilia las bacterias se cultivaron a 37°C , sin agitación.

2.1.2 Medios y soluciones

El medio de Luria y Bertani (**LB**) se usó como medio rico (Maloy, 1990). El agar se añadió a una concentración del 1,5% para el medio sólido.

Para seleccionar bacterias transformantes se usó medio rico LB suplementado con los antibióticos ampicilina (Amp), a 100 µg/ml o kanamicina (Kan), a 50 µg/ml, según el caso.

Para conseguir las condiciones de máxima invasividad de *Salmonella*, se usó medio rico **LB con 0,3 M NaCl** y microaerofilia.

Para la producción de ciertas proteínas se usó medio rico **2xYT**.

Medio LB: extracto de levadura 5 g/l, triptona 10 g/l y NaCl 10 g/l

Medio 2xYT: extracto de levadura 10 g/l, triptona 16 g/l y NaCl 5 g/l.

2.2 Levaduras

2.2.1 Condiciones de cultivo

Las levaduras se cultivaron a 30°C con agitación (200 rpm) para favorecer la aireación del cultivo.

2.2.2 Medios y soluciones

Los medios ricos usados para cultivar las levaduras fueron YPD e YPDA.

Como medio completo se usó el medio mínimo SD suplementado con una mezcla de distintos ingredientes (*drop-out*) en función de los marcadores nutricionales que se quisieran seleccionar. Para hacer el medio completo se añadía al medio mínimo 1,24 g/l del *drop-out* comercial de Clontech o 2 g/l del preparado en el laboratorio. Éste es una combinación de los siguientes ingredientes (a excepción de los requerimientos apropiados para la selección de transformantes o interacciones en el sistema de doble híbrido):

Ácido aspártico	10 g	Inositol	10 g
Ácido glutámico	10 g	Isoleucina	10 g
Ácido para-aminobenzoico	1 g	Leucina	20 g
Adenina	2,5 g	Lisina	10 g
Alanina	10 g	Metionina	10 g
Arginina	10 g	Prolina	10 g
Asparragina	10 g	Serina	10 g
Cisteína	10 g	Treonina	10 g
Fenilalanina	10 g	Triptófano	10 g
Glicina	10 g	Tirosina	10 g
Glutamina	10 g	Uracilo	10 g
Histidina	10 g	Valina	10 g

Medio rico YPD: 1% de extracto de levadura, 2% de bacto-peptona, 2% de glucosa.

Medio rico YPDA: YPD suplementado con 20 mg/l de adenina.

Medio mínimo SD: base nitrogenada para levaduras sin aminoácidos ni sulfato amónico (Difco) 1,7 g/l, sulfato amónico 5 g/l, glucosa 20 g/l.

2.3 Células de mamífero

2.3.1 Condiciones de cultivo

Las líneas celulares se cultivaron en un incubador Biotech Galaxy a 37°C en una atmósfera húmeda con un 5% de CO₂. Se usaron cajas de cultivo de 10 cm de diámetro (con 10 ml de medio de cultivo) o 15 cm de diámetro (con 20 ml de medio de cultivo), o cajas multipocillos de 6 pocillos (3 ml por pocillo) o 24 pocillos (1 ml por pocillo). Las células se subcultivaron 2 veces por semana pasándolas a medio fresco a la dilución que fuera necesaria. Puesto que la línea celular HeLa es adherente, para subcultivarlas hay que despegarlas de la caja mediante tripsinización. Para ello, se retira el medio de cultivo, se lavan las células dos veces con tampón fosfato salino (PBS) y se añade 1 ml de tripsina. Se incuban en la estufa de CO₂ a 37°C durante 10 minutos y se recogen en medio fresco.

2.3.2 Medios y soluciones

El medio de cultivo usado para las líneas de células HeLa y sus derivados fue el medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) suplementado con 10% de suero fetal bovino, L-glutamina 2mM, penicilina 100 unidades/ml y estreptomina 100 µg/ml. En los experimentos de infección con *Salmonella*, no se añadían antibióticos al medio.

Inactivación del suero: el suero descongelado se incubó a 56°C durante 30 min. De este modo se inactiva el complemento, que podría producir la lisis de las células tumorales.

PBS 10x: NaCl 1,37 M, KCl 27 mM, Na₂HPO₄·7H₂O 43 mM, KH₂PO₄ 14 mM. Ajustar el pH a 7,3.

3. MANIPULACIÓN Y TRANSFERENCIA DEL ADN

3.1 Plásmidos

Los plásmidos utilizados en esta Tesis se describen en la **Tabla M.3.**

Tabla M.3. Plásmidos.

Plásmido	Descripción	Referencia
pcDNA3	Vector para transfección estable o transitoria, Amp ^r	Invitrogen
pCS2+HA3	Vector para transfección transitoria, Amp ^r	F. Romero
pGADT7	Vector para doble híbrido, <i>GAL4</i> (768-881) AD, <i>LEU2</i> , Amp ^r	Clontech
pGBKT7	Vector para doble híbrido, <i>GAL4</i> (1-147) DB, <i>TRP1</i> , Kan ^r	Clontech
pGBKT7-53	DB plásmido control	Clontech
pGBT10	Vector para doble híbrido, <i>GAL4</i> (1-147) DB, <i>TRP1</i> , Amp ^r	Clontech
pGEX-4T-1	Para fusiones GST, Amp ^r	Pharmacia
pGEX-4T-3	Para fusiones GST, Amp ^r	Pharmacia
pIZ1623	pGEX-4T-3-SlrP	Este estudio
pIZ1627	pGBT10-SlrP	Este estudio
pIZ1680	pGADT7-SlrP	Este estudio
pIZ1688	pGADT7-Trx2	Este estudio
pIZ1699	pGADT7-s3	Este estudio
pIZ1700	pGADT7-s5	Este estudio
pIZ1702	pGADT7-s14	Este estudio
pIZ1707	pGADT7-s16	Este estudio
pIZ1708	pGEX-4T-1-ERdj3	Este estudio
pIZ1712	pGEX-4T-1-Trx	Este estudio
pIZ1720	pCS2-SlrP-3xFlag	Este estudio
pIZ1721	pCS2-3xHA-Trx	Este estudio
pIZ1725	pcDNA3-SlrP-3xFlag	Este estudio
pIZ1727	pGEX-4T-1-Trx(CS)	Este estudio
pIZ1729	pCS2-ERdj3xHA	Este estudio
pIZ1750	pQE30-Trx	Este estudio
pIZ1757	pGEX-4T-3-SlrP(C546A)	Este estudio
pIZ1776	pQE30-SlrP	Este estudio
pIZ1780	pcDNA3-SlrP(C546A)-3xFlag	Este estudio
pIZ1782	pQE30-N-SlrP (1-140)	Este estudio
pIZ1784	pQE30-SlrP-C (141-765)	Este estudio
pIZ1791	pGADT7-ERdj3(23-358)	Este estudio
pIZ1792	pGADT7-ERdj3(88-358)	Este estudio
pIZ1793	pGADT7-ERdj3(129-358)	Este estudio
pIZ1794	pGADT7-ERdj3(160-358)	Este estudio
pIZ1795	pGADT7-ERdj3(201-358)	Este estudio
pIZ1796	pGADT7-ERdj3(251-358)	Este estudio
pIZ1797	pGEX-4T-1-ERdj3(23-358)	Este estudio
pIZ1798	pGEX-4T-1-ERdj3(88-358)	Este estudio
pIZ1799	pGEX-4T-1-ERdj3(129-358)	Este estudio
pIZ1800	pGEX-4T-1-ERdj3(160-358)	Este estudio
pIZ1801	pGEX-4T-1-ERdj3(201-358)	Este estudio
pIZ1802	pGEX-4T-1-ERdj3(251-358)	Este estudio
pIZ1804	pGBT10-SlrP(C546A)	Este estudio

pKD46	Amp ^r , termosensible	Datsenko y Wanner, 2000
pQE10-BiP	pQE10-BiP	L. Hendershot
pREP4	Kan ^r <i>lacI^q</i>	Qiagen
pSUB11	Kan ^r , 3xFlag	Uzzau et al. 2001

El prefijo pIZ está registrado a nombre de J. Casadesús en el Plasmid Referente Center, Universidad de Stanford, California.

3.2 Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*

Para la extracción de ADN plasmídico se siguió el protocolo de lisis alcalina (Birnboim, 1983; Sambrook, 1989), con ligeras modificaciones. No se empleó lisozima por resultar innecesaria para la lisis bacteriana e incapaz de aumentar el rendimiento. Habitualmente se realizaron minipreparaciones de 3 ml de cultivo en microtubos. Las células se recogieron tras dos centrifugaciones sucesivas en una microcentrífuga de sobremesa a 13000 rpm durante 30 segundos. El sedimento se resuspendió en 100 µl de GTE (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se lisó con 200 µl de NaOH 0,2 N, SDS 1%, y se incubó 5 minutos en hielo. Se neutralizó con 150 µl de acetato potásico 3 M, ajustado a pH 4,8 con ácido acético, y se incubó al menos 10 minutos en hielo. Los restos celulares se sedimentaron por centrifugación a 13000 rpm durante 5 minutos en una microcentrífuga. El sobrenadante se transfirió a otro tubo, se extrajo con igual volumen de fenol-cloroformo-isoamílico (25:24:1) hasta conseguir una interfase limpia y se precipitó con 2-2,5 volúmenes de etanol al 96%. Tras incubar 30 minutos como mínimo a -20°C, se centrifugó 15 minutos en una microcentrífuga a 13000 rpm. El precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 70%, se centrifugó 1 minuto en las mismas condiciones, se secó al vacío y se resuspendió en 20-50 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8) o agua bidestilada.

3.3 Extracción de ADN plasmídico para secuenciación

Se usó el sistema comercial *High Pure Plasmid Isolation Kit* suministrado por Roche Diagnostics GmbH o el sistema comercial *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit*, de Sigma-Aldrich Co, siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

3.4 Extracción de ADN plasmídico de *S. cerevisiae*

Se centrifugan 1,5 ml de un cultivo saturado de la estirpe portadora del plásmido. Se resuspende el sedimento en 100 µl de TE, 200 µl de solución de lisis (Tritón X-100 2%, SDS 1%, NaCl 0,1 M, Tris 0,01 M pH 8, EDTA 0,001 M), 200 µl de fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1 y se mezcla con 0,3 g de bolas de cristal (0,45 mm de diámetro). Se agita en un vórtex durante 2 minutos y tras centrifugar, se pasa la fase acuosa a un nuevo tubo, al que se le añaden 0,1 volúmenes de acetato potásico 5 M y 2 volúmenes de etanol 100% frío. Se incuba a temperatura ambiente 2 minutos y se centrifuga durante 5 minutos. Se observa un pequeño sedimento que se deja secar tras lavar con etanol 70%. Una vez seco se resuspende el ADN en 50 µl de agua bidestilada.

3.5 Digestión, modificación y ligación de fragmentos de ADN

Las endonucleasas de restricción se obtuvieron de las compañías Roche Diagnostics GmbH, New England Biolabs y Promega Biotec. En cada caso se siguieron las recomendaciones de los fabricantes.

Para la desfosforilación de plásmidos se empleó fosfatasa CIP (*Calf Intestine Phosphatase*, Roche). Se mezclaron 1-20 pg de ADN cortado y 1 U de CIP en el tampón de la fosfatasa alcalina y se incubó durante 60 minutos a 37°C. Se detuvo la reacción calentando a 75°C durante 10 minutos, o bien añadiendo un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), agitando enérgicamente y separando las dos fases por centrifugación a 15000 g durante 5 minutos.

Para ligar fragmentos de ADN se usó una unidad de ADN ligasa de T4 (Roche Diagnostics) en el tampón suministrado por el fabricante. Habitualmente la mezcla se incubó un mínimo de 12 horas a 16°C.

3.6 Electroforesis de ADN en gel de agarosa

La electroforesis en un gel de agarosa sumergido en tampón TAE (Tris-acético 40 mM, EDTA 10 mM, pH 7,7) se empleó para comprobar la eficiencia de las extracciones de ADN, determinar el perfil de fragmentos tras

la digestión de plásmidos, estimar la eficacia de la digestión con una endonucleasa, etc.

La agarosa empleada fue de baja electro-endosmosis (Pronadisa) y su concentración varió entre el 0,6 y el 2 % dependiendo de la gama de tamaños de los fragmentos que se pretendía separar. El tampón de carga utilizado fue una solución de azul de bromofenol al 0,125% y Ficoll 400 al 12,5%.

Como patrón de peso molecular se empleó la escalera de 1 kb (GIBCO, BRL, Life Technologies). Las muestras se mezclaron con 1/6 de volumen de tampón de carga. Para hacer visibles las bandas, se añadió bromuro de etidio al gel, a una concentración final de 0,5 µg/ml. Los geles se iluminaron con un transluminador de radiación ultravioleta y se fotografiaron empleando una película instantánea Polaroid ISO 3000/36 o se registraron con un analizador de imagen (ImageStore 5000, Ultra Violet Products).

3.7 Aislamiento de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

Se usó el sistema comercial *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, suministrado por Amersham Biosciences, o el sistema comercial *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System*, suministrado por Promega Corporation.

3.8. Cebadores

Los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las reacciones de secuenciación fueron sintetizados por Invitrogen. Los oligonucleótidos usados en esta tesis se muestran en la **Tabla M.4**.

Tabla M.4. Oligonucleótidos

Oligonucleótido/uso	Secuencia 5'-3' (las dianas de restricción están subrayadas)
Etiquetado de SlrP con el epitopo 3XFLAG	
slrpflag5'	GAAAAAAGAGGTGAGCTCGCTCATGAGCGCCTACTGGCGAGA CTACAAAGACCATGACGG
slrpflag3'	TAAACAGGGCTCTCTCCCTCTTCTGATAAACTGCGTTG CATATGAATATCCTCCTTAG
Construcción de pIZ1623	
slrpgst5'	GTCAGAATTCTATGTTTAATATTACTAATATACAATC
slrpgst3'	TATAGTCGACTTCTGATAAACTGCGTTCAG
Construcción de pIZ1627	
slrpkt7	GTCAGAATTCATGTTTAATATTACTAATATACAATC
slrpgst3'	TATAGTCGACTTCTGATAAACTGCGTTCAG
Construcción de pIZ1720	
slrpbam5'	CTGAGGATCCACCATGTTTAATATTACTAATATACAATC
slrpflagxba3'	CTGATCTAGATTACTATTTATCGTCGTCATC
Mutagenesis de slrP	
slrpC546Adir	GATGAATGCAACGATAAGCGCTGAAGATCGGGTCACAC
slrpC546Arev	GTGTGACCCGATCTTCAGCGCTTATCGTTGCATTCATC
Secuenciación de slrP	
slrpnrev	CTAGCAGTCACGCATCCGTTGTAC
slrp1701	GGTTCTGCCTGAAACACTTC
slrp1830rev	ACGGACCAGGTTATTGCGAG
slrpc	GATGCTGAAAGAGGCGCCTTTG
Construcción de pIZ1725	
slrPpcdna5'	GTCAGAATTCGCCGCCACCATGTTTAATATTACTAATATA CAATC
slrPflagxba3'	CTGATCTAGATTACTATTTATCGTCGTCATC
Secuenciación de clones del 2H y derivados del pGADT7	
T7	TAATACGACTCACTATAGGG
Construcción de pIZ1712	
trx5'	GTCAGAATTCATGGTGAAGCAGATCGAGAG
trx3'	CTGACTCGAGATAGCCAATGGCTGGTTATG
Mutagénesis de trx	
trxcdir	CTCAGCCACGTGGTCTGGGCCCTCCAAAATGATCAAGCC
trxcrev	GGCTTGATCATTTTGGAGGGCCAGACCACGTGGCTGAG
Construcción de pIZ1721	
trx5'	GTCAGAATTCATGGTGAAGCAGATCGAGAG
trxxba3'	CTGATCTAGAATAGCCAATGGCTGGTTATG
Construcción de pIZ1708	
dnaj5'	ATGCGAATTCATGGTCCGCAGAACCTGAG
dnaj3'	TGACCTCGAGGTCCAATTTTATCACTCTC
Construcción de pIZ1729	
3HA5'	ATCGCTCGAGTACCCATACGATGTTCC
3HA3'	TGCATCTAGATCAGCCAGCGTAGTCTGGTAC
dnajBam5'	CTGAGGATCCACCATGGCTCCGCAGAACCTGAG
dnajXho3'	TGACCTCGAGATATCCTTGCAGTCCATTGTATAC
Construcción de pIZ1750	
trxpqe30Bam5'	CTGAGGATCCATGGTGAAGCAGATCGAGAG
trx3'	CTGACTCGAGATAGCCAATGGCTGGTTATG
Construcción de pIZ1776	
slrppqe5'	CTGAGGATCCTTTAATATTACTAATATACAATCTACG
slrpgst3'	TATAGTCGACTTCTGATAAACTGCGTTCAG
Construcción de pIZ1782	
slrppqe5'	CTGAGGATCCTTTAATATTACTAATATACAATCTACG

slrp140SalIrev	CATGGT <u>CGACCTAGCCGGAAGCGCTACTCGCCTG</u>
Construcción de pIZ1782	
slrp140bamdir	CATGGGATCCTCCAAAGATGCTGTGAATTATG
slrpgst3'	TATAGTCGACTTCTGATAAACTGCGTTCAG
Construcción de pIZ1791 y pIZ1797	
dnaj23eco5'	CATGGAATTCGACGAGATTCTATAAGATC
dnaj3'	TGACCTCGAGGTCCAATTTTATTCACTCTC
Construcción de pIZ1792 y pIZ1798	
dnaj88eco5'	CATGGAATTCACTTATGGTGAAGAAGGATTA AAAAG
dnaj3'	TGACCTCGAGGTCCAATTTTATTCACTCTC
Construcción de pIZ1793 y pIZ1799	
dnaj129eco5'	CATGGAATTC CCAAGAGGAAGT GATATTATTG
dnaj3'	TGACCTCGAGGTCCAATTTTATTCACTCTC
Construcción de pIZ1794 y pIZ1800	
dnaj160eco5'	GATCGAATTCGCAAGGCAGGCTCCTGGCAAAC
dnaj3'	TGACCTCGAGGTCCAATTTTATTCACTCTC
Construcción de pIZ1795 y pIZ1801	
dnaj201eco5'	CATGGAATTCCTAGTGAATGAAGAACGAAC
dnaj3'	TGACCTCGAGGTCCAATTTTATTCACTCTC
Construcción de pIZ1796 y pIZ1802	
dnaj251eco5'	CATGGAATTC TTGAAAGGAGAGG GATGATTG
dnaj3'	TGACCTCGAGGTCCAATTTTATTCACTCTC
Secuenciación de derivados del pGEX	
pgex5'	GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG
pgex3'	CCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGG

3.9 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En las reacciones de amplificación se usó un termociclador *Thermal Cycler 480* (Perkin Elmer Cetus), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de PCR se realizaron con 1 ng de ADN, dNTPs 100 μ M cada uno, cebadores 1 μ M, 1 U de polimerasa *Taq* por reacción, y una concentración final de $MgCl_2$ de 1 mM en un volumen de 50 μ l. Según la finalidad de la PCR se usaron dos tipos de polimerasa *Taq*: *Taq ExpandTM High Fidelity PCR System*, suministrada por Roche Diagnostics, y *EcoTaq*, suministrada por Ecogen.

Para la comprobación de algunos clones se llevaron a cabo reacciones de PCR a partir de colonias. En estos casos se preparó una mezcla con dNTPs 100 μ M cada uno, cebadores 0,2 μ M, 1 U de polimerasa *Taq* por reacción, y una concentración final de $MgCl_2$ de 1 mM en un volumen de 25 μ l. En esta mezcla se resuspende una colonia.

Antes de usar los productos de PCR se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa y se limpiaron de proteína, oligonucleótidos y dNTPs,

mediante un sistema comercial de purificación de bandas (**apartado 3.7**).

3.10 Mutagénesis dirigida

Se construyeron mutantes puntuales de las proteínas SlrP, en la que se cambió la cisteína de la posición 546 por una alanina (SlrP(C546A)); y de la Trx, en la que se cambiaron las cisteínas de las posiciones 32 y 35 por dos serinas (TrxCS). Para ambos casos se usó el sistema *QuickChange II Site-directed Mutagenesis Kit* (Stratagene).

3.10.1 Mutagénesis de *trx*

Se diseñaron los oligonucleótidos *trxcmdir* y *trxcsrev* (**Tabla M.4**), que contenían los nucleótidos que se querían cambiar para generar las mutaciones, y se usaron como cebadores para amplificar por PCR la nueva secuencia mutada de *trx*. Al introducir los cambios en la secuencia se creó una diana de restricción para la enzima *ApaI*, lo cual facilitó la detección de los clones que habían adquirido la mutación. Como molde de ADN para la PCR se usó el plásmido pIZ1712 (pGEX4T-1-Trx). El fragmento de ADN obtenido se trató con la enzima de restricción *DpnI* durante 1 hora a 37°C, para eliminar los restos de ADN molde. Esta enzima corta ADN en la diana GATC sólo si está metilado. Éste será el caso del ADN molde pero no del sintetizado en la PCR. Posteriormente se usó 1 µl de ADN tratado con *DpnI* para transformar la estirpe de *E. coli* DH5α. Se seleccionaron los transformantes en medio LB suplementado con Amp. Se usó la enzima *ApaI* para identificar los candidatos positivos comparando el patrón de restricción del ADN plasmídico de los transformantes con el del plásmido original, al cortar con dicha enzima.

3.10.2 Mutagénesis de *slrP*

Para la mutagénesis de *slrP* se usaron los oligonucleótidos *slrPC546Adir* y *slrPC546Arev*. El procedimiento es el mismo que en el caso anterior, salvo dos detalles. Una diferencia es que en este caso se usó como

ADN molde el plásmido pIZ1623, para crear el mutante GST-SlrP(C546A) o el plásmido pIZ1725 para crear el mutante SlrP(C546A)-3xFlag. Otra diferencia, respecto a la mutagénesis anterior es que en este caso el punto de corte que se creó al incorporar la mutación fue para la enzima *AfeI*.

3.11 Secuenciación

El ADN plasmídico o el ADN cromosómico amplificado por PCR fue secuenciado en el servicio de secuenciación de Sistemas Genómicos S.L. (Parque Tecnológico de Valencia, Paterna) o por el secuenciador automático de ADN de Stab Vida (Oeiras, Portugal).

3.12 Análisis y comparación de secuencias

El análisis informático de secuencias de nucleótidos se realizó empleando algoritmos de biología molecular del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) en www.ncbi.nlm.nih.gov y el *European Bioinformatics Institute* (EBI) en www.ebi.ac.uk.

3.13 Transformación

3.13.1 Transformación de E. coli con alta eficiencia

Se prepararon células competentes según una variante del método de Inoue y colaboradores (Inoue et al., 1990), que permite una alta frecuencia de transformación (habitualmente, entre 5×10^7 y 5×10^8 transformantes por μg de ADN plasmídico). Un cultivo saturado de la estirpe receptora (habitualmente DH5 α) se diluyó 100-1000 veces en 200 ml de medio SOB. Se incubó con agitación a 22°C hasta alcanzar una DO_{600} aproximada de 0,5. El cultivo se transfirió rápidamente a hielo y se incubó durante 10 minutos. Las células se recogieron por centrifugación a 2500 g a 4°C durante 10 minutos. El sedimento se resuspendió en 20 ml de TB frío. Se añadieron otros 60 ml de TB frío y se incubó 10 minutos en hielo. Se recogieron las células en las mismas condiciones y se resuspendieron en 20

ml de TB frío. Se añadió 1,5 ml de DMSO y, tras incubar 10 minutos en hielo, se hicieron alícuotas de 0,4 y 1 ml, que se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C . Las células así preparadas mantienen su competencia durante varios meses.

Para la transformación, una alícuota de células competentes se mezcló con la preparación de plásmido, y se incubó en hielo durante 5-15 minutos. A continuación, la mezcla se sometió a choque térmico a 42°C durante 45 segundos, se enfrió en hielo y se añadió 1 ml de LB. La mezcla se incubó a 37°C durante 1 hora, se concentró en 100 μl y se sembró en una placa de medio selectivo.

Medio SOB: 20 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 0,5 g/l de NaCl y 5 ml de KCl de una solución a 250 mM; se llevó hasta pH 7,0 con NaOH 10 M, se autoclavó y se le añadieron 5 ml de MgCl_2 2 M.

Tampón TB: PIPES (ácido libre) 10 mM, CaCl_2 15 mM, KCl 250 mM, llevado todo ello a pH 6,7 con KOH. Se añade MnCl_2 (concentración final: 55 mM) y se esteriliza por filtración.

3.13.2 Electroporación en *E. coli* y *S. enterica*

El método es el mismo para ambas especies: de un cultivo saturado reciente se toman 0,2 ml y se inoculan en 10 ml de LB. Se cultiva a 37°C con agitación. Cuando ha llegado a fase exponencial, las células se recogen por centrifugación (30 segundos a 13000 rpm). En muchos casos también se obtienen buenos resultados con cultivos en fase estacionaria temprana. A continuación, las células se resuspenden en 5 ml de glicerol al 10% frío y estéril. La suspensión se agita en el vórtex y se centrifuga durante 30 segundos en la microcentrífuga. Se repite la operación y las células se resuspenden en 2 ml de glicerol al 10%, frío y estéril. Se vuelven a recoger las células por centrifugación y se resuspenden en 500 μl de glicerol al 10%, frío y estéril. La suspensión se agita en el vórtex y se centrifuga durante 30 segundos en la microcentrífuga. Por último se resuspende en 120 μl de glicerol al 10%, frío y estéril, y se coloca en hielo hasta el momento de usarla. Con este procedimiento se obtienen células electrocompetentes para dos electroporaciones; si se quieren volúmenes mayores, se pueden aumentar proporcionalmente las cantidades. La electroporación propiamente

dicha se realiza mezclando 3,5 μ l de ADN plasmídico con 50 μ l de células electrocompetentes y transfiriendo la mezcla a una cubeta previamente enfriada. A continuación se somete a una descarga eléctrica en el electroporador (25 μ F, 200 ohmios y 2,5 kV). El electroporador empleado fue un *Electrocell Manipulator 600* fabricado por BTX. Se añade 1 ml de LB a la cubeta y la mezcla se transfiere a un tubo de ensayo, que se agita a 37°C durante 1 hora. Tras la incubación, las células se recogen por centrifugación y se siembran en medio selectivo.

3.13.3 Transformación de levaduras

Se realizó siguiendo el método descrito por Ito (Ito et al., 1983) y modificado por Gietz (Gietz et al., 1992). Las células competentes se obtuvieron a partir de cultivos de *S. cerevisiae* incubados en 100 ml de YPD hasta una DO₆₀₀ de 0,4-0,6 (para tener unas 2x10⁷ células/ml). Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con 50 ml de una solución 100 mM de acetato de litio preparado en tampón TE (Tris 10mM, EDTA 1mM, pH 7,5). Tras una nueva centrifugación, las células se resuspendieron en 2 ml de la misma solución y se incubaron durante 1 hora en agitación y a 30°C. Para cada transformación se mezclaron 150 μ l de células competentes, 500 μ l de PEG3350 al 50% en acetato de litio 0,1 M, 4 μ l de ADN de esperma de salmón (10 mg/ml) y 10 μ l de ADN plasmídico. En algunos casos se cotransformaron las levaduras con una mezcla de dos plásmidos. Tras incubación durante 30 minutos a 30°C con agitación, se sometieron las células a un choque térmico de 42°C durante 25 minutos. Se lavaron dos veces con medio rico YPD, tras lo cual se sembraron en un medio mínimo determinado para seleccionar la auxotrofia de interés.

3.14 Transfección de células HeLa

En este estudio se han realizado transfecciones transitorias, cuando interesaba ver el efecto a corto plazo de la expresión de un determinado gen, y transfecciones estables, cuando interesaba estudiar el efecto de la expresión de un gen en la célula de mamífero a medio o largo plazo.

3.14.1 Transfección transitoria

Se utilizaron cultivos celulares subconfluentes, obtenidos generalmente en cajas de 15 cm de diámetro, ya que se precisan unas 5×10^6 células por cada transfección. Las células se despegan con tripsina, se cuentan, se recogen por centrifugación a 1000 rpm durante 10 min y se resuspenden en medio de electroporación (DMEM suplementado con 15 mM de HEPES) a una concentración de 5×10^6 células por cada 200 μ l.

El ADN empleado (de los plásmidos pcDNA3, pCS2+3xHA y sus derivados) se preparó empleando columnas *Pure Yield Plasmid Midiprep System* de Promega. Entre 5 y 10 μ g de este ADN se llevan a 50 μ l de volumen final con agua y NaCl a una concentración de 210 mM. A este ADN se le añaden 200 μ l de las células resuspendidas en medio de electroporación y la mezcla se transfiere a una cubeta de electroporación con una distancia entre placas de 4 mm.

Para la electroporación se emplea un *Electrocell Manipulator 600* fabricado por BTX con las siguientes condiciones: 240 voltios, 720 ohmios y 950 microfaradios. Tras la electroporación las células se transfieren a un tubo con 10 ml de medio de electroporación, se recogen por centrifugación a 1000 rpm durante 10 min, se resuspenden en medio fresco y se cultivan durante 24 horas, momento en que se suele alcanzar la máxima expresión de los ADN transfectados.

3.14.2 Transfección estable

Para las transfecciones estables se usó el vector pcDNA3 o sus derivados que contienen un gen que confiere resistencia a la droga G418, que bloquea la síntesis de proteínas. El protocolo inicial de transfección es el mismo que el del apartado anterior. Entre 24 y 48 h tras la transfección, se despegan las células, se diluyen en medio DMEM suplementado con 1 mg/ml de G418 y se transfieren a una caja de 24 pocillos, de manera que haya inicialmente 100000 células en algunos pocillos, 10000 en otros, y 1000 en los últimos. Como control se llevan también diluciones similares de células que no han sido transfectadas. Periódicamente se refresca el medio (siempre suplementado con G418) hasta que se observa la muerte de la

mayoría de las células en el experimento y de todas las de los controles. Los clones de células resistentes se transfieren a cajas de 6 pocillos y luego a cajas de 10 y 15 cm de diámetro hasta obtener suficientes células para comenzar los análisis de expresión y fenotípicos y para la congelación.

4. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

4.1 Preparación de lisados celulares

Se despegan las células con tripsina y se cuentan usando una cámara de Neubauer. Se recogen por centrifugación durante 10 minutos a 1000 rpm y se lavan dos veces con PBS. El sedimento de células se incuba a 4°C en tampón de lisis NP40 o en tampón de lisis con Tritón X-100 durante 20 minutos. Tras la lisis, los extractos se centrifugan durante 20 minutos a 20000 g y el sobrenadante se almacena a -80°C hasta su uso.

Tampón de lisis NP40: Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, glicerol 10%, NP40 1%, aprotinina 1%, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) 1mM, pepstatina 1 µg/ml y leupeptina 1 µg/ml

Tampón de lisis Tritón X-100: Tris-HCl 25 mM, pH7,5, NaCl 100 mM, glicerol 10%, Tritón X-100 0,5%, EDTA 2.5 mM, aprotinina 1%, PMSF 1mM, pepstatina 1 µg/ml y leupeptina 1 µg/ml

4.2 Obtención de proteínas de fusión con el epitopo 3xFlag en bacterias

Para etiquetar proteínas con el epitopo 3xFlag, se siguió el método de Uzzau y colaboradores (Uzzau et al., 2001). Se trata de una modificación del método de Datsenko y Wanner (Datsenko y Wanner, 2000). El objetivo es manipular una secuencia cromosómica, la secuencia del gen que codifica la proteína que queremos etiquetar, añadiéndole un fragmento de ADN que contiene una secuencia que especifica un epitopo (3XFlag) y una resistencia a antibiótico (Kan). La construcción se genera mediante PCR y transformación. La estrategia se esquematiza en la **Figura M.1**.

Uno de los oligonucleótidos usados en la amplificación, el P1, contiene una secuencia de 40 nucleótidos que se corresponden con los últimos nucleótidos de la parte codificante del gen que se quiere etiquetar sin incluir el codón de parada. El otro, denominado P2, contiene la secuencia de 40 nucleótidos que está a continuación del codón de parada, pero en la cadena

complementaria. El plásmido empleado como molde se llama pSUB11 (**Tabla M.3**), contiene la secuencia del epitopo Flag repetida 3 veces y un gen de resistencia a Kan. El producto de la PCR se somete a una electroforesis y se purifica con un sistema comercial (**apartado 3.7**). El fragmento amplificado y purificado se emplea para electroporar una estirpe de *Salmonella* portadora del plásmido pKD46, que expresa el sistema λ Red bajo el control de un promotor inducible por arabinosa. Esta recombinasa es necesaria para que se produzca la recombinación entre el fragmento de PCR y el cromosoma de la bacteria. El plásmido pKD46 es termosensible y porta un gen que confiere resistencia a Amp. Por todo ello, el mantenimiento del plásmido requiere que los cultivos se hagan a 30°C en presencia de Amp y, además, la expresión de la recombinasa Red requiere la adición de arabinosa al medio.

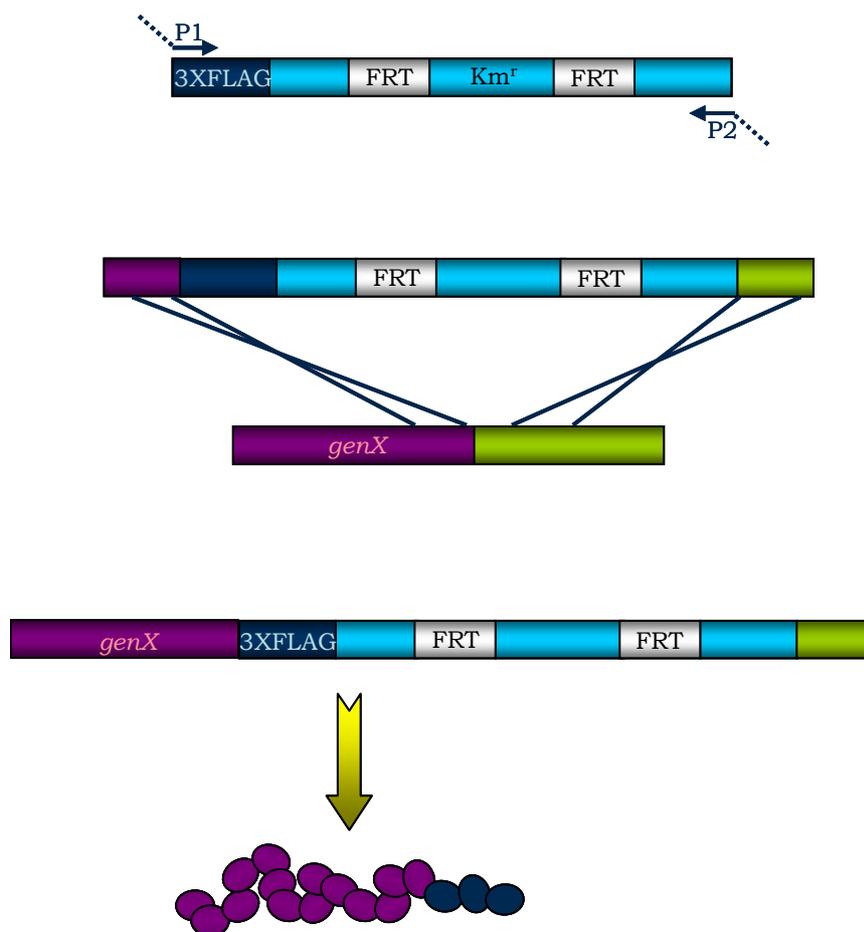


Figura M.1. Construcción de proteínas de fusión con el epitopo 3xFlag

Por tanto, para la obtención de células electrocompetentes, inóculos de la estirpe de *Salmonella* portadora de pKD46, cultivados a 30°C en LB con Amp se diluyeron 1:100 en 50 ml de SOB sin magnesio con 1 mM de arabinosa y se incubaron a 30°C en agitación hasta una DO₆₀₀ de 0,5. Las células se recogieron por centrifugación durante 15 minutos a 4000 rpm a 4°C y se resuspendieron en 20 ml de glicerol al 10% frío. Posteriormente se centrifugó de nuevo 15 minutos a 4000 rpm a 4°C y el sedimento se resuspendió en 10 ml de glicerol al 10% frío. Tras una nueva centrifugación se resuspendió en 5 ml de glicerol al 10% frío. Las células se centrifugaron de nuevo, el sobrenadante se eliminó completamente usando una trampa de agua y las células se resuspendieron en 500 µl de glicerol al 10% frío. Alícuotas de 100 µl de células se mezclaron con 10 µl de ADN y se sometieron a una descarga eléctrica en el electroporador (25 µF, 200 Ω y 2,5 kV). El electroporador empleado fue un *Electrocell Manipulator 600* (BTX). Posteriormente se añadió 1 ml de LB a la cubeta y la mezcla se transfirió a un tubo de ensayo, que se agitó a 37°C durante 1,5 horas. Tras la incubación, las células se recogieron por centrifugación y se sembraron en medio LB suplementado con kanamicina. La correcta incorporación del fragmento amplificado se comprobó por PCR con otra pareja de oligonucleótidos externos, y por western blot usando anticuerpos monoclonales anti-Flag.

4.3. Purificación de proteínas de fusión por cromatografía de afinidad

Se emplearon dos sistemas: el sistema de la glutatión-S-transferasa (GST) y el sistema de las 6 histidinas. En ambos casos, la proteína de fusión se purifica por afinidad a una matriz de agarosa, que en el caso del sistema GST contiene glutatión, y en el caso de las 6 histidinas contiene iones de níquel.

4.3.1 Sistema GST

Se usaron los vectores pGEX-4T-1, pGEX-4T-3 o sus derivados, que expresaban la proteína GST o alguna proteína de interés en fusión con GST, respectivamente. Se transformó la estirpe de *E. coli* BL21(DE3) con los plásmidos mencionados.

Un cultivo saturado de dicha estirpe que contenía el plásmido de interés se diluyó 100 veces en 250 ml de medio rico 2xYT suplementado con Amp y se incubó a 37°C hasta DO₆₀₀ 0,6-0,8. En ese momento se indujo la expresión de la proteína mediante la adición al cultivo de isopropil-β-D-tiogalactósido (IPTG) a 1 mM de concentración final, durante 4 horas a 37°C. Se recogieron las bacterias mediante centrifugación a 8000 rpm durante 10 minutos y se lisaron en 10 ml de tampón de lisis NP40 suplementado con inhibidores de proteasas mediante sonicación con un sonicador Branson modelo 250, durante 3 minutos al 30% de amplitud. Se separó la fracción soluble (sobrenadante) de la insoluble (precipitado) mediante centrifugación a 10000 rpm durante 30 minutos y a 4°C. Se incubó 1 ml de la fracción soluble con 100 μl de una matriz en suspensión de agarosa con glutatión, equilibrada previamente con tampón de lisis, durante 2 horas, a 4°C y en un agitador orbital. Tras la incubación se lavó cinco veces con tampón de lisis y se resuspendió en 100 μl del mismo tampón. Se usaron 5 μl para la detección de la proteína purificada mediante electroforesis en condiciones desnaturalizantes en gel de poliacrilamida seguida de tinción con azul de Coomassie.

Para la elución se incubó una fracción de proteína purificada e inmovilizada en la matriz de agarosa-glutatión con un volumen de tampón de elución (glutatión reducido 10 mM, Tris-HCl 50 mM, pH 8), durante 2 horas, a 4°C y en agitación en un agitador orbital. La fracción de proteína eluida se separó de la matriz de agarosa mediante centrifugación.

4.3.2 Sistema de las 6 histidinas

Se usaron derivados del vector pQE30 que expresaban las proteínas de interés etiquetadas en su extremo amino terminal con un péptido de 6 histidinas. Dichas fusiones se expresaron en la estirpe de *E. coli* M15 que contenía el plásmido pREP4. Este plásmido codifica el represor LacI^q. En este estudio se realizaron purificaciones a pequeña escala, en las que se usaron iones metálicos de níquel unidos a una matriz de agarosa en suspensión (Ni-NTA, Qiagen), y purificaciones a gran escala, en las que se usó una matriz de agarosa con iones de níquel empaquetada en una columna de 1 ml (Sigma).

4.3.2a Purificación a pequeña escala

Se indujo la expresión de la proteína de fusión a 6-His tras la adición al cultivo de 1mM de IPTG. A las 4 horas de inducción se recogieron las células por centrifugación (10 minutos a 8000 rpm) y se lisaron mediante sonicación en tampón de lisis NP40 en un volumen final de 1 ml. Se separó la fracción soluble de la insoluble mediante centrifugación (30 minutos a 13000 rpm). Se incubó la fracción soluble con 50 µl de una matriz de agarosa con níquel (Ni-NTA, Qiagen) a 4°C en un agitador orbital. Tras varios lavados con tampón de lisis fosfato, se resuspendió la matriz en 100 µl del mismo tampón. Se separaron las proteínas de la matriz hirviendo las muestras durante 5 minutos en tampón de Laemmli y se sometieron a SDS-PAGE y tinción con azul de Coomassie.

Tampón de lisis fosfato: NaH₂PO₄ 50 mM pH 8, NaCl 300 mM, glicerol 10%, NP40 1%, aprotinina 1 µg/ml, pepstatina 1 µg/ml, leupeptina 1 µg/ml, PMSF 1mM e imidazol 10 mM.

4.3.2b Purificación a gran escala

Se indujo la expresión de la proteína en un litro de cultivo con 1 mM de IPTG durante 4 horas. Tras la inducción se recogieron las bacterias y se pesó el sedimento. Se lisaron las bacterias en tampón de lisis A (10 ml por gramo de sedimento) suplementado con un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma) mediante sonicación con un sonicador S-4000 (MISONIX

ultrasonic liquid processors) al 30 % de amplitud con 12 impulsos de diez segundos cada uno. Tras la sonicación se añadió al extracto 1 unidad de nucleasa benzonasa que degrada los ácidos nucleicos liberados tras la lisis celular y evita que el extracto se vuelva viscoso. Esta enzima necesita para su actividad un ion divalente, por tanto se suplementa la solución con $MgCl_2$ 2 mM. Los extractos solubles obtenidos tras centrifugación se someten a un proceso de purificación en dos pasos. En primer lugar, se lleva a cabo una cromatografía de afinidad por iones de níquel inmovilizados. Para ello se usaron 2 columnas de 1 ml (Sigma) puestas en serie. Las proteínas se eluyeron en tampón de elución y se sometieron a un paso adicional de purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaño en una columna de filtración en gel HR26/60 Superdex S75 (S200 para SlrP-C) equilibrada con tampón B. Los dos pasos de purificación se realizaron a 6°C en un AKTA de la casa comercial GE Healthcare. El software necesario para la ejecución de los distintos pasos de la purificación fue el UNICORN 5.01. Las fracciones eluidas se analizaron mediante SDS-PAGE y las proteínas purificadas se agruparon y se concentraron mediante ultrafiltración por centrifugación, se dividieron en alícuotas y se almacenaron a -80°C tras congelarlas en nitrógeno líquido. En el caso de Trx fue necesario añadir β -mercaptoetanol 5 mM a los tampones para tener una muestra de Trx homogéneamente reducida tras la cromatografía por exclusión molecular por tamaño. El agente reductor también se añadió al tampón B de N-SlrP y SlrP-C para facilitar los experimentos de ITC.

Tampón de lisis A: Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 300 mM.

Tampón de elución: Tampón de lisis A + imidazol 300 mM.

Tampón B: Tris-HCl 20 mM pH 7,5, NaCl 150 mM, β -mercaptoetanol 5 mM.

4.4 Cuantificación de proteínas

Se empleó el sistema comercial *Bio-Rad Protein Assay Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante.

4.5 Electroforesis de proteínas

Las proteínas se separan por su peso molecular mediante un sistema discontinuo comúnmente conocido por SDS-PAGE (de electroforesis en gel de poliacrilamida y SDS) descrito originalmente por Laemmli (Laemmli, 1970). Las muestras, en un sistema vertical Mini Protean® III (Bio-Rad), se empaquetan primero en un gel de empaquetamiento de 1 cm de longitud, para separarse a continuación en un gel de separación de unos 5 cm de longitud. Se usaron geles de separación al 10, 12 ó 15% de acrilamida, según el tamaño de las proteínas que se querían separar, con un gel de empaquetamiento al 4%. La electroforesis en los equipos Mini Protean® III se realiza aplicando un campo eléctrico de unos 175 V de 45 a 60 minutos.

Las muestras se mantienen en hielo en todo momento y antes de someterlas a la electroforesis se les añade tampón de carga hasta una concentración 1x, se hierven durante 5 minutos y se centrifugan a 15000 g durante varios segundos. El sobrenadante se carga en el gel de electroforesis. Como patrón de peso molecular se utiliza un marcador comercial (*SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range* o *Prestained SDS-PAGE Standards Broad Range*, Bio-Rad).

Gel de empaquetamiento: Tris-HCl 125 mM a pH 6,8, SDS 0,1 % (p/v), acrilamida:bisacrilamida al 40% (SOLU GEL 29:1 ULTRA PURA, PRONADISA), TEMED 0,1% (v/v), persulfato amónico 0,05% (p/v).

Gel de separación: Tris-HCl 375 mM a pH 8,8, SDS 0,1 % (p/v), acrilamida:bisacrilamida al 40% (SOLU GEL 29:1 ULTRA PURA, PRONADISA), TEMED 0,05% (v/v), persulfato amónico 0,05% (p/v).

Tampón de migración 10X: Glicina 144,1 g/l, SDS 10 g/l y Tris 30,3 g/l. Ajustar el pH a 8,8.

Tampón de Laemmli para la muestra (SB 4X): Azul de bromofenol 0,000125%, Tris-HCl pH 6,8 200 mM, β-mercaptoetanol 20%, glicerol 40% y SDS 8%.

4.6 Tinción de geles con azul de Coomassie

Para teñir un gel proveniente de SDS-PAGE se utiliza el colorante Coomassie Brilliant Blue R-250 (Sigma). Para ello, se baña el gel en la solución de tinción durante 30 minutos. A continuación, se retira dicha

solución y se añade solución de destinción, manteniéndose hasta que las bandas correspondientes a las proteínas se visualizan claramente.

Para conservar el gel una vez desteñado, se lava con agua destilada y se introduce entre dos fragmentos de celofán previamente empapados en agua. A continuación se eliminan todas las burbujas. Después se somete a vacío a 70°C sobre un papel Whatman 3MM, o bien se deja secar sobre una superficie plana a la que se sujetan los extremos del papel celofán mediante pinzas.

Solución de tinción: Coomassie Brilliant Blue R-250 0,25% (p/v) (Sigma), ácido acético 7% (v/v) y metanol 45% (v/v).

Solución de destinción: ácido acético 10% (v/v) y metanol 40% (v/v).

4.7 Inmunodetección de proteínas mediante western

Las proteínas, sometidas a SDS-PAGE, se transfieren a un filtro de nitrocelulosa (*Amersham Hybond-ECL*, GE Healthcare) usando un sistema de transferencia húmeda (*Trans-Blot cell*, Bio-Rad). El gel se pone en contacto con la membrana de nitrocelulosa y el conjunto se rodea con papel Whatman 3MM, impregnado en tampón de transferencia, antes de introducirlo en el tanque de electroforesis. La transferencia se realiza aplicando un voltaje constante de 80 V durante 1,5 h. Para evitar un aumento excesivo de temperatura la cubeta se introduce en un recipiente con hielo.

Después de la transferencia, la membrana se lava 2 veces con agua destilada, se tiñe con rojo Ponceau S (0,5% p/v en 1% de ácido acético) durante 5 minutos y se lava de nuevo con agua destilada hasta la aparición de bandas.

Previamente a la incubación con los anticuerpos, las membranas de nitrocelulosa se saturan con tampón de bloqueo durante, al menos, 30 min a temperatura ambiente en agitación suave, o toda la noche a 4°C. Luego se añade el anticuerpo primario, diluido adecuadamente en tampón de bloqueo, y se incuba 2 h a temperatura ambiente o toda la noche a 4°C. Los anticuerpos primarios usados en este estudio se presentan en la **Tabla M.5.**

A continuación se realizan 3 lavados de 10 minutos cada uno con tampón TBS-Tween y, posteriormente, se incuba con el anticuerpo secundario durante 1 h en agitación a temperatura ambiente. Se usaron anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa (**Tabla M.5**). Se lavó nuevamente con TBS-Tween, 6 lavados de 5 minutos cada uno.

Finalmente, se realizó la reacción de detección usando el *SuperSignal® West Pico Chemiluminiscent Substrate* (Pierce Biotechnology, Inc), un sustrato muy sensible para detectar la peroxidasa de rábano (HRP).

Tampón de transferencia 4x: Tris base 12,1 g/l, glicina 57,6 g/l. El tampón de transferencia 1x lleva además 20% de metanol y 0,04% de SDS.

TBS-Tween 10x: Tris base 24,2 g/l, NaCl 80 g, Tween-20 10 ml. Ajustar el pH final a 7,6.

Tampón de bloqueo (TBS-Tween 1x-leche): leche desnatada en polvo 5% (p/v) y azida sódica 0,02 % en TBS-Tween 1x.

4.8 Anticuerpos empleados

Los anticuerpos empleados en este trabajo, sus usos y diluciones se recogen en la **Tabla M.5**.

Tabla M.5. Anticuerpos

Anticuerpo	Tipo	Origen	Uso y dilución
Anti-Flag M2	Primario, monoclonal	Sigma	WB 1:5000 IP 1:100
Anti-HA peroxidasa 3F10	Primario, monoclonal	Roche	WB 1:1000
Anti-Trx	Primario, policlonal	Santa Cruz Biotechnology	WB 1:1000 IP 1:100
Anti-ERdj3	Primario, policlonal	Sigma	WB 1:500
Anti-Flag M2 conjugado con Cy3	Primario, monoclonal	Sigma	IF 1:1000
Anti-HA marcado con Alexa Fluor 488	Primario, monoclonal	Covance	IF 1:1000
IgG-peroxidasa anti-ratón	Secundario	Bio-Rad	WB 1:10000
IgG-peroxidasa anti-conejo	Secundario	GE Healthcare	WB 1:10000

WB: western blot; IP: inmunoprecipitación; IF: inmunofluorescencia

5. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA

5.1 Sistema del doble híbrido

Este sistema se emplea para detectar interacciones entre dos proteínas en la levadura *S. cerevisiae*. En este trabajo se ha usado para buscar proteínas humanas capaces de interactuar con el efector de *Salmonella* SlrP. Para ello se introdujo el plásmido pIZ1627 en la estirpe de levadura AH109. Este plásmido es un derivado de pGBT10 que expresa SlrP en fusión con el dominio de unión al ADN del factor de transcripción de levaduras Gal4. Esta estirpe se conjugó con la estirpe Y187 que contenía la genoteca de ADNc de células humanas HeLa, construida en el vector pGADT7, de manera que generara proteínas en fusión al dominio de activación del factor de transcripción Gal4. Para llevar a cabo el escrutinio se inoculó la estirpe AH109 transformada con el plásmido pIZ1627 en 50 ml de SD/-Trp y se cultivó toda la noche a 30°C a 200 rpm. Al día siguiente, cuando el cultivo llegó a una DO₆₀₀ de 1,5, se recogieron las células por centrifugación, dejando unos 5 ml de medio. Se añadieron 500 µl de la genoteca y 40 ml de medio rico YPDA. La mezcla se pasó a un matraz de 2 litros para optimizar la aireación y se incubó durante 20 horas a 30°C y a 40 rpm. Esta velocidad de agitación es la idónea para mantener las levaduras en suspensión y, al mismo tiempo, favorecer la formación de parejas conjugantes. Tras las 20 horas de conjugación el cultivo se centrifugó y el sedimento se lavó dos veces con 2xYPDA. Tras lavar, se resuspendieron las levaduras con 2 ml de agua estéril bidestilada, lo que dio lugar a un volumen final de 3,1 ml. La mezcla de conjugación se sembró en alícuotas de 200 µl en placas de medio SD/-His/-Leu/-Trp de 15 cm de diámetro. Se incubaron las placas a 30°C durante 8 días. Este medio que carece de histidina (además de leucina y triptófano para seleccionar los diploides), se usa para seleccionar los clones positivos, ya que en principio, sólo se activará la expresión de los genes marcadores (entre ellos, *his3*), en el caso de que se dé interacción entre SlrP y una proteína expresada a partir de la genoteca y se aproximen los dos dominios del factor de transcripción Gal4.

Las conjugaciones a pequeña escala se realizaron mezclando una colonia de cada estirpe en un tubo de 1,5 ml que contenía 0,5 ml de medio rico YPD. Se incubó la mezcla toda la noche a 30°C y en agitación a 200 rpm. Tras la incubación se sembraron 100 µl de la mezcla en el medio selectivo apropiado. En el caso de la conjugación entre los candidatos positivos aislados (en la estirpe Y187) y la estirpe AH109 que contenía la proteína cebo, los transconjugantes se seleccionaron en medio mínimo SD que carecía de leucina y triptófano (SD/-Leu/-Trp).

5.1.1 Aislamiento de plásmidos derivados de pGADT7 a partir de los transconjugantes positivos

Después del escrutinio, los plásmidos se aislaron a partir de los clones que crecieron en medio sin histidina siguiendo el protocolo descrito en el **apartado 3.4 de Material y Métodos**. La preparación de plásmidos se usó para transformar la estirpe de *E. coli* DH5α. Las bacterias que resultaron transformadas con derivados de pGADT7 se distinguieron de aquéllas transformadas con pIZ1627 (pGBT10-SlrP) mediante PCR usando cebadores específicos para pGADT7 (T7 y 3'AD).

5.2 Cromatografía de afinidad

Se usó el sistema de purificación de proteínas de fusión a GST por cromatografía de afinidad y el sistema de etiquetado de proteínas con el epitopo 3xFlag, ambos descritos en el **apartado 4**, para realizar un ensayo de copurificación *in vitro*. Se expresaron proteínas de fusión a GST en la estirpe SV5193 (estirpe 14028 de *S. enterica* serovar Typhimurium, que expresa la fusión SlrP-3xFlag). Al purificar las proteínas de fusión a GST y, tras varios lavados, se analizó si SlrP-3xFlag se copurificó junto con ellas mediante inmunoblot, usando anticuerpos monoclonales anti-Flag.

Una variante de este sistema consiste en purificar, por un lado las proteínas de fusión a GST a partir de la estirpe BL21, tal y como se explica en el **apartado 4.3** y, por otro lado, preparar un extracto celular, mediante sonicación en tampón de lisis NP40 de la estirpe SV5193. Luego, se incubó dicho lisado con una fracción de proteínas de fusión a GST inmovilizadas en

una matriz de agarosa glutatión, se lava varias veces y se analiza la interacción mediante western.

En este tipo de experimentos se incluye como control negativo la proteína GST sola para verificar que la interacción no tiene lugar directamente con ésta.

5.2.1 Oxidación de GST-Trx con H₂O₂

Para algunos experimentos de interacción *in vitro* con la fusión GST-Trx, se trató con un agente oxidante según un protocolo descrito anteriormente (Nishiyama et al., 1999). GST-Trx purificada e inmovilizada en una matriz de agarosa-glutatión se trató con 1 mM de H₂O₂ en tampón de lisis NP40 durante 15 minutos a temperatura ambiente y se lavó 6 veces con tampón de lisis NP40. Como control de que el tratamiento con el agente oxidante era algo reversible, una parte de la proteína tratada con H₂O₂, tras efectuar los lavados, se incubó durante 15 minutos con tampón de lisis que contenía 1mM de DTT, un potente agente reductor. Tras los pertinentes lavados, las proteínas se incubaron con los extractos de 10428 *slrP::3xFlag*.

5.2.2 Ensayos de interacción entre ERdj3 y BiP

Los ensayos de interacción se realizaron como estaba descrito (Yu et al., 2000) con algunas modificaciones. Las fusiones GST-ERdj3-1 (con los aminoácidos 23-358 de ERdj3), GST-ERdj3-3 (con los aminoácidos 129-358 de ERdj3) y GST-SlrP se purificaron con una matriz de agarosa-glutatión como se describe en el **apartado 4.3**. Se incubaron 50 µg de la fusión GST-ERdj3-1 o GST-ERdj3-3 inmovilizadas con 50 µg de la fusión 6His-BiP soluble, en presencia o ausencia de ATP 1mM y en presencia o ausencia de 50 µg de la fusión GST-SlrP, en un volumen final de 500 µl de tampón de unión (Tris 20 mM pH7, KCl 100 mM, MgCl₂ 5 mM). La incubación se llevó a cabo durante 2 horas a 4°C y en un agitador orbital. Tras la incubación, la matriz se lavó 5 veces con tampón de unión. Los complejos de proteínas se resolvieron mediante SDS-PAGE y se detectaron mediante tinción con azul de Coomassie.

5.3. Coinmunoprecipitación

Estos experimentos se usan para estudiar la interacción entre dos proteínas *in vivo*. En este estudio se llevaron a cabo dos experimentos de coinmunoprecipitación para confirmar las interacciones encontradas por el sistema del doble híbrido en levaduras entre el efector de *S. enterica* SlrP y las proteínas humanas Trx y ERdj3.

5.3.1 Coinmunoprecipitación de SlrP y Trx

Se cotransfectaron células HeLa con los plásmidos pIZ1720 y pIZ1721 que expresaban las fusiones SlrP-3xFlag y 3xHA-Trx, respectivamente. Se obtuvieron lisados de 9×10^6 células y se incubaron con 20 μ l de proteína A/G unida a agarosa (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 hora a 4°C. Esta incubación sirve para eliminar las proteínas que se unan inespecíficamente. Tras centrifugar, el sobrenadante se incubó durante 2 horas a 4°C con anticuerpos monoclonales anti-Flag (1:100, Sigma), para inmunoprecipitar la fusión SlrP-3xFlag. Como control de la especificidad de la inmunoprecipitación, la misma cantidad de sobrenadante se incubó con suero de ratón no inmunizado (preimmune). Ambos lisados se incubaron durante una noche con proteína A/G unida a agarosa, que sirve para capturar los anticuerpos. La matriz se lavó 5 veces con tampón de lisis NP40. Las proteínas se eluyeron en tampón de Laemmli para la muestra, a 95°C durante 5 minutos y se resolvieron mediante SDS-PAGE. Las proteínas se detectaron mediante western usando anticuerpos anti-Flag y anti-HA-peroxidasa (clon 3F10, Roche).

5.3.2 Coinmunoprecipitación de SlrP y ERdj3

Se cotransfectaron, por un lado, células HeLa con los plásmidos pIZ1720 y pIZ1729 que expresaban las fusiones SlrP-3xFlag y 3xHA-Trx, respectivamente, y, por otro lado, se transfectó el mismo número de células con el plásmido pIZ1729 solo. Se prepararon lisados de 5×10^6 células de ambas transfecciones y se incubaron con 4 μ l de suero preimmune (Santa Cruz Biotechnology) durante 1 hora a 4°C y con 20 μ l de agarosa con

proteína A/G durante 2 horas a 4°C. Tras la incubación, se centrifugaron los lisados y los sobrenadantes se incubaron con 4 µl de anticuerpos monoclonales anti-Flag durante 2 horas a 4°C y luego con 40 µl de agarosa-proteína A/G durante toda la noche. Al día siguiente la matriz se lavó 3 veces con tampón NP40 que contenía desoxicolato sódico al 1% y 300 mM de NaCl, 2 veces con tampón NP40 que contenía desoxicolato sódico al 1% y 150 mM de NaCl y una vez con tampón NP40 que contenía desoxicolato sódico al 1% y 10 mM de NaCl. A partir de aquí, las proteínas se resolvieron del mismo modo que en el apartado anterior.

5.4 Ensayos de unión a tiroglobulina

Para los ensayos de unión de ERdj3 a tiroglobulina se usó el método previamente descrito (Marcus et al., 2007) con algunas modificaciones. La tiroglobulina purificada e inmovilizada en una matriz de agarosa se desnaturalizó en urea 6M y β-mercaptoetanol 1M durante 40 minutos en agitación a temperatura ambiente. La matriz se lavó y se equilibró en tampón NP40. Alícuotas de tiroglobulina desnaturalizada se incubaron con extractos totales de células HeLa transfectadas transitoriamente con un plásmido que expresaba la fusión ERdj3-3xHA. Para estudiar el efecto de SlrP sobre la interacción de ERdj3 con sustratos desnaturalizados, se realizó el ensayo en presencia de un extracto de células HeLa que expresaban la fusión SlrP-3xFlag. Como control negativo se usó proteína A nativa, en lugar de tiroglobulina desnaturalizada.

5.5 Ensayos de ITC (*isothermal titration calorimetry*)

La ITC, calorimetría de titulación isotérmica, es una técnica termodinámica que permite medir directamente el calor desprendido o absorbido en un suceso de interacción entre biomoléculas. La técnica ITC ofrece una medida directa a partir de la estequiometría, de la entalpía de formación y de la constante de unión de los enlaces moleculares de manera que es posible calcular la energía de Gibbs de formación del enlace, representada por ΔG , y por tanto la entropía del proceso:

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T \Delta S$$

donde K es la medida directa de la afinidad de enlace, R es la constante de gases, T la temperatura, ΔH la entalpía y ΔS la entropía.

En un experimento de ITC una solución de una biomolécula se inyecta en una celda que contiene una solución con otra biomolécula. Si ambas moléculas interaccionan se produce un cambio de temperatura (ΔH) que es monitorizado por el sistema. Cada pico representa un cambio de temperatura asociado a la inyección de un pequeño volumen de muestra en la célula. Al ir inyectando cantidades sucesivas de la muestra, el calor absorbido o liberado es directamente proporcional a la cantidad de interacción que se produzca. Los ensayos se realizaron en un calorímetro isotérmico ITC200 (Microcal®) (**Figura M.2**), donde se analizó la posible interacción de dos fragmentos de SlrP con Trx. Por un lado, se usó cada fragmento de SlrP por separado, y por otro lado se usó una mezcla de ambos fragmentos. Todas las proteínas estaban disueltas en el mismo tampón: Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, suplementado con 5 mM de β -mercaptoetanol para mantener el estado reducido de la Trx. Los experimentos se realizaron a 20°C. Se realizaron un total de 20 inyecciones de 2 μ l de una solución de Trx 360 μ M en intervalos de 180 segundos a una celda de 400 μ l que contenía una concentración 30 μ M de SlrP-C, N-SlrP, o bien del complejo N-SlrP/SlrP-C. Los datos experimentales se ajustaron a una curva de titulación teórica usando el programa *ORIGIN* de Microcal. El cambio de entalpía (ΔH), la constante de unión (K_d) y el número de sitios de unión por monómero (n) se consideraron parámetros ajustables, mientras que las concentraciones de proteína se consideraron parámetros conocidos.



Figura M.2. Calorímetro isotérmico ITC200 (Microcal)

6. ENSAYOS DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA

6.1 Ensayos de ubiquitinación *in vitro*

Las reacciones de ubiquitinación se realizaron en un volumen final de 40 μ l que contenía tampón A (Tris-HCl 25 mM, pH 7,5, NaCl 50 mM, ATP 5 mM, MgCl₂ 10 mM, DTT 0,1 mM), 2 μ g de ubiquitina etiquetada con HA (HA-Ub)(Boston Biochem), 0,5 μ g de la proteína humana recombinante E1 (Boston Biochem), y 2 μ g de E2 (proteína humana recombinante UbcH5b de Boston Biochem) en presencia o ausencia de 1 μ g de las fusiones GST-SlrP, GST-SlrP(C546A) o GST-Trx. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 1 hora y se pararon mediante la adición de un volumen de tampón de Laemmli suplementado con DTT 100 mM. Las mezclas de reacción se separaron mediante SDS-PAGE, se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos específicos. Algunas reacciones se inmunoprecipitaron con anticuerpos policlonales anti-Trx (Santa Cruz Biotechnology) y luego se analizaron los inmunoprecipitados mediante inmunoblot.

6.2 Medida de la actividad reductora de la Trx

Los ensayos de medida de la actividad tiorredoxina se llevaron a cabo en cajas de 96 pocillos y se basaron en experimentos descritos previamente (Arner et al., 1999; Luthman y Holmgren, 1982). Para las reacciones, se mezclaron 40 μg de proteína total procedente de extractos celulares con 3,8 μl de Trx reductasa de hígado de rata 1,7 mM (Sigma), 20 μl de una mezcla de solución N (β -NADPH 40 mg/ml) y solución M (HEPES 210 mM, pH 7,6 insulina 790 μM y EDTA 20 mM), en proporción 1:12 y se añadió tampón TE (Tris-HCl 50 mM, pH 7,6, EDTA 20 mM) hasta un volumen final de 50 μl . Como control negativo se incluyó una reacción sin Trx reductasa. Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C durante 30 minutos y se pararon mediante la adición a la mezcla de reacción de 200 μl de ácido nitrobenzoico 1 mM en una solución de guanidina hidrocloreuro 6 M. La absorbancia de las muestras se midió a 412 nm. A los valores obtenidos en las reacciones se les restó el resultado del control negativo.

6.3 Ensayos de actividad ATPasa

Los ensayos de actividad ATPasa se realizaron como estaba previamente descrito (Yu et al., 2000) con algunas modificaciones para adaptar el protocolo a un procedimiento no radioactivo. Las proteínas y fusiones GST, GST-SlrP, GST-ERdj3 y 6His-BiP se purificaron como se ha explicado anteriormente y se dializaron durante toda la noche en el tampón de ensayo de ATPasa (HEPES 50 mM, pH 6,8, NaCl 50 mM, MgCl_2 2 mM). En un volumen final de 100 μl se mezclaron: tampón ATPasa, KCl 20 mM, ATP 20 μM , 1 μg de 6His-BiP y diferentes combinaciones de GST, GST-ERdj3 y GST-SlrP (2,5 μg de cada uno). Como control negativo se incluyó una reacción que no contenía 6His-BiP ni GST. Las reacciones se incubaron a 25°C durante 75 minutos y la concentración de fosfato liberada se midió usando el sistema comercial *Malachite Green Phosphate Assay Kit* (Cayman Chemical) siguiendo las instrucciones del fabricante.

7. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA CELULAR

7.1 Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Para estudiar la localización de proteínas de interés se realizaron experimentos de inmunofluorescencia directa en portaobjetos con cámara permanox Lab-Tek (Nunc). Para estudiar la colocalización del efector SlrP de *S. enterica* y de la proteína humana Trx en la célula hospedadora se cotransfectaron transitoriamente células HeLa con los plásmidos pIZ1720 y pIZ1721, que expresaban las fusiones SlrP-3xFlag y 3xHA-Trx, respectivamente. Las células se cultivaron sobre los portaobjetos con cámara y se fijaron durante 6 minutos en metanol frío. Se lavaron abundantemente con PBS y con PBS que contenía Tween 20 al 0,1%. Luego, las células se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente con seroalbúmina bovina (BSA) al 3% en PBS-Tween y 1 hora con el anticuerpo diluido en PBS-Tween-BSA. Los anticuerpos usados en este caso fueron: anticuerpo monoclonal anti-Flag M2 conjugado con Cy3 (Sigma), para marcar la fusión SlrP-3xFlag; y anticuerpo anti-HA marcado con Alexa Fluor 488 (Covance), para marcar la fusión 3xHA-Trx. Ambos anticuerpos se usaron a una dilución 1:1000. Tras el marcaje, las células se lavaron con PBS y se montaron para microscopía usando ProLong Gold (Invitrogen). Todas las imágenes se adquirieron con un microscopio confocal Leica TCS SP2.

7.2 Medida de la muerte celular

El porcentaje de muerte de células HeLa se determinó mediante la medida de la liberación al medio de cultivo de lactato deshidrogenasa (LDH) que ocurre cuando la célula muere. Para dicha medida se usó *CytoTox 96 nonradioactive cytotoxicity assay kit* (Promega) Los ensayos se realizaron con cultivos confluentes de células HeLa. El porcentaje de citotoxicidad se calculó como:

$$\frac{(\text{Liberación LDH experimental} - \text{Liberación LDH espontánea})}{(\text{Liberación LDH máxima} - \text{Liberación LDH espontánea})} \times 100$$

La liberación de LDH espontánea se refiere al nivel detectado en cultivos celulares no confluentes. La liberación máxima es la que se obtiene en un cultivo tratado con tampón de lisis durante 45 min a 37°C.

7.3 Infecciones de células HeLa con *Salmonella*

Dos días antes de la infección se siembran 250000 células HeLa por pocillo en cajas de 6 pocillos (Nunc) y se cultivan a 37°C y 5% de CO₂ en medio DMEM sin antibióticos. Las bacterias (estirpe 14028 de *S. enterica* serovar Typhimurium) se cultivan durante toda la noche en LB con NaCl 0,3 M y sin agitación. Estas condiciones favorecen la capacidad invasiva de *Salmonella*. Las células HeLa se infectan con las bacterias a una multiplicidad de infección de 50 bacterias por célula eucariótica. 60 minutos después de la infección, las células se lavan dos veces con PBS y se incuban en medio fresco suplementado con 100 µg/ml de gentamicina. Este antibiótico se usa para matar a las bacterias que no han infectado ya a las células HeLa. 60 minutos después, la concentración de gentamicina se disminuye hasta 16 µg/ml y se cultivan las células durante 6 o 14 horas más.

7.4 Preparación de microsomas

Se parte de 3x10⁸ células HeLa que se despegan con tripsina. Se retira el medio de cultivo mediante aspiración usando una bomba de vacío, se lavan las células 2 veces con PBS, se añade 1 ml de tripsina y se incuba a 37°C durante 10 minutos. Luego se recogen las células en PBS, se lavan con dicho tampón y se recogen mediante centrifugación (10 minutos a 1000 rpm). Se calcula el volumen que ocupa el precipitado de células (PCV). Se resuspenden en un volumen de tampón de extracción hipotónico (HEPES 10 mM, pH7,8, KCl 25 mM y EGTA 1 mM) equivalente a 3 volúmenes el PCV y

se incubaba 20 minutos a 4°C para permitir que las células se hinchen. Las células se centrifugan a 600 g durante 5 minutos, el sobrenadante se retira mediante aspiración y se mide el nuevo PCV. Las células se resuspenden en un volumen de tampón de extracción isotónico (HEPES 10 mM, pH 7,8, sacarosa 250 mM, KCl 25 mM y EGTA 1 mM) equivalente a 2 veces el nuevo PCV y se rompen con un homogeneizador (Kontes) de 7 ml mediante 10 golpes. El homogeneizado se centrifuga a 1000 g durante 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfiere a un nuevo tubo de centrifuga. Se vuelve a centrifugar a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido se corresponde con la fracción post-mitocondrial y se centrifuga, por última vez a 100000 g durante 60 minutos a 4°C en una ultracentrífuga. Tras esta centrifugación se obtiene un sobrenadante y un precipitado que se corresponden a las fracciones citosólica y microsómica, respectivamente. La fracción microsómica se resuspende en tampón de extracción isotónico.

8. TÉCNICAS DE ANÁLISIS ESTRUCTURAL

8.1 Cristalización de proteínas

Las proteínas en solución pasan a un estado sólido mediante un proceso de cristalización, que consiste en un proceso de difusión de vapor en una gota suspendida. La obtención del cristal depende de la combinación de diferentes productos químicos añadidos a la proteína. Un cristal de proteína se define como un objeto sólido compuesto de un apilamiento regular de numerosas moléculas de proteínas todas idénticas.

La difracción de rayos X por los cristales obtenidos genera un diagrama de difracción que permite obtener un mapa de densidad electrónica, a partir del cual se puede resolver la estructura tridimensional de la proteína. En la **Figura M.3** se muestra un esquema general del proceso.

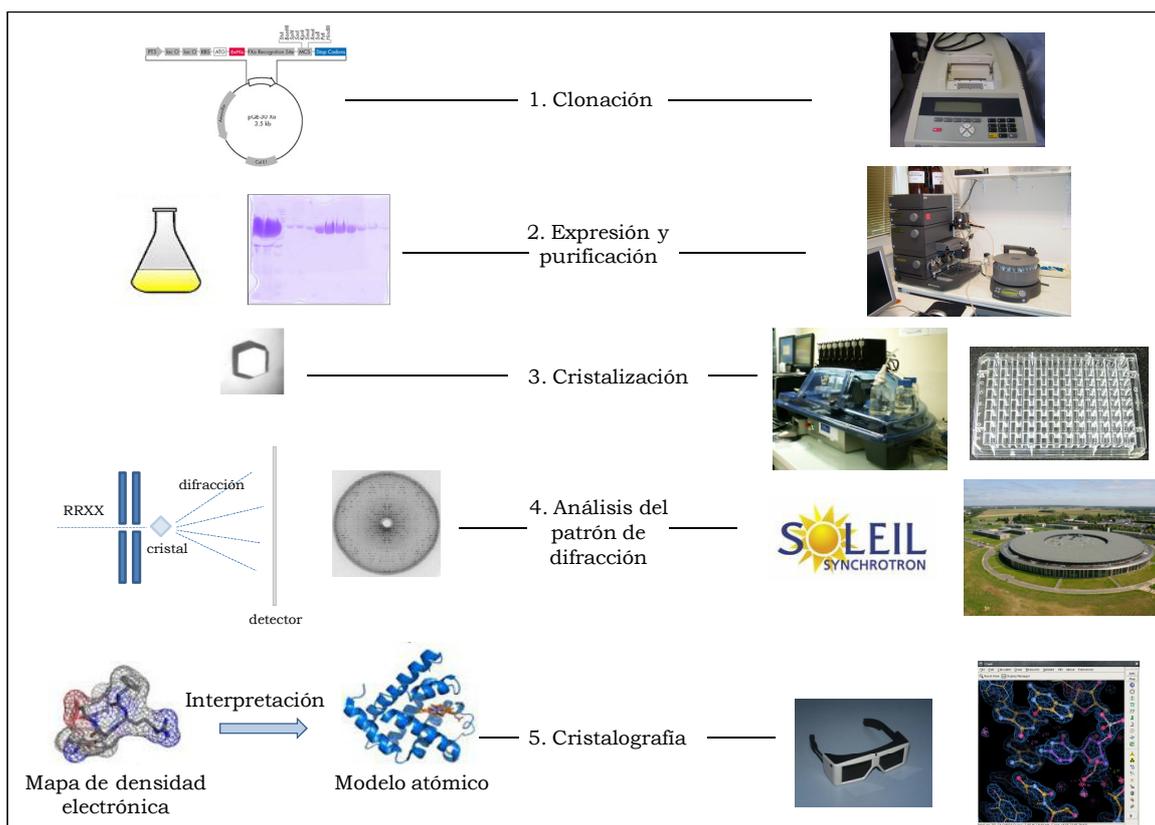


Figura M.3. Esquema general del proceso de cristalización de una proteína para la obtención de su estructura tridimensional. 1. Clonación del gen de interés en un plásmido determinado (pQE30), que expresa la proteína en fusión con un epitopo (cola de histidinas) 2. Se expresa y se purifica la proteína a gran escala mediante cromatografía de afinidad. 3. Se realizan escrutinios para la búsqueda de las condiciones en las que la proteína cristaliza y se optimizan las mismas para conseguir acumular la mayor cantidad de cristales y de la mejor calidad posible. 4. En un sincrotrón se someten los cristales a difracción por rayos X. 5. Al obtener los datos de difracción se pierde la fase de las ondas difractadas. Para calcular el mapa de densidad electrónica, mediante la transformada de Fourier, se deben conocer los datos de intensidad, dirección y fase de cada onda difractada. Es lo que se conoce como problema de fase. Las fases se estiman por diferentes técnicas, como el reemplazamiento molecular, si hay una estructura homóloga disponible. En caso contrario, se deben producir y cristalizar nuevas proteínas marcadas con átomos pesados (ej., selenometionina), y obtener nuevos datos de difracción.

Los ensayos de cristalización se llevaron a cabo en la plataforma robotizada del LEBS. Las condiciones de cristalización a partir de soluciones comerciales (Qiagen) se escrutaron usando un robot (*nanodrop Cartesian robot*, Genomics Solutions) (**Figura M.4**). Éste consta de una cámara cerrada herméticamente para mantener unas condiciones determinadas de temperatura y humedad relativa, y es capaz de mezclar 100 nl de la proteína

de interés con 100 nl de la solución precipitante. El hecho de trabajar con volúmenes tan pequeños permite economizar la proteína de interés.



Figura M.4. Robot cartesiano nanogota

Para la realización de los escrutinios de cristalización se usan placas de 96 pocillos (**Figura M.5**), cada uno de los cuales contiene una solución con unas concentraciones de precipitante y tampón a un pH determinados. Además, cada pocillo consta de tres minipocillos en cada uno de los cuales se puede variar la concentración de proteína, o bien la relación de proteínas, en el caso de que se desee llevar a cabo ensayos de cocrystalización. Por tanto, en cada placa se prueban 288 condiciones diferentes para el rastreo de las condiciones óptimas de cristalización. Las placas se almacenan y se observan periódicamente hasta la aparición de cristales en alguna de las condiciones ensayadas.

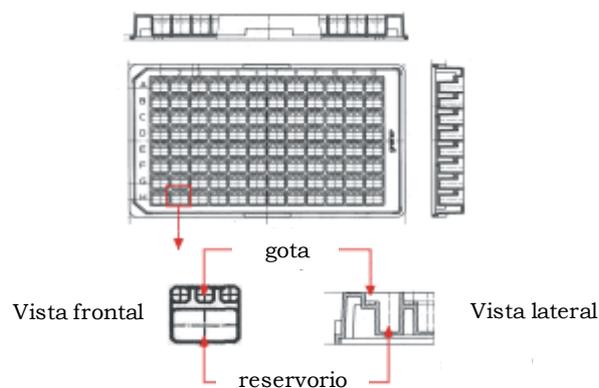


Figura M.5. Placa de 96 pocillos para escrutinios de cristalización.

Los dos primeros escrutinios se realizaron con dos sistemas comerciales de 96 condiciones cada uno (MB Class II y PEG II) y se probaron 3 concentraciones de SlrP-C (5, 10 y 15 mg/ml, respectivamente) y 3 relaciones del complejo Trx/SlrP-C (1/1, 2/3 y 2/1). Se llevaron a cabo dos escrutinios adicionales. Por un lado, se usaron 3 sistemas (Protein complex, PEG y MB Class) con SlrP-C (i) solo, (ii) en complejo con N-SlrP y (iii) en complejo con Trx. Por otro lado, se usaron tres sistemas (MB Class, MB Class II y PEG II) con tres complejos diferentes: (i) SlrP-N 0,19 mM / SlrP-C 0,19 mM / Trx 0,26 mM, (ii) SlrP-C 0,22 mM / Trx 0,43 mM y (iii) SlrP-C 0,24 mM / Trx 0,21 mM.

Las condiciones en las que crecieron cristales inicialmente, se reprodujeron manualmente mediante el método de la gota colgante en placas de 24 pocillos. Dichos pocillos llevan una solución precipitante cuya composición está basada en la solución donde cristalizaron las proteínas, pero en cada pocillo se aplica una pequeña variación, en relación al pH, concentración del agente precipitante o concentración del tampón. Para realizar esta técnica, se colocan 2 μ l de la proteína en el centro de un cubreobjetos y se mezclan con 2 μ l de la solución precipitante contenida en el pocillo. Se le da la vuelta al cubre, se tapa el pocillo y se sella con grasa para asegurar la estanqueidad del sistema. Dicho sistema cerrado evolucionará por equilibrio de vapor y como la mezcla de proteína y precipitante está menos concentrada que la solución del pocillo, el agua de la mezcla se evaporará uniéndose a la del pocillo. Como resultado de este proceso la concentración de la proteína y del precipitante aumenta lentamente y, si las condiciones son las adecuadas, se formarán cristales. En la **Figura M.6** se muestra un esquema de este sistema.

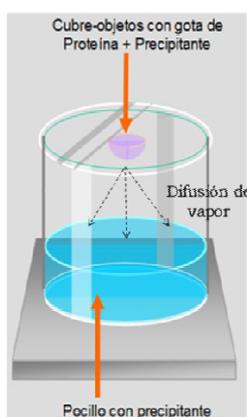


Figura M.6. Esquema representativo de un ensayo manual de cristalización mediante la técnica de la gota colgante. Esquema adaptado de los textos del curso de cristalografía del CSIC, Martín Martínez Ripoll y Félix Hernández Cano.

Los cristales optimizados se transfirieron a la solución de cristalización suplementada con glicerol 15% y luego a la misma solución suplementada con glicerol 30% como crioprotector. Posteriormente se congelaron en nitrógeno líquido antes de exponerlos a los rayos X.

8.2 Difracción de rayos X

Los datos de difracción de rayos X se obtuvieron en la línea de haz (*beamline*) Proxima-1 del sincrotrón de SOLEIL en Saint-Aubin, Francia. Los datos de difracción se procesaron usando los programas XDS (Kabsch, 2010) y CCP4 (Collaborative-Computational-Proyect, 1994). Para resolver el problema de fase mediante reemplazamiento molecular se usó el programa Phaser (McCoy et al., 2007) y se usaron como modelos los efectores de virulencia SspH2, de *Salmonella* e IpaH3, de *Shigella* (número de acceso en PDB 3G06 y 3CVR, respectivamente), y la Trx humana (número de acceso en PDB 3TRX).

RESULTADOS

Capítulo 1

**Escrutinio genético para la identificación de proteínas
humanas dianas del efector SlrP de *Salmonella***

SlrP es una proteína de 765 aminoácidos con un dominio central que contiene 11 copias de un motivo rico en leucina (LRR). Este tipo de dominios suele estar implicado en interacciones proteína-proteína. Por ello, la presencia del motivo LRR sugería que este efector podría unirse a proteínas eucarióticas durante la infección. Partiendo de esta hipótesis decidimos realizar un escrutinio genético para buscar posibles ligandos de SlrP. Se eligió el sistema del doble híbrido en levaduras para llevar a cabo el escrutinio. Teniendo en cuenta que *S. enterica* serovar Typhimurium es capaz de infectar a humanos, consideramos que lo más interesante era buscar proteínas de esa especie que interaccionaran con el efector de *Salmonella*. Por este motivo el escrutinio se realizó sobre una genoteca de ADNc de células HeLa (línea de células epiteliales humanas) pretransformada en la estirpe Y187 de la levadura *S. cerevisiae* (BD Biosciences Clontech). Se trata de una genoteca que permite la expresión de fusiones con el dominio de activación del factor de transcripción de levaduras Gal4. A continuación, se presenta una breve descripción del principio del sistema del doble híbrido, de la genoteca, las estirpes y los plásmidos utilizados (**Ver tablas M.2, M.3 y M.4 en Material y Métodos**), de los controles previos y posteriores al escrutinio realizados y de los resultados obtenidos.

1.1 El sistema del doble híbrido

Este ensayo está basado en un factor de transcripción que contiene dos dominios separables: un dominio de unión a ADN (DB) y un dominio de activación de la transcripción (AD). Un gen de interés se expresa como una fusión al dominio de unión al ADN de dicho factor, mientras que otro gen o ADNc se expresa en fusión al dominio de activación del factor. Si hay interacción entre las dos proteínas de fusión se produce un acercamiento entre los dos dominios del factor de transcripción, permitiendo así la transcripción de una serie de genes indicadores (**Figura R.1.1**). Para realizar un escrutinio se produce, en fusión con el dominio de unión al ADN, una sola proteína de interés denominada “cebo”, y, en fusión con el dominio de

activación de la transcripción, muchas proteínas, denominadas “presas”, que son productos de una genoteca de ADNc. La tecnología de este sistema proporciona un acceso inmediato a genes que codifican proteínas que interaccionan con la proteína de interés.

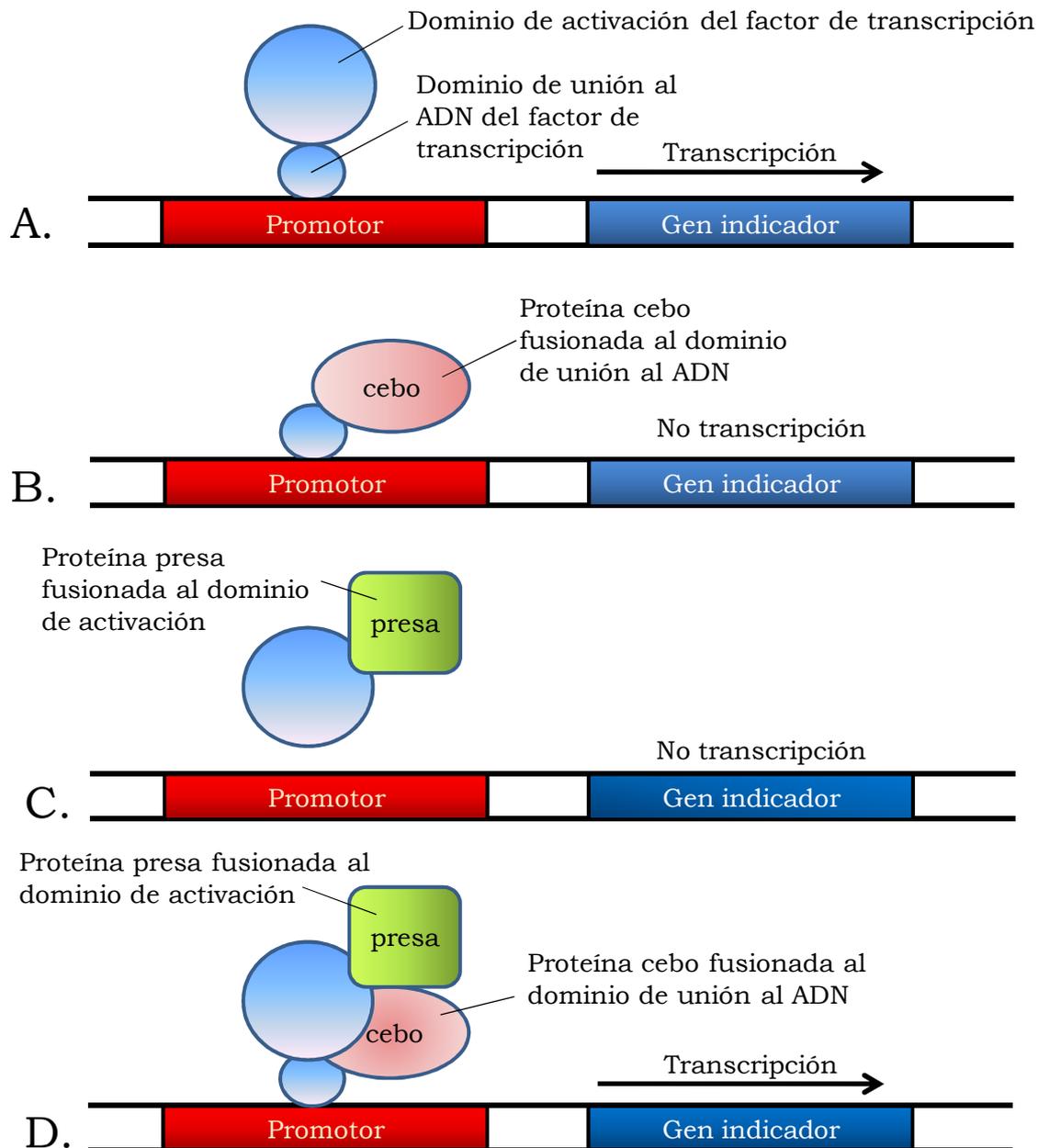


Figura R.1.1. Esquema del principio básico del sistema del doble híbrido. **A.** La unión del factor de transcripción de dos componentes a la secuencia apropiada del promotor activa la transcripción de un gen indicador. **B.** El dominio de unión al ADN fusionado a una proteína cebo por sí solo no activa la transcripción. **C.** La fusión de la proteína presa con el dominio de activación no activa la transcripción. **D.** La interacción entre las proteínas cebo y presa permite la reconstitución del factor de transcripción y la expresión del gen indicador.

1.2 Descripción de la genoteca, las estirpes y los plásmidos

1.2.1 Descripción de la genoteca y los plásmidos

Con la intención de buscar ligandos de SlrP en el proteoma humano, se utilizó una genoteca de ADNc de células HeLa pretransformada en la estirpe Y187 de la levadura *S. cerevisiae* (*BD Matchmaker™ Pretransformed libraries*, Clontech). La genoteca estaba clonada en el vector pGADT7, que permite la obtención de fusiones con el dominio de activación del factor de transcripción de levaduras Gal4.

Para la realización del escrutinio se construyó el plásmido pIZ1627, derivado de pGBT10 que contenía la secuencia codificante de *slrP*. A partir de este plásmido se podía obtener la producción en levaduras de una proteína de fusión entre el dominio de unión al ADN de Gal4 y la proteína SlrP completa. Este plásmido se introdujo en la estirpe AH109 de *S. cerevisiae* por transformación usando el procedimiento del acetato de litio (Sherman et al., 1986)

1.2.2 Descripción de las estirpes

Las estirpes de levadura Y187 y AH109 son de sexos opuestos (Mata y Mata, respectivamente), por tanto, son idóneas para realizar el escrutinio mediante conjugación. Por otra parte, ambas estirpes presentan una serie de requerimientos nutricionales que se detallan a continuación y que van a ser útiles para la selección de los candidatos positivos en el escrutinio:

- Y187 y AH109 son auxótrofas para triptófano (Trp⁻), y leucina (Leu⁻), por tanto, no pueden crecer en un medio mínimo que carezca de estos requerimientos.
- Los fenotipos Trp⁻ y Leu⁻ se pueden usar como marcadores de transformación ya que las mutaciones *trp1* y *leu2*, responsables de esos fenotipos, se pueden complementar con los plásmidos pGBT10 y pGADT7, respectivamente.
- La estirpe AH109 tiene integrados los genes marcadores nutricionales *ADE2* e *HIS3*, que complementan las auxotrofías para adenina e histidina, respectivamente y que se transcriben sólo en presencia de

Gal4 (pero ambas estirpes tienen deletado el gen *GAL4* endógeno). Este hecho proporciona un sistema de selección por crecimiento en ausencia de histidina, adenina o ambos bastante sensible que permite la identificación de un candidato entre varios millones escrutados. La estirpe Y187 carece de estos marcadores nutricionales.

- Tanto la estirpe Y187 como la AH109 tienen además, el gen marcador *MEL1* bajo el control de un promotor dependiente de Gal4. *MEL1* es un gen endógeno en varias estirpes de levadura que codifica la α -galactosidasa. La α -galactosidasa es una enzima secretada que cataliza la degradación de la melibiosa. La expresión de α -galactosidasa en colonias que crecen en cajas de agar puede ser detectada con X- α -Gal, ya que la hidrólisis de éste da lugar a un producto final de color azul.

1.2.3 Controles previos

Un control indispensable en este tipo de ensayos consiste en probar que la proteína cebo no produce transactivación de los genes indicadores, es decir, que la fusión DB-proteína cebo por sí sola no activa la expresión de dichos genes. Para realizar esta prueba se transformó la estirpe AH109 con el plásmido pIZ1627 que expresa la fusión DB-SlrP y la estirpe Y187 con el plásmido vacío pGADT7. Se conjugaron ambas levaduras y los diploides obtenidos se sembraron en los medios selectivos SD/-His/-Leu/-Trp, SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp y SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal. No se expresó ninguno de los marcadores, esto es, no se observó crecimiento en SD/-His/-Leu/-Trp ni en SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp y no se detectó color azul en presencia de X- α -Gal (**Figura R.1.2**). Por tanto, se podía usar la fusión DB-SlrP como proteína cebo.

Otro de los controles que se realizaron fue probar que los transconjugantes que contenían los dos plásmidos vacíos (pGBT10 y pGADT7) no activaban la expresión de los genes marcadores. Este control también funcionó correctamente. (**Figura R.1.2**)

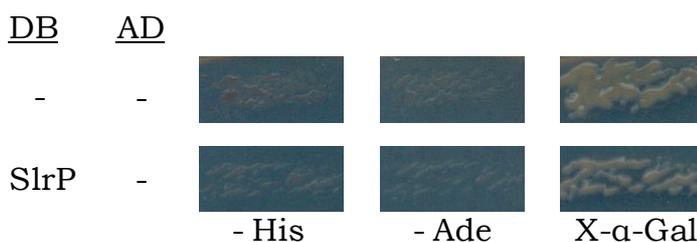


Figura R.1.2. Controles previos del ensayo del doble híbrido. Se obtuvieron diploides por conjugación entre la estirpe AH109, que contenía el plásmido pGBT10 o su derivado pIZ1627, y la estirpe Y187, que contenía el plásmido pGADT7. La ausencia de crecimiento en medios carentes de histidina, o histidina y adenina, y la ausencia de color azul en medio con X-α-Gal mostró que SlrP no producía transactivación de los genes indicadores, como tampoco lo hacían los vectores vacíos. DB, fusión con el dominio de unión al ADN de Gal4 (vector pGBT10); AD, fusión con el dominio de activación de Gal4 (vector pGADT7); -His, medio mínimo suplementado con mezcla de aminoácidos (*drop-out*) sin leucina, triptófano ni histidina; -Ade, medio mínimo suplementado con mezcla de aminoácidos (*drop-out*) sin leucina, triptófano, histidina ni adenina; X-α-Gal, medio mínimo suplementado con mezcla de aminoácidos (*drop-out*) sin leucina ni triptófano y con X-α-Gal; -, vectores vacíos.

1.3 Escrutinio

1.3.1 Cálculo del título de la genoteca

A partir de 10 µl de la genoteca, se hicieron diluciones de 4 a 6 órdenes de magnitud y se sembraron en medio SD/-Leu, con el objetivo de estimar el número de clones por ml que contenía la genoteca. Tras el recuento de las colonias se obtuvo un título de $4,5 \times 10^7$ /ml, lo cual se acercaba bastante a las especificaciones de la genoteca (5×10^7 /ml).

1.3.2 Conjugación

En primer lugar se inoculó la estirpe AH109 de *S. cerevisiae* transformada con el plásmido pIZ1627 (derivado de pGBT10 con *slrP*) en 50 ml de SD/-Trp y se cultivó toda la noche a 30°C con agitación a 200 rpm. Al día siguiente, cuando el cultivo llegó a una DO₆₀₀ de 1,5, se recogieron las células por centrifugación, dejando unos 5 ml de medio. Se añadieron 500 µl de la genoteca comercial pretransformada en la estirpe Y187 y 40 ml de medio rico YPDA. La mezcla se pasó a un matraz de 2 litros para optimizar la aireación y se incubó durante 20 horas a 30°C y a 40 rpm. Esta velocidad de agitación es la idónea para mantener las levaduras en suspensión y, al mismo tiempo, favorecer la formación de parejas conjugantes.

1.3.3 Cálculo de la eficiencia de conjugación

Para estimar la eficiencia de conjugación, se sembraron diluciones seriadas de la mezcla de conjugación en placas de SD/-Leu, SD/-Trp y SD/-Leu/-Trp. De este modo al contar las colonias que crecieron se pudo determinar el número de viables de cada parental y el número de viables diploides. (Nos referimos a número de viables como unidades formadoras de colonias o ufc):

$$\frac{\text{ufc} \times 1000 \mu\text{l/ml}}{\text{Vol. sembrado} (\mu\text{l}) \times \text{factor de dilución}} = \text{N}^\circ \text{ ufc viables/ml}$$

$$\begin{aligned} \text{N}^\circ \text{ ufc/ml en SD/-Leu} &= \text{viabilidad de Y187} \\ \text{N}^\circ \text{ ufc/ml en SD/-Trp} &= \text{viabilidad de AH109} \\ \text{N}^\circ \text{ ufc/ml en SD/-Leu/-Trp} &= \text{viabilidad de los diploides} \end{aligned}$$

La eficiencia de conjugación se calcula dividiendo la viabilidad de los diploides entre la viabilidad de la estirpe limitante (que es la que presenta menor viabilidad).

$$\frac{\text{N}^\circ \text{ ufc/ml de los diploides}}{\text{N}^\circ \text{ ufc/ml del parental limitante}} \times 100 = \% \text{ de diploides}$$

Como se ve en la **Tabla R.1.1**, la estirpe con menor número de viables resultó ser Y187, portadora de la genoteca. Esto es lo deseable para asegurar que el máximo número de células que contienen la genoteca encuentren una pareja de conjugación. El porcentaje de diploides fue del 9%, muy por encima del 2% mínimo recomendado por el proveedor de la genoteca.

Tras las 20 horas de conjugación el cultivo se centrifugó y el sedimento se lavó dos veces con 2xYPDA. Tras lavar, se resuspendieron las levaduras en 2 ml de agua bidestilada estéril, con lo que se obtuvo un volumen final de 3,1 ml. La mezcla de conjugación se sembró en alícuotas de 200 μl en cajas de 15 cm de diámetro con medio SD/-His/-Leu/-Trp y se incubó a 30°C durante 8 días. Este medio que carece de histidina (además

de leucina y triptófano para seleccionar los diploides), se usa para seleccionar los clones positivos, ya que, en principio, sólo se activará la transcripción de los genes marcadores (entre ellos, *HIS3*), en el caso de que se dé interacción entre SlrP y una proteína expresada a partir de la genoteca y se recomponga el factor de transcripción Gal4 (**Figura R.1.3**).

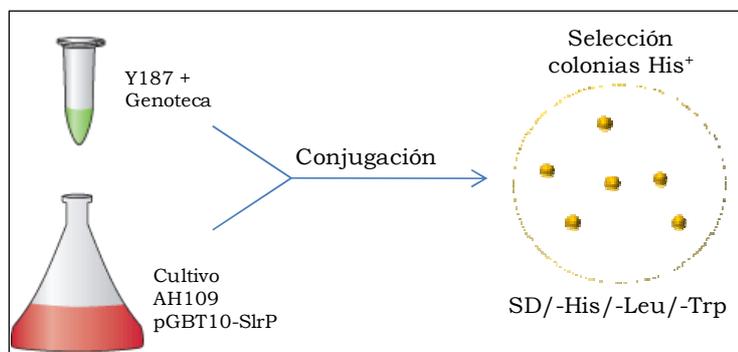


Figura R.1.3. Esquema de la selección de clones positivos. Se conjugó un cultivo saturado de la estirpe AH109, que expresaba la fusión DB-SlrP, con 500 µl de genoteca, que expresaba insertos de ADNc humano fusionados al dominio de activación de Gal4. Los clones positivos (protótrofos para histidina) se seleccionaron en el medio SD/-His/-Leu/-Trp.

1.3.4 Cálculo del número de clones escrutados

Finalmente, podemos calcular el número de clones escrutados multiplicando el volumen final (VF) de mezcla de conjugación por el número de ufc/ml de diploides.

$$\text{N}^\circ \text{ ufc/ml de los diploides} \times \text{VF mezcla conjugación} = \text{N}^\circ \text{ de clones escrutados}$$

En la **Tabla R.1.1** se resume lo explicado arriba.

Tabla R.1.1. Eficiencia de conjugación

Medio SD/	-Leu/-Trp	-Leu	-Trp	Eficiencia conjugación (%)	Nº clones escrutados
FD	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁵		
ufc	36	40	346	9	1,1 x 10 ⁶
	Diploides	Y187	AH109		

FD: Factor de dilución

1.4 Resultados del escrutinio

De más de un millón de clones de la genoteca escrutados, 28 fueron capaces de crecer en el medio SD/-His/-Leu/-Trp. Para verificar si se

trataba de verdaderos positivos se analizó la activación de los otros genes marcadores, *ADE2* y *MEL1*. Para ello, se aislaron las colonias His⁺ y se sembraron en medio SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp y SD/-Leu/-Trp/X- α -Gal, respectivamente. En la **Tabla R.1.2** se presentan los candidatos obtenidos en el escrutinio y sus fenotipos.

Tabla R.1.2. Candidatos obtenidos en el escrutinio

Candidato	Crecimiento en	Crecimiento en	Color en X- α -Gal
	-His/-Leu/-Trp	-Ade/-His/-Leu/-Trp	
	SlrP	SlrP	SlrP
s1	+	-	Blanco
s2	+	-	Blanco
s3	+	+	Azul
s4	-/+	-	Blanco
s5	+	+	Azul
s6	+	-	Blanco
s7	+	-	Blanco
s8	+/-	-	Blanco
s9	+	-	Blanco
s10	+	-	Blanco
s11	+	-	Blanco
s12	+	+	Azul
s13	+/-	-	Blanco
s14	+	-/+	Blanco/Azul
s15	+	-	Blanco
s16	+	+	Azul
s17	+/-	-	Blanco
s18	+	-	Blanco
s19	+/-	-	Blanco
s20	+/-	-	Blanco
s21	+/-	-	Blanco
s22	+/-	-	Blanco
s23	+/-	-	Blanco
s24	-/+	-	Blanco
s25	+	-	Blanco
s26	+/-	-	Blanco
s27	+/-	-	Blanco
s28	+	-	Blanco

Se continuó el estudio de los clones s3, s5, s12, s14 y s16, por ser aquéllos que mostraban expresión de los tres genes indicadores.

1.5 Análisis de los candidatos positivos

El siguiente paso consistió en realizar un análisis a nivel genético de los candidatos seleccionados para constatar que contenían tanto el gen *slrP*, como un inserto de ADNc de la genoteca y además, que los insertos de los clones no fueran todos iguales.

Se realizaron experimentos de PCR usando oligonucleótidos específicos del gen *slrP*, *slrpgst5'* y *slrpgst3'*, como cebadores directo y reverso, respectivamente, sobre los candidatos positivos. En todos los casos se amplificó un fragmento de ADN de 2,3 kb, que es el tamaño de la secuencia codificante de *slrP*. Para detectar si estos clones contenían también insertos de la genoteca clonada en el vector pGADT7 se repitieron los experimentos de PCR, pero esta vez usando los oligos específicos de dicho vector, T7 y 3'AD. Se amplificó un solo inserto para cada uno de los clones analizados con tamaños que iban de las 800 pb de s3 a las cerca de 2 kb de s16 (**Figura R.1.4a**).

Para analizar con más detalle la variabilidad de los clones obtenidos decidimos estudiar el patrón de restricción de los fragmentos de ADN obtenidos en la PCR. Usamos la enzima de restricción *HaeIII*, cuya diana de restricción es de sólo 4 pares de bases, concretamente 5'-GGCC-3'. Esto hace que la enzima corte frecuentemente y produzca un patrón de restricción característico de cada secuencia de ADN. Los cinco candidatos analizados mostraban patrones de restricción diferentes (**Figura R.1.4b**).

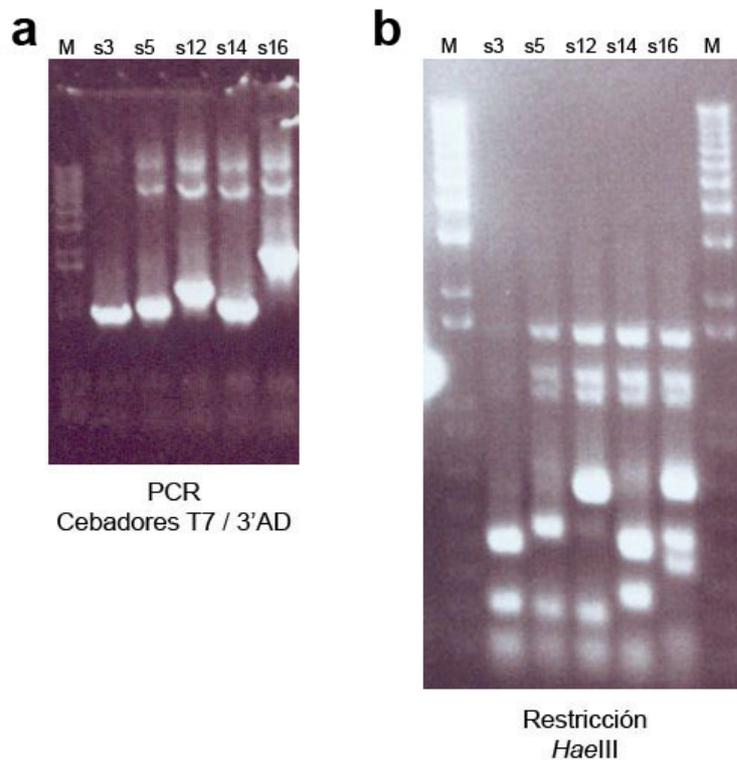


Figura R.1.4. Análisis de los clones positivos mediante PCR y restricción. a. Amplificación mediante PCR del inserto de ADNc presente en pGADT7 para cada uno de los clones positivos, denominados s3, s5, s12, s14 y s16, que fueron obtenidos en el escrutinio de doble híbrido con SlrP. Para la amplificación se usaron los cebadores específicos T7 y 3'AD. Los productos de la amplificación se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %. El patrón de tamaños utilizado (M) es el 1 Kb+ ladder. **b.** Análisis de los fragmentos de PCR obtenidos en (a) mediante restricción con la endonucleasa *HaeIII*. Los productos de restricción se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0,8 %. El patrón de tamaños utilizado (M) es el 1 Kb+ ladder.

La última verificación antes de la secuenciación de los candidatos consistió en aislar los plásmidos derivados de pGADT7, retransformar las estirpes de levaduras y probar de nuevo la interacción con la proteína cebo SlrP, así como la posible transactivación de los genes indicadores usando el vector pGBT10 vacío. En la **Figura R.1.5** se muestra el crecimiento y color de dichos candidatos en los distintos medios.

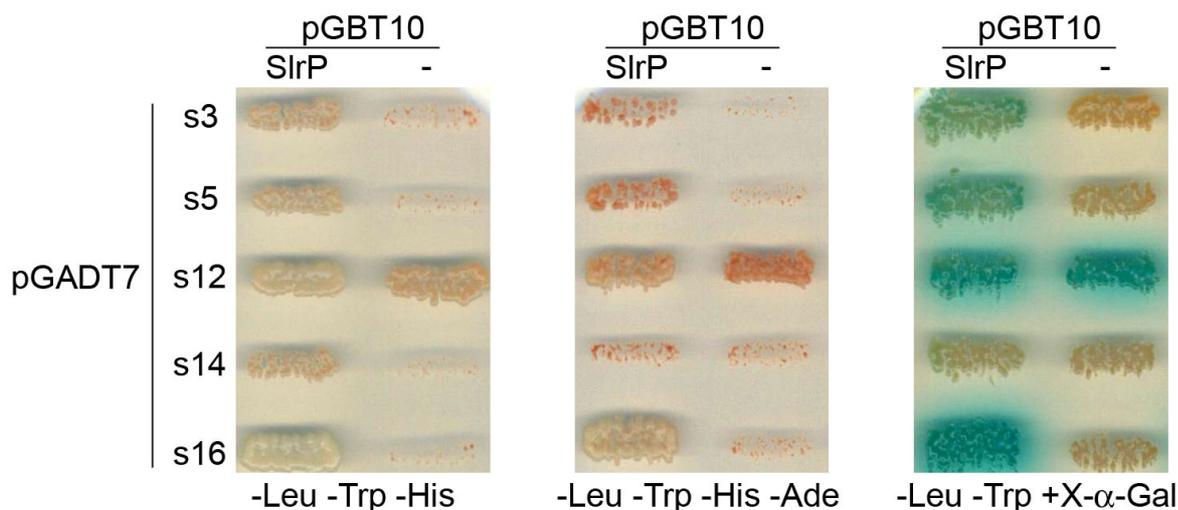


Figura R.1.5. Candidatos positivos del escrutinio del doble híbrido en levaduras. Se obtuvieron diploides por conjugación entre la estirpe AH109, que contenía el plásmido pGBT10 o su derivado pIZ1627 (que expresa la fusión entre el dominio de unión al ADN de Gal4 y SlrP), y la estirpe Y187, que contenía derivados del plásmido pGADT7 (para la expresión de fusiones con el dominio de activación de la transcripción de Gal4). La interacción entre las dos proteínas híbridas se muestra por crecimiento en ausencia de histidina (-Leu -Trp -His), crecimiento en ausencia de histidina y adenina (-Leu -Trp -His -Ade) y color azul en presencia de X-α-Gal (-Leu -Trp +X-α-Gal). El vector pGBT10 (-), se usó como control negativo.

Como se ve en la figura, los candidatos s3, s5 y s16 cumplían todos los requisitos para considerarlos auténticos positivos, mientras que s14 presentaba un crecimiento pobre en medio sin adenina y un color azul muy tenue en presencia de X-α-Gal. Por su parte, el candidato s12 producía activación de la transcripción de los tres genes indicadores incluso en ausencia de SlrP, lo que hacía pensar que este candidato no expresaba una proteína de interacción con SlrP.

1.6 Secuenciación de los candidatos positivos

Para la identificación de cada clon positivo, se secuenció el ADNc de cada candidato con un secuenciador de ADN automático (Sistemas Genómicos, Valencia). La secuenciación se realizó a partir de ADN plasmídico aislado con un sistema comercial (Sigma), usando como cebador el oligonucleótido T7. Las secuencias obtenidas se analizaron mediante algoritmos de biología molecular del *National Center for Biotechnology*

Information (NCBI) y del *European Bioinformatics Institute* (EBI). El análisis de las secuencias reveló los siguientes datos:

- Los candidatos s3, s5 y s14 contenían ADNc correspondiente a la tiorredoxina citosólica humana (gen *trx*). Sorprendentemente, las tres secuencias parecen estar en una pauta de lectura diferente a la del dominio de activación de Gal4. Además incluían una parte de la región 5' no traducida correspondiente al ARNm.
- El candidato s12, codificaba la proteína TAF1. Se trata de la subunidad 1 del factor de iniciación de la transcripción TFIID. Esto explica que activase la transcripción de todos los genes indicadores en el ensayo del doble híbrido, incluso cuando se enfrentaba con el vector vacío. Por tanto, la conclusión fue que se trataba de un falso positivo.
- El candidato s16 contenía la secuencia codificante completa del gen *erdj3*, que codifica la proteína ERdj3, proteína 3 de la familia DnaJ específica del retículo endoplásmico. Es una chaperona de la familia Hsp40. Al igual que ocurre con los candidatos s3, s5 y s14 la secuencia parece estar en una pauta de lectura incorrecta.

Existen precedentes que indican que, aun con pautas de lectura incorrectas, puede haber un cierto nivel de producción de la proteína híbrida. No obstante, se decidió confirmar las interacciones clonando las secuencias codificantes de los genes *trx* y *erdj3* en la fase correcta de lectura en el vector pGADT7. Para ello se amplificaron, mediante PCR, las secuencias correspondientes, usando como cebadores los oligonucleótidos *trx5'* y *trx3'*, para *trx*, y *dnaj5'* y *dnaj3'*, para *erdj3*. Los fragmentos amplificados se clonaron en el vector pGADT7 usando las dianas de restricción *EcoRI* y *XhoI*. Se transformó la estirpe Y187 con cada una de las nuevas construcciones y se analizó la interacción con SlrP mediante el sistema del doble híbrido. En ambos casos se confirmó la interacción **(Figura R.1.6)**.

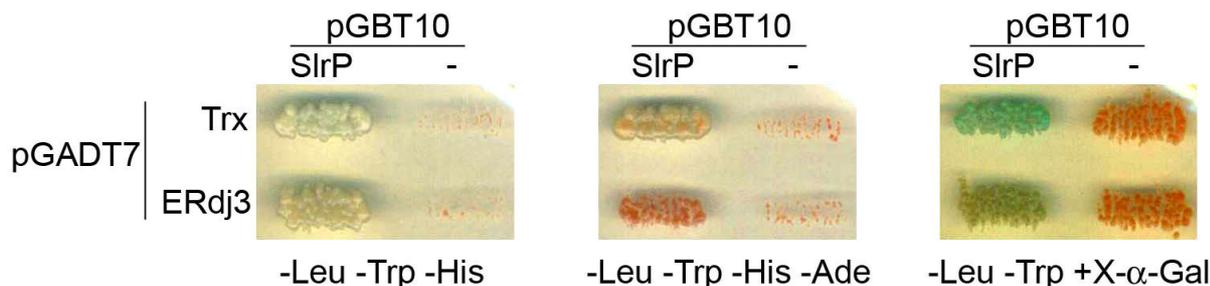


Figura R.1.6. SlrP interacciona con las proteínas humanas Trx y ERdj3. Se clonaron las secuencias codificantes de Trx y ERdj3 en la fase correcta de lectura en el vector pGADT7 y se probó la interacción con SlrP en el sistema del doble híbrido. El crecimiento en medios carentes de histidina (-Leu -Trp -His) y de histidina y adenina (-Leu -Trp -His -Ade), y la presencia de color azul en medio con X-α-Gal (-Leu -Trp +X-α-Gal) mostró que SlrP interaccionaba con las proteínas Trx y ERdj3. El vector pGBT10 (-), se usó como control negativo

Un experimento adicional consistió en ensayar las interacciones intercambiando los vectores del sistema de doble híbrido. Se trataba de clonar los insertos de ADNc correspondientes a Trx y ERdj3 en el vector pGBT10 y *slrP* en pGADT7. De esta forma, SlrP se expresaría como una fusión con el dominio de activación de Gal4 y las proteínas humanas Trx y ERdj3 como fusiones al dominio de unión al ADN de dicho factor de transcripción. En la **Figura R.1.7** se muestra el resultado de este experimento. En el caso de la Trx, la interacción con SlrP se confirmó para los tres genes indicadores. Con ERdj3 sólo se observó activación del gen indicador *HIS3*.

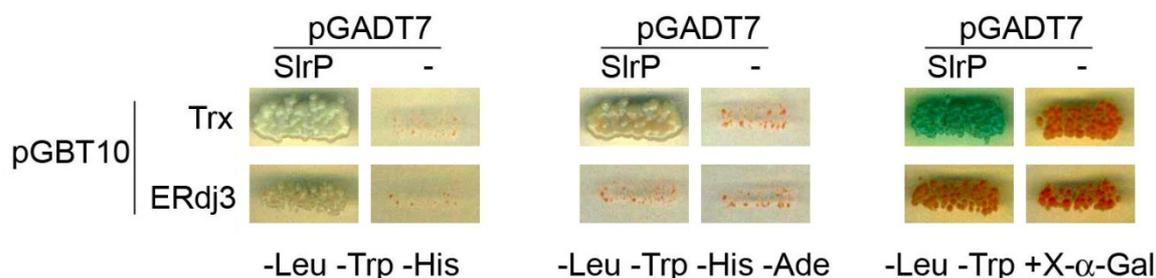


Figura R.1.7. Interacción de SlrP con Trx y ERdj3 intercambiando los vectores del sistema de doble híbrido. Se clonaron las secuencias codificantes correspondientes a Trx y ERdj3 en el vector pGBT10 y se probó la interacción con SlrP expresado desde el vector pGADT7 en el sistema del doble híbrido. El crecimiento en medios carentes de histidina (-Leu -Trp -His) y de histidina y adenina (-Leu -Trp -His -Ade), y el color azul en medio con X-α-Gal (-Leu -Trp +X-α-Gal) se usaron como indicadores de las interacciones. El vector pGADT7 (-), se usó como control negativo

En mamíferos existen dos isoformas de Trx, una predominantemente citosólica (Trx1) y otra que se localiza en la mitocondria (Trx2). Para estudiar la especificidad de la interacción de SlrP con Trx1 (la hallada en el escrutinio) se analizó también la interacción con la Trx2 mitocondrial, mediante el sistema del doble híbrido. Se clonó la secuencia codificante de la Trx2 en el vector pGADT7 (pIZ1688) y se probó la interacción con SlrP, que estaba clonado en el vector pGBT10. Como se observa en **Figura R.1.8**, SlrP sólo fue capaz de interactuar con la Trx1 citosólica, confirmando de esta forma la especificidad de esta unión.

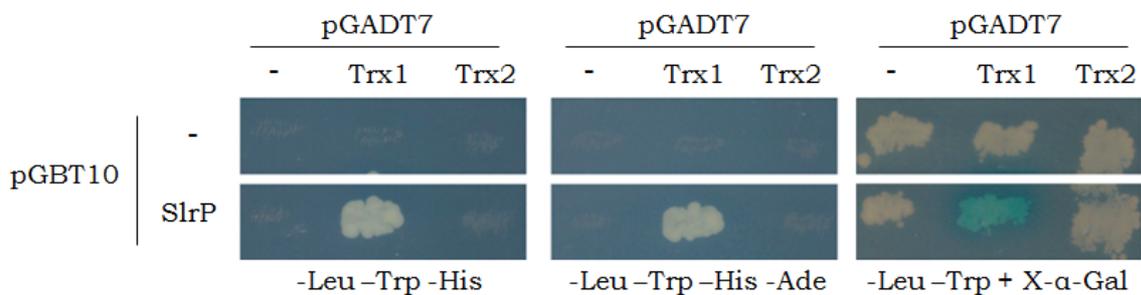


Figura R.1.8. Especificidad de la interacción SlrP con Trx1. Se clonaron las secuencias codificantes de Trx1 y Trx2 en el vector pGADT7 y se probó la interacción con SlrP en el sistema del doble híbrido. El crecimiento en medios carentes de histidina (-Leu -Trp -His) y de histidina y adenina (-Leu -Trp -His -Ade), y la presencia de color azul en medio con X-α-Gal (-Leu -Trp +X-α-Gal) mostró que SlrP interactuaba con la proteína Trx1. La ausencia de crecimiento y de color azul en dichos medios indicó que SlrP no interactuaba con la isoforma de Trx mitocondrial, mostrando así la especificidad de la interacción SlrP-Trx1. Los vectores pGBT10 y pGADT7 (-), se usaron como control negativo.

En resumen, los experimentos descritos en este capítulo sugieren que las proteínas humanas Trx y ERdj3 son dos ligandos que interactúan con el efector de *S. enterica* SlrP. A partir de ahí se trataba de confirmar las interacciones por métodos independientes y de realizar un análisis funcional de las mismas.

Capítulo 2

Análisis funcional de la interacción SlrP-Trx

2.1 Confirmación de la interacción SlrP-Trx mediante experimentos de copurificación *in vitro*

La interacción entre el efector SlrP y la Trx humana puesta de manifiesto con el sistema de doble híbrido se confirmó mediante experimentos de copurificación. Primero, se construyó la estirpe SV5193 que lleva fusionado en el extremo 3' del gen *slrP* ADN que codifica el epitopo 3XFlag. Esta estirpe se transformó con el plásmido pGEX4T-1, que expresa la proteína GST, o con el plásmido pIZ1712, que deriva del plásmido pGEX4T-1 y que codifica la proteína de fusión GST-Trx. Se indujo la expresión de las proteínas de fusión en medio rico LB suplementado con 1mM de IPTG. Las bacterias se lisaron mediante sonicación en tampón NP40 y se obtuvo la fracción soluble mediante centrifugación. Las proteínas GST y GST-Trx se purificaron mediante cromatografía de afinidad utilizando una matriz de glutatión-agarosa y se analizaron mediante inmunoblot usando anticuerpos monoclonales anti-Flag. Como se observa en la **Figura R.2.1** SlrP-3xFlag se copurificó con GST-Trx pero no con GST, lo cual revelaba la especificidad de la interacción.

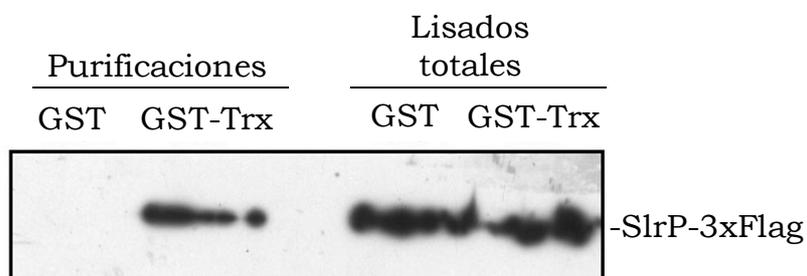


Figura R.2.1. SlrP interacciona con Trx en bacterias. Se obtuvieron lisados en tampón de lisis NP40 de derivados de la estirpe SV5293 (14028 *slrP::3xFlag*) que expresaban o bien la proteína de fusión GST-Trx, o bien GST. Las proteínas de fusión GST se aislaron mediante cromatografía de afinidad con una matriz de agarosa con glutatión. Tras varios lavados con tampón de lisis, las proteínas se eluyeron en tampón de Laemmli y se sometieron a SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa y se revelaron usando anticuerpos monoclonales anti-Flag. Como control de la expresión de la fusión SlrP-3xFlag se incluyeron alícuotas de lisados totales.

2.2 Confirmación de la interacción SlrP-Trx mediante coinmunoprecipitación

Debido a que *in vivo* la interacción entre SlrP y Trx sólo podría tener lugar dentro de la célula hospedadora, se decidió hacer experimentos de coinmunoprecipitación a partir de lisados de células de mamífero. Para ello, se cotransfectaron células HeLa con las construcciones pIZ1720 y pIZ1721, que derivan del plásmido pCS2 y expresan las fusiones SlrP-3xFlag y 3xHA-Trx, respectivamente. Se prepararon lisados celulares y se inmunoprecipitó SlrP-3xFlag usando anticuerpos monoclonales anti-Flag. La presencia de 3xHA-Trx en el complejo de inmunoprecipitación se detectó mediante inmunoblot usando anticuerpos anti-HA. Como se observa en la **Figura R.2.2** Trx se coinmunoprecipitó con SlrP. Por otro lado, Trx no se detectó cuando se usó un suero preinmune en vez de anticuerpos anti-Flag, demostrando, una vez más, la especificidad de la interacción.

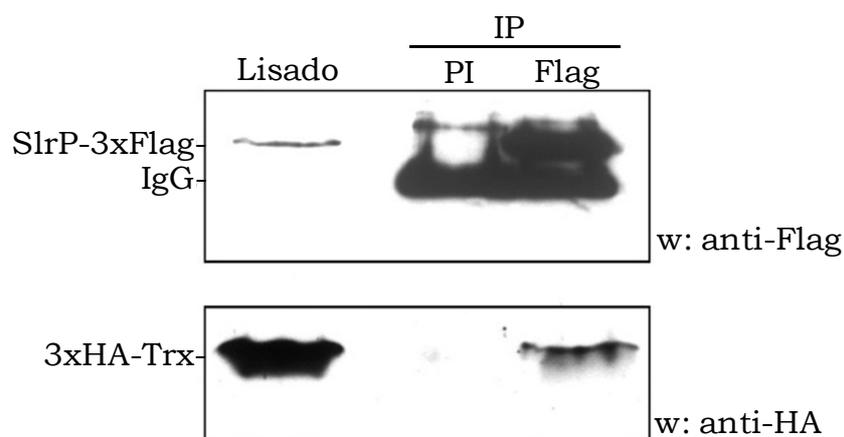


Figura R.2.2. Trx interacciona con SlrP en la célula hospedadora. Coinmunoprecipitación de SlrP y Trx humana. Se transfectaron transitoriamente cultivos de células HeLa con 5 μ g de dos derivados del plásmido pCS2, uno que expresaba la fusión SlrP-3xFlag, y el otro la fusión 3xHA-Trx. Se lisaron 9×10^6 células transfectadas con tampón de lisis NP40 y se inmunoprecipitaron (IP) con anticuerpos anti-Flag o con suero preinmune (PI). Tras varios lavados con tampón de lisis, las proteínas se eluyeron en tampón de Laemmli y se sometieron a SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa y se revelaron usando los siguientes anticuerpos: anticuerpos monoclonales anti-Flag para la parte de arriba de la membrana y anticuerpos monoclonales anti-HA para la parte de abajo. Alícuotas de extractos totales de las células transfectadas se incluyeron en el western-blot, como control de que ambas fusiones se expresaron. w: western blot; IgG: cadena pesada de la inmunoglobulina.

2.3 Colocalización de Trx y SlrP en la célula hospedadora

Como prueba adicional de la posibilidad de la interacción entre SlrP y Trx *in vivo*, se analizó la localización de ambas proteínas usando inmunofluorescencia y microscopía confocal. Se cotransfectaron células epiteliales humanas HeLa con los plásmidos pIZ1720 y pIZ1721, que expresan las fusiones SlrP-3xFlag y 3xHA-Trx, respectivamente. Las células se fijaron y se marcaron con los anticuerpos anti-Flag y anti-HA. En la **Figura R.2.3** se observa que Trx se localiza en el citoplasma y en el núcleo, mientras que SlrP se localiza exclusivamente en el citoplasma. El marcaje simultáneo de ambas proteínas muestra la colocalización parcial de ambas proteínas en el citoplasma.

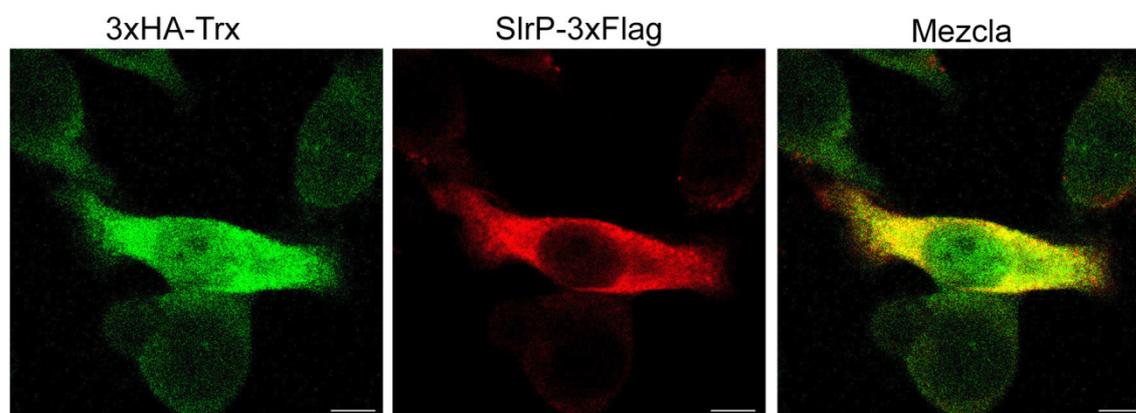


Figura R.2.3. Colocalización de SlrP y Trx en células HeLa. Células HeLa cotransfectadas con los plásmidos que expresaban las fusiones SlrP-3xFlag y 3xHA-Trx se observaron al microscopio confocal de fluorescencia tras permeabilización y marcaje con anticuerpos anti-HA (en verde, panel de la izquierda) y con anti-Flag (en rojo, panel central). La superposición de los dos marcajes se presenta en el panel de la derecha. El color amarillo indica colocalización parcial en el citosol de ambas proteínas. Barra: 10 μm .

2.4 El sitio activo de Trx no es necesario para la interacción con SlrP

Las tiorredoxinas contienen un sitio activo que contiene la secuencia conservada Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-Lys. Las dos cisteínas de esta secuencia pueden encontrarse en forma ditiol o en forma disulfuro y son importantes en la interacción con ciertos ligandos (Junn et al., 2000). Para estudiar si dicho sitio estaba implicado en la interacción con SlrP se construyó la fusión GST-Trx(C32S/C35S) (GST-TrxCS) en el que se cambiaron las cisteínas del sitio activo en las posiciones 32 y 35 por dos serinas. Se usó la estirpe de *E. coli* BL21 (DE3) para expresar y purificar las proteínas GST, GST-Trx y GST-

TrxCS. Las proteínas unidas a una matriz de glutatión-agarosa se incubaron con lisados de la estirpe SV5193, que expresa la fusión SlrP-3xFlag. Tras varios lavados, los complejos se sometieron a inmunoblot usando anticuerpos anti-Flag. Como se observa en la **Figura R.2.4**, tanto la versión silvestre de Trx como la mutante son capaces de interactuar con SlrP, lo cual sugiere que la integridad del sitio activo de Trx no es necesaria para esta interacción.

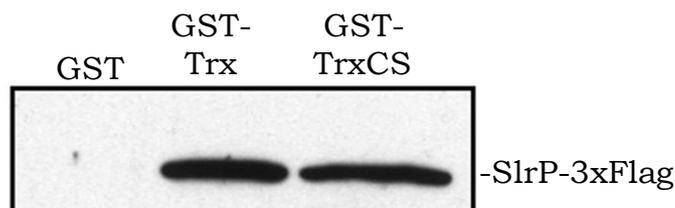


Figura R.2.4. SlrP se une a la versión mutante de Trx (C32S/C35S). Las proteínas GST, GST-Trx y GST-Trx(C32S/C35S)(GST-TrxCS) se produjeron en la estirpe BL21(DE3) de *E. coli*, se purificaron con una matriz de agarosa-glutatión y se incubaron con extractos de la estirpe SV5193 (estirpe de *S. enterica* serovar Typhimurium que expresa la fusión SlrP-3xFlag). Los precipitados se lavaron con tampón de lisis y se sometieron a inmunoblot usando anticuerpos monoclonales anti-Flag.

2.5 El peróxido de hidrógeno inhibe la unión de SlrP a Trx *in vitro*

Debido a que las tiorredoxinas son proteínas redox, se analizó si el estado de oxidorreducción de Trx influía en la interacción con SlrP. Para ello, antes de realizar el ensayo de interacción *in vitro* como se describe en la variante del **apartado 5.2 de Material y Métodos**, se trataron con H₂O₂ las proteínas GST y GST-Trx purificadas e inmovilizadas en una matriz de glutatión-agarosa. Como se observa en la **Figura R.2.5** el tratamiento con el agente oxidante redujo considerablemente la interacción. Para estudiar si el efecto del peróxido de hidrógeno era reversible, tras este tratamiento se incubaron las proteínas con el agente reductor DTT. Dicho tratamiento revirtió el efecto del H₂O₂ (**Figura R.2.5**).

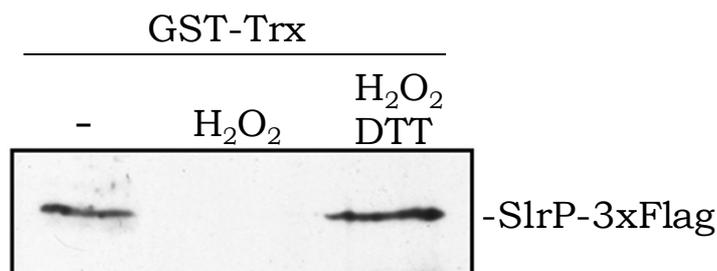


Figura R.2.5. La oxidación inhibe la interacción entre SlrP y Trx. Extractos de la fusión GST-Trx producidos en la estirpe de *E. coli* BL21(DE3), purificados e inmovilizados en una matriz de agarosa glutatión se incubaron en tampón de lisis NP40, o en el mismo tampón suplementado con H_2O_2 1 mM, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras varios lavados, las proteínas inmovilizadas se incubaron con extractos de la estirpe SV5193, que expresa la fusión SlrP-3xFlag. Tras los lavados, las proteínas se sometieron a SDS-PAGE y western con anticuerpos anti-Flag. Como control de que la oxidación era reversible, parte de las proteínas de fusión tratadas con H_2O_2 se incubaron con tampón de lisis suplementado con DTT 1 mM durante 15 minutos, tras los lavados y justo antes de la incubación con los lisados de SV5193.

2.6 SlrP es una ligasa de ubiquitina E3 que usa Trx como sustrato

En el momento en que estábamos llevando a cabo estos estudios, se publicó un artículo que demostraba que los efectores IpaH9.8 de *Shigella* y SspH1 de *Salmonella* eran ligasas de ubiquitina E3 (Rohde et al., 2007). Estas proteínas son miembros de la misma familia de efectores de SST3 que SlrP (ver **Introducción**). Por ello decidimos estudiar, por un lado, si la proteína SlrP también tenía actividad ligasa de ubiquitina y, por otro lado, si usaba su ligando Trx como sustrato susceptible de ser ubiquitinado.

La ubiquitinación es un proceso complejo en el que intervienen principalmente tres enzimas: E1, que es una enzima activadora de la ubiquitina, E2 que se une a la ubiquitina una vez activada y E3, que es la ligasa que une la ubiquitina covalentemente al sustrato. Se llevaron a cabo reacciones *in vitro* en presencia de HA-ubiquitina, E1, la enzima E2 UbcH5B y GST-SlrP, como presunta E3. El resultado de las reacciones se analizó mediante inmunoblot usando anticuerpos anti-HA, aprovechando que la ubiquitina empleada estaba etiquetada con el epítopo HA. El inmunoblot reveló la presencia de varias bandas que sólo aparecían cuando se incluía GST-SlrP en la reacción. Estas bandas coinciden en tamaño con oligómeros de HA-ubiquitina (**Figura R.2.6a, tercer carril**), indicando que SlrP puede catalizar reacciones de polimerización de ubiquitina (poliubiquitinación). Teniendo en cuenta que Trx es un ligando de SlrP se investigó si el efector

de *Salmonella* podía usar la proteína humana como sustrato susceptible de ubiquitinación. El carril 4 de la **Figura R.2.6a**, que corresponde a una reacción que lleva GST-Trx, muestra unas bandas adicionales detectadas con el anticuerpo anti-HA, que no aparecían cuando GST-Trx no se añadía a la reacción (**Figura R.2.6a, tercer carril**). El mismo filtro del experimento anterior reincubado con anti-Trx reveló la presencia de GST-Trx, en todos los casos en los que ésta fue añadida a la reacción y, además, algunas bandas por encima de GST-Trx sólo cuando GST-SlrP estaba presente (**Figura R.2.6b**). Este resultado sugiere que SlrP es una ligasa de ubiquitina que usa Trx como sustrato. Para confirmar esta hipótesis se repitieron las reacciones de ubiquitinación *in vitro* y se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-Trx. Los inmunoprecipitados se sometieron a inmunoblot usando anticuerpos anti-HA. La **Figura R.2.6c** muestra que Trx se ubiquitina sólo cuando GST-SlrP está presente en la reacción.

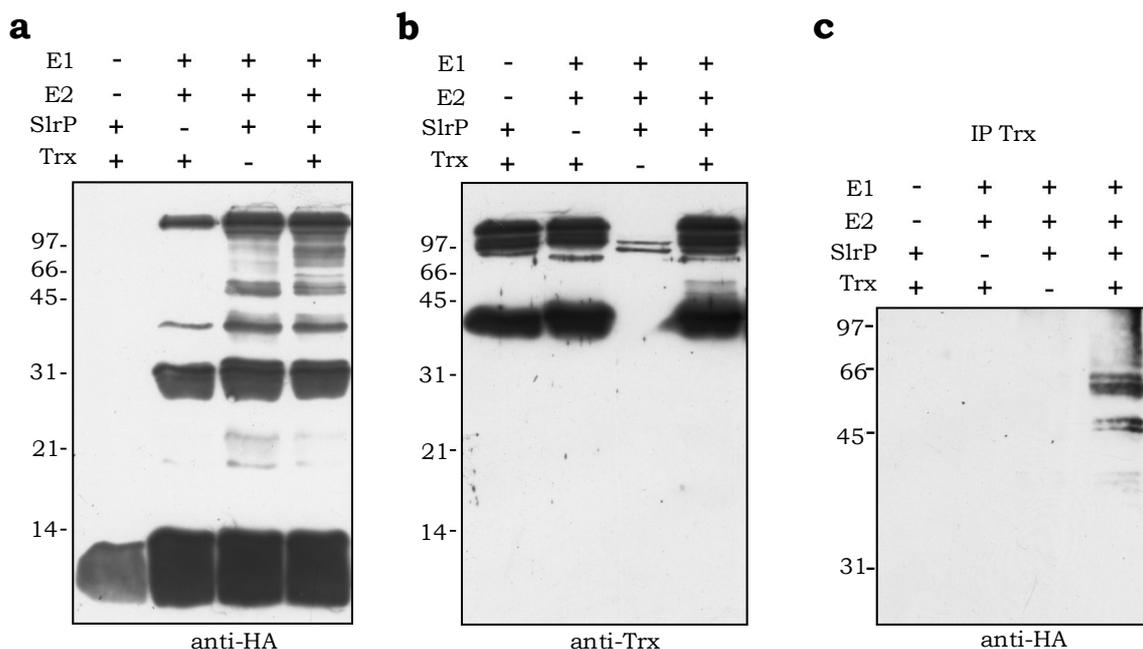


Figura R.2.6. SlrP es una ligasa de ubiquitina E3 para SlrP. a, SlrP cataliza reacciones de ubiquitinación. Reacciones de ubiquitinación *in vitro* realizadas en presencia de HA-ubiquitina, E1, UbcH5B (E2), GST-SlrP (SlrP) y GST-Trx (Trx), como se indica, se sometieron a SDS-PAGE al 15% y se analizaron mediante western blot usando anticuerpos monoclonales anti-HA. **b, SlrP ubiquitina Trx.** El filtro del experimento anterior se reincubó con anticuerpos anti-Trx. **c, la inmunoprecipitación (IP) confirma que SlrP ubiquitina Trx.** Reacciones de ubiquitinación *in vitro* realizadas en presencia de HA-ubiquitina, E1, UbcH5B (E2), GST-SlrP (SlrP) y GST-Trx (Trx), como se indica, se sometieron a inmunoprecipitación, usando anticuerpos anti-Trx. Los precipitados se resolvieron en un gel de poliacrilamida al 10 % y se analizaron mediante inmunoblot usando anticuerpos monoclonales anti-HA. El marcador de peso molecular, en kDa, se muestra a la izquierda de cada panel.

2.7 La cisteína 546 es esencial para la actividad catalítica de SlrP

Se había demostrado que una cisteína del efector IpaH9.8, que está conservada en todos los miembros de la familia, era importante para la actividad ligasa de ubiquitina (Rohde et al., 2007). Para estudiar si la cisteína correspondiente en SlrP era también importante para la actividad, se usó el mutante SlrPC546A, en el que se había sustituido la cisteína en posición 546 por una alanina, en reacciones de ubiquitinación *in vitro*. Este mutante fue incapaz de catalizar reacciones de ubiquitinación (**Figura R.2.7**), lo cual revela la importancia de este residuo en la actividad catalítica.

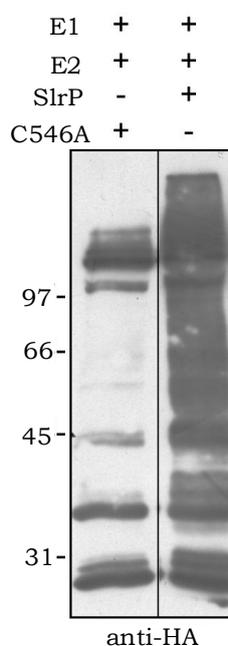


Figura R.2.7. La forma de SlrP mutada en la cisteína 546 no posee actividad ligasa de ubiquitina E3. Reacciones de ubiquitinación *in vitro* realizadas en presencia de HA-ubiquitina, E1, UbcH5B (E2) y GST-SlrP (SlrP), o GST-SlrPC546A (C546A), como se indica, fueron sometidas a SDS-PAGE al 10 % y analizadas mediante western blot usando anticuerpos monoclonales anti-HA. El marcador de peso molecular, en kDa, se muestra a la izquierda del panel.

2.8 La expresión de SlrP en células HeLa disminuye la actividad reductora de Trx

Para estudiar el efecto fisiológico de la interacción de SlrP con Trx *in vivo* se generó una línea de células HeLa transfectada establemente que expresaba la fusión SlrP-3xFlag de forma constitutiva. También se estableció

una línea estable de células HeLa transfectadas con el vector vacío, que se usó en los experimentos como control negativo. La expresión de la proteína etiquetada se confirmó mediante inmunoblot usando anticuerpos anti-Flag (**Figura R.2.8a**).

Una manera de medir la actividad de Trx se basa en la capacidad de reducción de esta enzima sobre un sustrato reducible, como por ejemplo, la insulina. Se midió la actividad de Trx en cultivos confluentes de células HeLa. Como se observa en la **Figura R.2.8b**, los cultivos celulares que expresaban SlrP presentaban una reducción de la actividad de Trx respecto a los cultivos que no expresaban SlrP. Para investigar si este fenotipo estaba relacionado con la ubiquitinación de Trx se estableció una nueva línea estable de células que expresaban la versión mutante de SlrPC546A etiquetado con 3xFlag. El nivel de expresión de la forma mutante era similar al de la forma silvestre (**Figura R.2.8a**), sin embargo, la actividad Trx en esta línea celular no era significativamente diferente a la actividad Trx que presentaba la línea transfectada con el vector vacío (**Figura R.2.8b**).

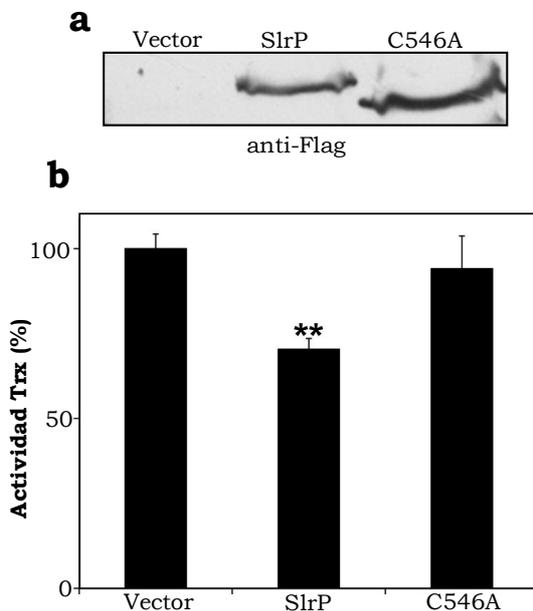


Figura R.2.8. La expresión de SlrP en células HeLa disminuye la actividad de Trx. a, expresión de SlrP-3xFlag y SlrP(C546A)-3xFlag en células HeLa transfectadas. Análisis mediante western blot con anticuerpos monoclonales anti-Flag de lisados de células HeLa transfectadas establemente con los vectores pcDNA3 (vector), pcDNA3-SlrP-3xFlag (SlrP) o pcDNA3-SlrP(C546A)-3xFlag (C546A). **b, efecto de la expresión de SlrP sobre la actividad reductora de Trx en células HeLa.** El ensayo de reducción de insulina se realizó en lisados obtenidos a partir de cultivos confluentes, como se describe en **Material y Métodos**. Las actividades Trx de las células que expresan tanto SlrP-3xFlag, como pcDNA3-SlrP(C546A)-3xFlag, se muestran relativizadas respecto al control (células transfectadas con el vector vacío), al que se le asigna el 100% de actividad. Los resultados presentados son la media de 3 experimentos independientes, con una barra de error que representa la desviación típica. Los asteriscos indican que la actividad es diferente del control para un nivel de significación de 0,01.

2.9 La expresión de SlrP aumenta la tasa de muerte en células HeLa

La tiorredoxina citosólica de mamíferos tiene importantes funciones en procesos de señalización regulados por oxido-reducción y se sabe que interviene en el control de procesos fisiológicos tales como el crecimiento, el desarrollo, la proliferación, la diferenciación, la supervivencia celular y la apoptosis (Arner y Holmgren, 2000). Por este motivo, decidimos comparar la muerte celular espontánea que se producía en cultivos confluentes de células que expresaban la fusión SlrP-3xFlag, con la que se producía en células sin SlrP. Como se observa en la **Figura R.2.9**, en los cultivos de células que expresaban SlrP se producía un aumento considerable en la citotoxicidad, en comparación con las células transfectadas con el vector vacío. Las células que expresaban la versión mutante de SlrP presentaban un porcentaje de muerte celular intermedio.

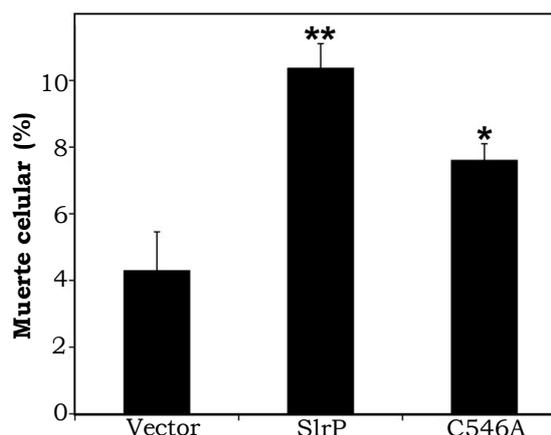


Figura R.2.9. Efecto de SlrP sobre la muerte celular. Las mismas células HeLa transfectantes del experimento anterior se cultivaron hasta la confluencia y el nivel de muerte celular se determinó midiendo la liberación de LDH, como se describe en **Material y Métodos**. Los resultados presentados son la media de 3 experimentos independientes, con una barra de error que representa la desviación típica. Los asteriscos indican que hay diferencias respecto al control con un nivel de significación de 0,05 (*) ó 0,01 (**). Las diferencias entre las células que expresan SlrP y las que expresan SlrP(C546A) también son estadísticamente significativas. ($p < 0,01$).

Los resultados descritos en los **apartados 2.8 y 2.9** sugieren que la presencia de SlrP en la célula hospedadora provoca una disminución en la actividad de Trx y vuelve a las células más propensas a la muerte celular y que estos efectos, al menos parcialmente, se deben a la actividad ligasa de ubiquitina de SlrP.

2.10 La infección de cultivos celulares por *Salmonella* disminuye la actividad de Trx y aumenta la citotoxicidad

Los efectos de SlrP en las células HeLa nos llevaron a investigar si cultivos celulares infectados por *Salmonella* presentaban un fenotipo similar respecto a actividad de Trx y citotoxicidad. Para ello, se infectaron cultivos de células HeLa con *S. enterica* serovar Typhimurium estirpe 14028 y se midió la actividad de Trx tras 8 y 16 horas de infección. Como se observa en la **Figura R.2.10a**, la actividad de Trx disminuyó en los cultivos infectados por *Salmonella*. Además, en estos cultivos la muerte celular aumentó drásticamente (**Figura R.2.10b**).

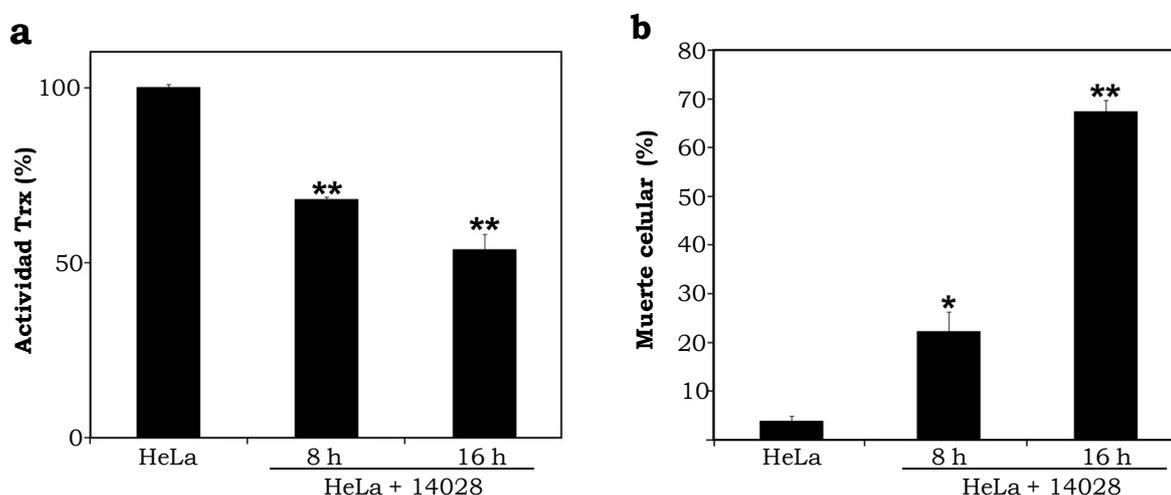


Figura R.2.10. La infección por *Salmonella* disminuye la actividad de Trx y provoca muerte celular tardía en las células epiteliales humanas HeLa. a, disminución de la actividad de Trx en células HeLa en respuesta a infección por *Salmonella*. Cultivos confluentes de células HeLa se infectaron con la estirpe 14028 de *S. enterica* serovar Typhimurium a una multiplicidad de infección de 50:1. Se prepararon lisados celulares tras 8 y 16 horas de infección y se midió la actividad Trx como se describe en **Material y Métodos**. Las actividades de Trx en células infectadas por *Salmonella* se presentan relativizadas al control (células no infectadas), al que se le asigna un 100%. Los resultados presentados son la media de 3 experimentos independientes, con una barra de error que representa la desviación típica. Los asteriscos indican que hay diferencias respecto al control para un nivel de significación de 0,01. **b, muerte de células HeLa en respuesta a infección por *S. enterica* serovar Typhimurium estirpe 14028.** La citotoxicidad de *Salmonella* en células HeLa se midió tras 8 y 16 horas de infección mediante la medida de liberación de LDH y se comparó con el nivel de muerte celular espontánea en cultivos no infectados. Los resultados presentados son la media de 3 experimentos independientes, con una barra de error que representa la desviación típica. Los asteriscos indican que hay diferencias respecto al control con un nivel de significación de 0,05 (*) ó 0,01 (**).

Capítulo 3

Análisis funcional de la interacción SlrP-ERdj3

3.1 Confirmación de la interacción SlrP-ERdj3 mediante experimentos *in vitro*

Uno de los candidatos obtenidos en el escrutinio del doble híbrido, en el que se buscaron proteínas humanas que interaccionaran con SlrP, fue ERdj3. Se trata de una chaperona de la familia Hsp40/DnaJ que reside en el lumen del retículo endoplásmico. Para confirmar el resultado obtenido en el escrutinio, decidimos llevar a cabo experimentos de copurificación *in vitro*, usando el sistema de expresión de proteínas de fusión con GST en bacterias. Se produjo la proteína recombinante ERdj3 en fusión con GST. La proteína de fusión purificada e inmovilizada en una matriz de glutatión agarosa se incubó con un lisado de la estirpe SV5193, una estirpe de *S. enterica* serovar Typhimurium que codifica una versión de SlrP etiquetada con 3xFlag. Tras varios lavados, los complejos se analizaron mediante western usando anticuerpos monoclonales anti-Flag. En la **Figura R.3.1** se observa que SlrP interaccionó con GST-ERdj3, pero no con GST, demostrándose así la especificidad de la interacción.

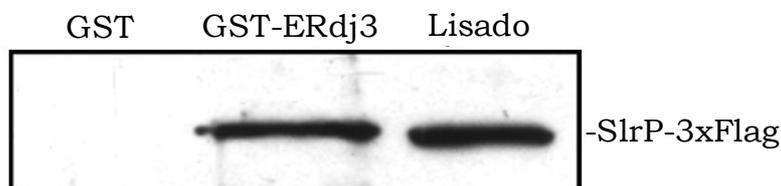


Figura R.3.1. Interacción de ERdj3 y SlrP *in vitro*. Se indujo la expresión de las proteínas GST y GST-ERdj3 tras la adición al cultivo de IPTG. Se aislaron las proteínas a partir de lisados bacterianos mediante cromatografía de afinidad con una matriz de agarosa-glutatión. 4 µg de cada proteína GST se incubó con lisados preparados a partir de 10⁹ ufc de la estirpe SV5193 de *S. enterica* serovar Thyphimurium (14028 *slrP*::3xFlag) en tampón de lisis NP40. Tras varios lavados con tampón de lisis, las proteínas se eluyeron en tampón de Laemmli y se sometieron a SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa y se revelaron usando anticuerpos monoclonales anti-Flag. Como referencia se incluye, en el último carril, una alícuota del lisado empleado en estos experimentos.

3.2 SlrP y ERdj3 interaccionan en células HeLa

Para estudiar si la interacción entre SlrP y ERdj3, descubierta con el sistema del doble híbrido y confirmada mediante ensayos *in vitro*, podía tener lugar también *in vivo*, en la célula hospedadora, decidimos llevar a cabo experimentos de coimmunoprecipitación. Las células HeLa se

cotransfectaron con dos plásmidos: uno que codificaba la fusión SlrP-3xFlag y otro que codificaba la fusión ERdj3-3xHA. Se prepararon lisados celulares y se inmunoprecipitaron usando anticuerpos anti-Flag. La presencia de ERdj3 en los complejos de inmunoprecipitación se analizó mediante western con anticuerpos anti-HA (**Figura R.3.2**). En el carril 1 del panel de la derecha de la **Figura R3.2** se puede observar cómo ERdj3 se coinmunoprecipitó junto con SlrP. Como control negativo se utilizaron extractos de células HeLa que sólo expresaban ERdj3-3xHA. En este caso no se observó ERdj3 en los complejos inmunoprecipitados. Estos resultados sugieren que la interacción entre SlrP y ERdj3 se puede dar en la célula hospedadora, confirmando, de esta manera los resultados obtenidos en el escrutinio del doble híbrido y en el sistema de expresión de fusiones GST.

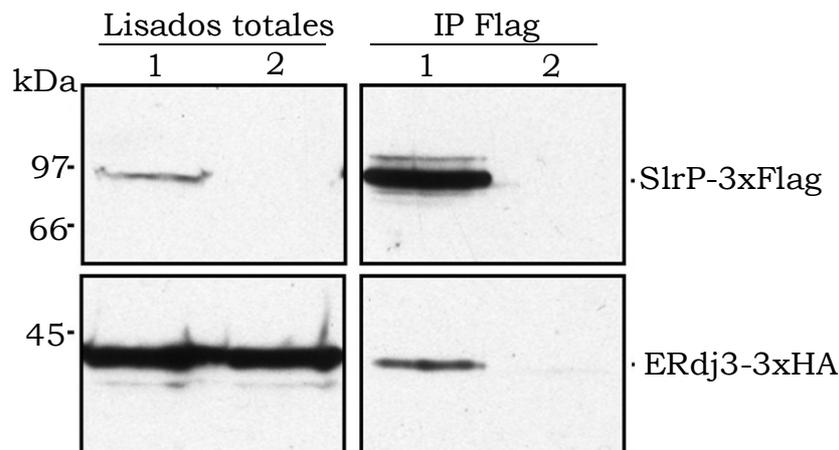


Figura R.3.2. Coinmunoprecipitación de SlrP y ERdj3. Se cotransfectaron transitoriamente, por un lado células HeLa con dos derivados del plásmido pCS2, uno que expresaba la fusión SlrP-3xFlag y otro que expresaba la fusión ERdj3-3xHA (carril 1), y por otro lado, se transfectaron células HeLa con el plásmido que expresaba la fusión ERdj3-3xHA solamente (carril 2). Se inmunoprecipitaron lisados preparados a partir de 5×10^6 células transfectadas con anticuerpos monoclonales anti-Flag (IP, paneles de la derecha) y, tras varios lavados, descritos en **Material y Métodos**, los precipitados se eluyeron en tampón de Laemmli y se sometieron a SDS-PAGE. Las proteínas se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa y se revelaron usando los siguientes anticuerpos: anticuerpos monoclonales anti-Flag para los paneles superiores y anticuerpos monoclonales anti-HA para los paneles inferiores. En los paneles de la izquierda se muestran alícuotas de los lisados totales usados en el experimento correspondientes a 5×10^5 células transfectadas.

3.3 El dominio II de ERdj3 es esencial para la asociación con SlrP

La proteína ERdj3 contiene una secuencia señal en el extremo amino terminal necesaria para su localización en el retículo endoplásmico. Dicho péptido señal está ausente en la forma madura de la proteína. ERdj3

también posee un dominio J, mediante el cual se une a BiP, una chaperona del retículo endoplásmico de la familia Hsp70/DnaK, un motivo rico en glicina y fenilalanina (G/F), y un fragmento carboxilo terminal, mediante el cual se une a los sustratos desnaturalizados. El fragmento carboxilo terminal contiene 3 dominios llamados I, II y III. El dominio I está interrumpido por el dominio II, que lo divide en dominio Ia y Ib. El dominio II es un dominio rico en cisteínas típico de las proteínas DnaJ tipo I. En la **Figura R.3.3** se muestra un esquema de ERdj3 en el que se representan los distintos dominios. De acuerdo con los límites de los dominios definidos previamente (Jin et al., 2009) se construyeron mutantes, desde ERdj3-1 hasta ERdj3-6, en los que se deleccionaron secuencialmente los distintos dominios de la proteína. El mutante 1 se corresponde con la forma madura de la proteína sin el péptido señal. El mutante 6 se corresponde con el dominio III más los 30 aminoácidos del extremo carboxilo terminal. En la **Figura R.3.3** se puede apreciar la composición de cada construcción.

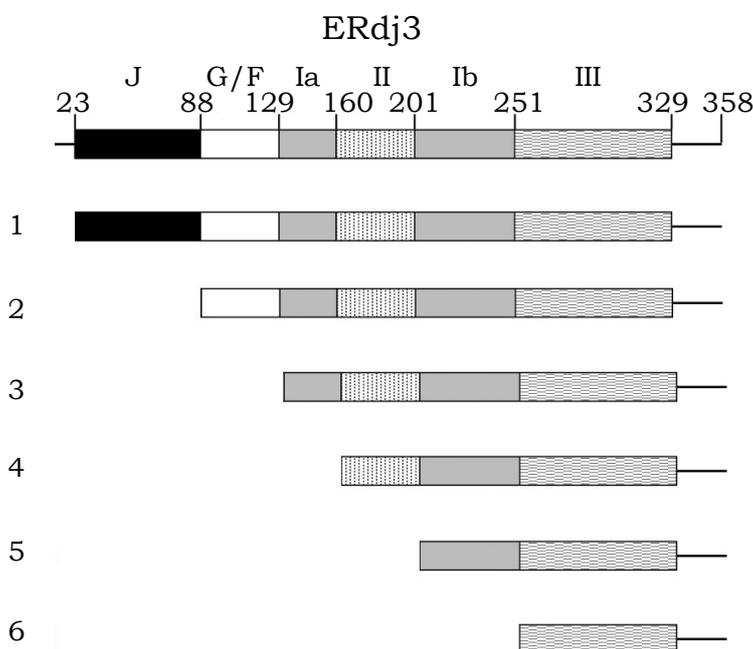


Figura R.3.3. Diagrama de los distintos dominios de la chaperona ERdj3, tanto de la versión completa, como de las distintas versiones truncadas (1-6). Los dominios de ERdj3 se indican como J, dominio J; G/F, dominio rico en glicina y fenilalanina; Ia, dominio Ia; II, dominio II; Ib, dominio Ib; III, dominio III. Esquema adaptado de (Jin et al., 2009).

Se realizaron dos tipos de experimentos para determinar qué dominios de ERdj3 eran importantes para la interacción con SlrP.

3.3.1 Doble híbrido

Las distintas versiones mutantes del ADNc que codifica ERdj3, descritas anteriormente, se clonaron en el vector de expresión en levaduras pGADT7 y se analizó si interaccionaban con SlrP en el sistema del doble híbrido. En la **Figura R.3.4** se muestran los resultados obtenidos. Todas las construcciones, excepto la 5 y la 6 dieron positivo en el ensayo. Ambas construcciones carecen del dominio II, por lo que podemos concluir que dicho dominio es esencial para la interacción con SlrP. Como controles negativos se usaron las levaduras que contenían los vectores vacíos (**última fila y última columna de la Figura R.3.4**) También se usó una versión mutante de SlrP en el que la cisteína 546 se cambió por una alanina. Esta forma de SlrP, que es catalíticamente inactiva, presentó el mismo patrón de unión con las construcciones de ERdj3 que la forma silvestre (**Figura R.3.4, segunda columna**).

	DB-SlrP			AD-ERdj3
	SlrP	C546A	-	
				1
				2
				3
				4
				5
				6
				-

Figura R.3.4. Interacción del efector de *Salmonella* SlrP con la proteína humana ERdj3 puesta de manifiesto mediante el sistema del doble híbrido. Se obtuvieron diploides mediante conjugación entre las estirpes AH109, que contenían derivados del plásmido pGBT10 (DB-SlrP), e Y187, que contenía variantes del plásmido pGADT7 (AD-ERdj3), como se indica. La interacción entre las dos proteínas híbridas se muestra mediante el crecimiento en ausencia de histidina y adenina. DB, fusión con el dominio de unión al ADN de Gal4; fusión con el dominio de activación de Gal4; SlrP, fusión DB-SlrP, C546A, fusión DB-SlrP(C546A) (versión mutante de SlrP que lleva alanina en vez de cisteína en la posición 546); 1-6, corresponde a los subclones ERdj3-1 a ERdj3-6 representados en la **Figura R.3.3**; -, vectores vacíos.

3.3.2 Fusiones GST

Los derivados delecionados de ERdj3 se expresaron también en fusión con GST para llevar a cabo experimentos de interacción con SlrP *in vitro* (ver **apartado 3.1**). Al igual que en el experimento anterior, los mutantes 1 al 4 fueron capaces de interactuar con SlrP, no así, los mutantes 5 y 6 (**Figura R.3.5, panel superior**). El tamaño y la cantidad de las proteínas quiméricas usadas en el ensayo de unión fueron estimados mediante tinción reversible del filtro de nitrocelulosa con Rojo Ponceau S (**Figura R.3.5, panel inferior**).

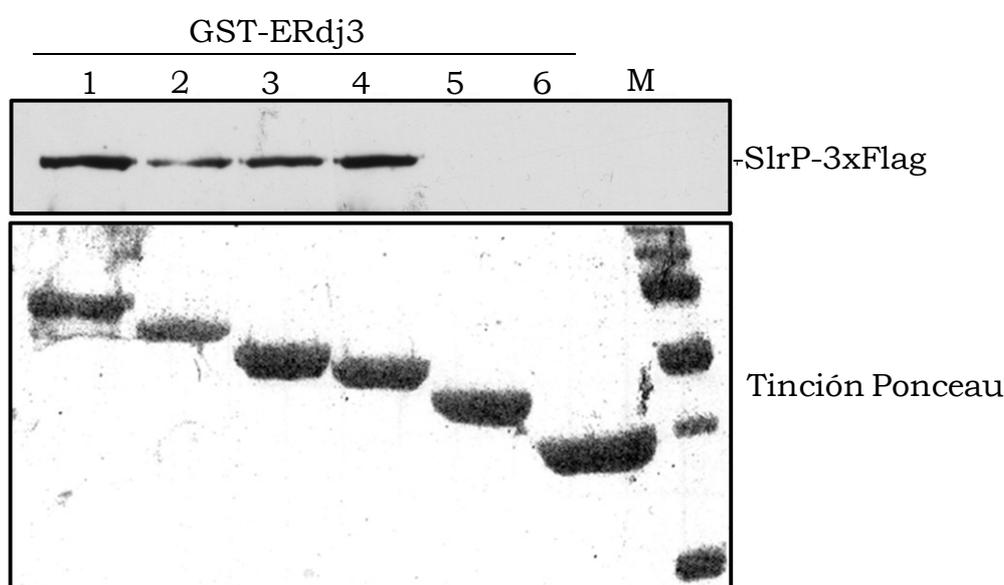


Figura R.3.5. El dominio II de ERdj3 es esencial para la interacción con SlrP. Las versiones mutantes de ERdj3 desde la 1 a la 6 (ver **Figura R.3.3**) se expresaron en fusión con GST y se usaron para hacer experimentos de interacción con lisados de la estirpe SV5193, estirpe 14028 de *S. enterica* serovar Typhimurium que expresa la fusión SlrP-3xFlag, como el descrito en la **Figura R.3.1**. M, marcador de peso molecular: las bandas visibles corresponden a 150, 100, 75, 50, 37 y 25 kDa.

Estos resultados confirman que ERdj3 se asocia con SlrP y que el dominio II de la chaperona es esencial para dicha interacción.

3.4 SlrP se localiza parcialmente en el retículo endoplásmico

Está descrito que SlrP, cuando se expresa en células de mamífero, presenta una distribución uniforme por el citoplasma ((Haraga y Miller, 2003) y **Figura R.2.3**). Por otro lado, ERdj3 se localiza exclusivamente en el retículo endoplásmico (Nakanishi et al., 2004) . Por tanto, la interacción

descrita anteriormente, sólo podría ocurrir *in vivo* si SlrP se localizara, al menos parcialmente, en el retículo endoplásmico. Este razonamiento nos llevó a analizar la localización subcelular de SlrP. Se llevó a cabo este estudio mediante dos métodos independientes:

3.4.1 Experimentos de inmunofluorescencia y microscopía confocal

Se transfectaron células HeLa con los plásmidos que expresaban las fusiones SlrP-3xFlag y ERdj3-3xHA. Se estudió la localización subcelular mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Como se ve en la **Figura R.3.6**, aunque SlrP se distribuye por todo el citoplasma, se observa colocalización con ERdj3 en el retículo endoplásmico.

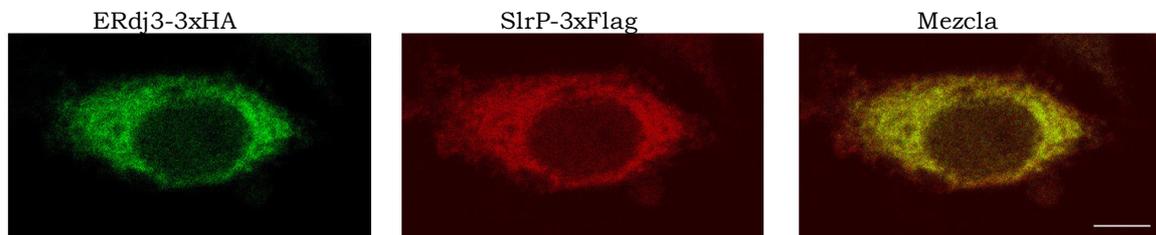


Figura R.3.6. Colocalización de SlrP y ERdj3 en células HeLa. Células HeLa cotransfectadas con los plásmidos que expresaban las fusiones SlrP-3xFlag y ERdj3-3xHA se observaron al microscopio confocal de fluorescencia tras permeabilización y marcaje con anticuerpos anti-HA marcado con Alexa Fluor 488 (en verde, panel de la izquierda) y con anti-Flag conjugado con Cy3 (en rojo, panel central). La superposición de los dos marcajes se presenta en el panel de la derecha. El color amarillo indica colocalización parcial en el retículo endoplásmico de ambas proteínas. La barra se corresponde con 10 μm .

3.4.2 Fraccionamiento celular

Para confirmar el resultado anterior, cultivos de células HeLa que expresaban establemente la fusión SlrP-3xFlag se sometieron a fraccionamiento subcelular mediante centrifugación diferencial, hasta obtener la fracción microsómica (que proviene del retículo endoplásmico). La presencia de las proteínas se detectó mediante western usando anticuerpos anti-Flag y anti-ERdj3. Al comparar con los extractos totales, se observó que ERdj3 se localizaba, como era de esperar, en los microsomas. Lo más interesante es que en esta fracción también se detectó una parte de SlrP (**Figura R.3.7**). La ausencia de Trx, que es una proteína citosólica y nuclear, de la fracción microsómica sirvió para confirmar la pureza de dicha fracción.

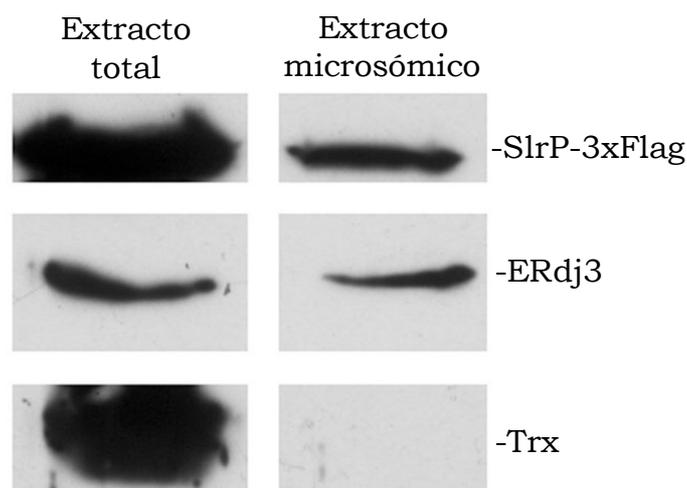


Figura R.3.7. Detección de SlrP en el retículo endoplásmico de células HeLa transfectadas. Se prepararon extractos totales (paneles de la izquierda) y extractos microsómicos (paneles de la derecha) a partir de 10^7 células HeLa transfectadas establemente que expresaban la fusión SlrP-3xFlag. Los extractos se sometieron a SDS-PAGE al 15 %. Las proteínas se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa y se revelaron usando anticuerpos monoclonales anti-Flag, para detectar la proteína SlrP. El mismo filtro se incubó con los anticuerpos policlonales anti-ERdj3 y anti-Trx, para detectar las proteínas endógenas ERdj3 y Trx, respectivamente y así tener un control de la pureza de la fracción microsómica.

Las proteínas que se localizan en el retículo endoplásmico requieren un péptido señal en el extremo amino terminal que es eliminado tras la translocación de la proteína al compartimento celular (Martoglio y Dobberstein, 1998). La presencia de dicha secuencia señal en SlrP daría lugar a dos productos proteicos de diferente peso molecular, uno en el citosol y otro en el retículo endoplásmico. Para poner a prueba esta predicción, comparamos las fracciones citosólicas y microsómicas de células HeLa que expresaban la fusión SlrP-3xFlag mediante western usando anticuerpos anti-Flag. Las proteínas se separaron en un gel de poliacrilamida al 10 % para conseguir una buena resolución de las formas de SlrP. En la **Figura R.3.8** se observa que la versión citosólica de SlrP presenta un mayor tamaño que la observada en la fracción de microsomas.



Figura R.3.8. Comparación de la migración de SlrP presente en las fracciones citosólica y microsómica en células HeLa transfectadas. Se obtuvieron las fracciones citosólica (10^6 células) y microsómica (10^7) a partir de cultivos de células HeLa transfectadas establemente y que expresaban la fusión SlrP-3xFlag. Ambas fracciones se sometieron a SDS-PAGE al 10 %. Las proteínas se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa y se revelaron usando anticuerpos monoclonales anti-Flag, para detectar la proteína SlrP.

3.5 SlrP interfiere con la función de ERdj3 por una vía independiente de la ubiquitinación

Está descrito que ERdj3 interacciona con BiP, una chaperona del retículo endoplásmico de la familia Hsp70/DnaK, y que estimula su actividad ATPasa (Yu et al., 2000). También se sabe que ERdj3 es capaz de unirse directamente a sustratos desnaturalizados (Jin et al., 2009). Planteamos la hipótesis de que la interacción entre SlrP y ERdj3 podría, de alguna manera, alterar la función de la chaperona. Para probar nuestra hipótesis llevamos a cabo diversos estudios:

3.5.1 Efecto de SlrP en la interacción entre ERdj3 y BiP

Para estudiar la interacción entre ambas chaperonas, según un método descrito previamente (Yu et al., 2000), usamos las fusiones GST-ERdj3-1 (versión madura de ERdj3), GST-ERdj3-3 (versión que carece del dominio J) y 6His-BiP. Como se observa en la **Figura R.3.9**, 6His-BiP fue capaz de unirse a GST-ERdj3-1, pero no a GST-ERdj3-3. Dicha unión era dependiente de ATP. Cuando se añadió a la reacción GST-SlrP no se observó ningún efecto. Este resultado demuestra que el dominio J de ERdj3 es imprescindible para la interacción con BiP y que SlrP no altera dicha interacción.

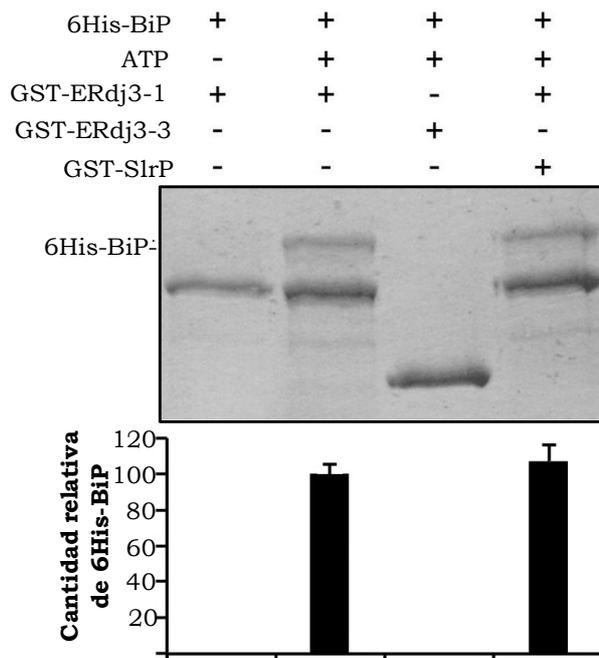


Figura R.3.9. Interacción entre ERdj3 y BiP. 50 μ g de GST-ERdj3-1 (aminoácidos 23 a 358) o GST-ERdj3-3 (aminoácidos 129 a 358) inmovilizados en agarosa-glutatin se incubaron en presencia de 50 μ g de 6His-BiP en presencia o ausencia de 1 mM de ATP y 50 μ g de GST-SlrP, como se indica. Tras la incubación durante 2 horas a 4°C, la matriz se lavó varias veces con tampón de unión. Las proteínas se eluyeron hirviendo las muestras 5 minutos en tampón de Laemmli, se sometieron a SDS-PAGE al 10 % y se tiñeron con azul de Coomassie. En la figura se muestra un gel teñido y una gráfica donde se representa la cuantificación de bandas de 6His-BiP. Dicha cuantificación es la media de dos experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación típica.

3.5.2 Efecto de SlrP sobre la capacidad de ERdj3 de inducir la actividad ATPasa de BiP

Se llevaron a cabo reacciones *in vitro* con 6His-BiP, en presencia o ausencia de las fusiones GST-ERdj3-1 y GST-SlrP. Como forma de medir la actividad ATPasa cuantificamos la cantidad de fosfato liberado a partir del ATP presente en cada reacción (ver **Material y Métodos**). Como se observa en la **Figura R.3.10** se detectó algo de liberación de fosfato aun en ausencia de BiP, probablemente debido a liberación espontánea en la preparación de ATP. La presencia de BiP en la reacción aumentó la concentración de fosfato liberado y, finalmente, ERdj3 fue capaz de estimular la actividad ATPasa de BiP, independientemente de la presencia o no de SlrP en la reacción. Por tanto, podemos afirmar que SlrP no tiene ningún efecto sobre la capacidad de ERdj3 de estimular la actividad ATPasa de BiP.

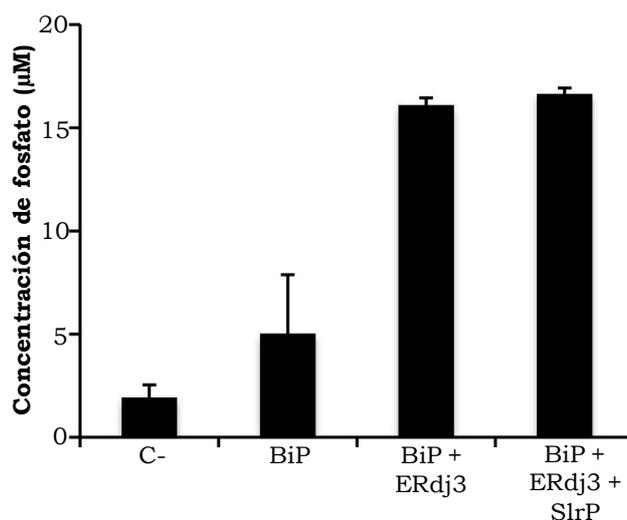


Figura R.3.10. Estimulación de la actividad ATPasa de BiP por ERdj3. Se realizaron ensayos de actividad ATPasa en presencia y en ausencia de BiP, GST-ERdj3-1 y GST-SlrP. C-, sólo lleva ATP en el tampón apropiado; BiP, lleva, además, 1 µg de 6His-BiP más 2,5 µg de GST; BiP+ERdj3, 1 µg de 6His-BiP más 2,5 µg de GST-ERdj3-1, más 2,5 µg de GST; BiP+ERdj3+SlrP, 1 µg de 6His-BiP más 2,5 µg de GST-ERdj3-1, más 2,5 µg de GST-SlrP. La cantidad de fosfato liberado se midió tras incubación a 25°C durante 75 minutos mediante un método no radioactivo (ver **Material y Métodos**). Los valores presentados son el resultado de 3 experimentos independientes. Se incluyen barras de error que representan la desviación típica.

3.5.3 Efecto de SlrP sobre la capacidad de ERdj3 de unirse a sustratos desnaturalizados

ERdj3 es una chaperona que ayuda a BiP a plegar proteínas desnaturalizadas estimulando su actividad ATPasa (Yu et al., 2000), pero también es capaz de unirse directamente a sustratos desnaturalizados (Jin et al., 2009). Uno de esos sustratos a los que se une ERdj3 es la tiroglobulina desnaturalizada (dTg) (Marcus et al., 2007). Se llevó a cabo un análisis de la interacción entre ERdj3 y su sustrato desnaturalizado en presencia o ausencia de SlrP. Extractos totales de células HeLa que expresaban transitoriamente la fusión ERdj3-3xHA se incubaron con dTg inmovilizada en una matriz de agarosa. En la **Figura R.3.11a** se observa, como era de esperar, que una fracción de ERdj3 se unió a dTg. Como control negativo, se llevó a cabo el mismo ensayo usando como sustrato proteína A nativa, en vez de dTg. En este caso no se observó interacción. Cuando se realizó el experimento en presencia de un extracto de células HeLa que expresaban SlrP-3xFlag la cantidad de ERdj3 que se unía a dTg se redujo significativamente (**Figura R.3.11b**). Se repitió el experimento usando un

extracto de células que expresaban una versión mutante de SlrP, en la que la cisteína de la posición 546, un residuo necesario para la actividad ligasa de ubiquitina (ver **capítulo 2**) se sustituyó por una alanina. El resultado de este experimento fue similar al obtenido con la forma silvestre del efector de *Salmonella*. Como control negativo se usaron extractos de células HeLa sin transfectar con los que no se observó ningún efecto.

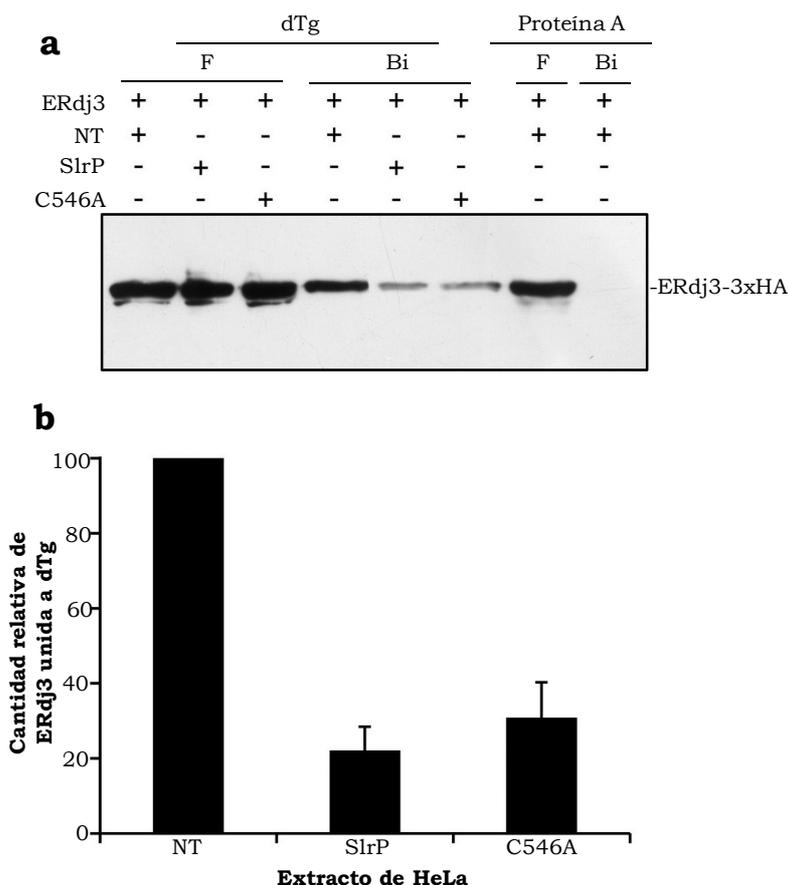


Figura R.3.11. SlrP influye en la capacidad de ERdj3 de unirse a sustratos desnaturalizados. a, unión de ERdj3 a dTg. Se mezclaron lisados de células HeLa transfectadas transitoriamente que expresaban la fusión ERdj3-3xHA con lisados de células HeLa no transfectadas (NT), con lisados de células que expresaban la fusión SlrP-3xFlag, o con lisados de células que expresaban la versión mutante SlrPC546A (C546A). Dichas mezclas se incubaron con dTg, o con proteína A nativa, ambas inmovilizadas en una matriz de agarosa. Tras varios lavados con tampón de lisis, las proteínas unidas a la matriz (Bi) se eluyeron hirviéndolas en tampón de Laemmli, se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa. Las proteínas se revelaron usando anticuerpos monoclonales anti-HA. En el gel también se incluyeron alícuotas de los sobrenadantes obtenidos tras las incubaciones (F). **b, cuantificación de la cantidad relativa de ERdj3 unida a dTg.** Los valores presentados son el resultado de 3 experimentos independientes.

Los resultados presentados en este apartado sugieren que la interacción entre SlrP y ERdj3 podría tener un efecto fisiológico al disminuir la capacidad de la chaperona de unirse a sustratos desnaturalizados y que este efecto es independiente de la actividad ligasa de ubiquitina de SlrP.

Capítulo 4

Análisis estructural de SlrP y del complejo SlrP-Trx

El análisis estructural de proteínas mediante métodos cristalográficos es una herramienta clave para la comprensión de los mecanismos moleculares que dirigen las interacciones proteína-proteína y de su función. Recientemente se ha llevado a cabo el estudio de la estructura de efectores y otros elementos estructurales de los SST3. En particular, se ha resuelto la estructura de IpaH3 y SspH2 (Quezada et al., 2009; Singer et al., 2008; Zhu et al., 2008), dos efectores de la familia de SlrP que también poseen actividad ligasa de ubiquitina. Como parte del estudio funcional de SlrP, nos planteamos llevar a cabo el análisis estructural de este efector. Dada las similitudes que eran de esperar con las estructuras ya resueltas de IpaH3 y SspH2, podía ser de mayor interés tratar de analizar la estructura del complejo de SlrP con uno de los ligandos descubiertos en esta Tesis, la Trx humana. Esta parte del trabajo se llevó a cabo en colaboración con el grupo dirigido por Sylvie Nessler en el *Laboratoire d'Enzymologie et Biochimie Structurales* (LEBS) del CNRS en Gif-sur-Yvette (Francia). A continuación se describe el proceso general que se emplea para tratar de resolver la estructura de una proteína o un complejo proteico. En los siguientes apartados se describen los experimentos concretos que se han realizado y los resultados obtenidos en este trabajo.

4.1 Clonaciones en pQE30

El primer paso consiste en etiquetar las proteínas con una cola de 6 histidinas (6His) en el extremo amino terminal para su posterior purificación. A diferencia de otras etiquetas (por ejemplo GST), la pequeña cola de histidinas no suele dificultar el crecimiento de cristales de proteína. Además, para los ensayos de cristalización se necesitan muestras de proteínas muy puras, lo cual se consigue de manera eficiente usando cromatografía de afinidad por iones metálicos (*IMAC*). Para las clonaciones, se amplificó la secuencia codificante de cada gen mediante PCR usando los oligonucleótidos *trxpqe30Bam5'* y *trx3'* para *trx* y los oligonucleótidos *slrppqe5'* y *slrpgst3'* para *slrP*. Los fragmentos de ADN obtenidos se cortaron con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal*II y se ligaron con el vector pQE30 (Qiagen), digerido con las mismas enzimas, para construir los plásmidos

pIZ1750 (pQE30-Trx) y pIZ1776 (pQE30-SlrP), que expresan las proteínas Trx y SlrP, respectivamente, en fusión con 6-His en sus extremos amino terminales.

Para probar que las fusiones se expresaban correctamente y que eran solubles, se indujo la expresión de ambas proteínas con 1 mM de IPTG durante 4 horas en cultivos de *E. coli* M15/pREP4 con los plásmidos pIZ1750 o pIZ1776 creciendo en fase exponencial ($DO_{600} = 0.8$). Se prepararon extractos totales (antes y después de la inducción con IPTG) y extractos solubles según se explica en la sección **Material y Métodos**. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE y se visualizaron las proteínas mediante tinción con azul de Coomassie (**Figura R.4.1**). Tanto la expresión como la solubilidad de la fusión 6His-Trx (15 kDa) resultaron ser muy buenas. En cambio, la fusión 6His-SlrP (80 kDa) no se expresaba de manera apropiada. Tampoco se consiguió al ensayar diversas condiciones de inducción y distintas estirpes bacterianas (datos no mostrados).

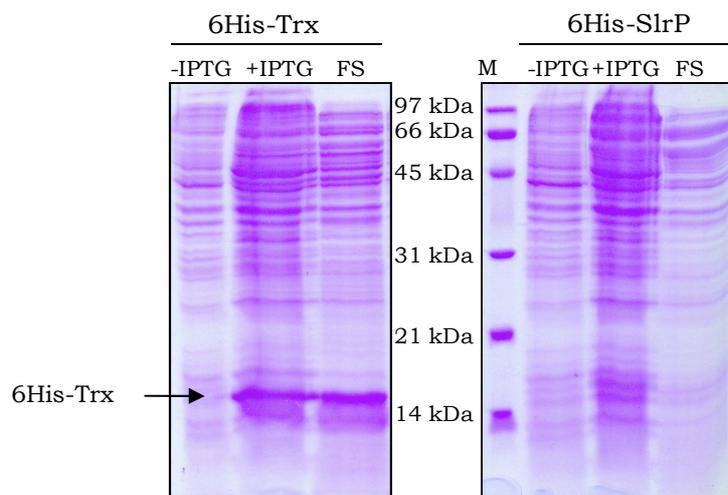


Figura R.4.1. Expresión de las fusiones 6His-Trx y 6His-SlrP. Se prepararon extractos totales y extractos solubles de la estirpe M15/pREP4 que expresaba la fusión 6His-Trx o la fusión 6His-SlrP, tras inducir durante 4 horas con IPTG 1mM. Las proteínas se eluyeron en tampón de Laemmli y se sometieron a SDS-PAGE. Se incluyeron alícuotas de extractos de ambos cultivos sin inducir. . -IPTG, extracto total antes de inducir; +IPTG, extracto total después de inducir; FS, extracto soluble después de inducir; M, marcador de peso molecular.

Se decidió, por tanto, probar otra estrategia que consistió en producir dos fragmentos de SlrP por separado. Por un lado se clonó el fragmento de *slrP* que codifica los 140 primeros residuos de la proteína, donde se encuentra la secuencia necesaria para la translocación a través del SST3

(pIZ1782) y, por otro lado, se clonó el resto del gen, correspondiente al dominio LRR y al dominio carboxilo terminal de la proteína, donde reside la actividad ligasa de ubiquitina (pIZ1784). De esta manera, se obtuvieron las fusiones 6His-N-SlrP (15 kDa) y 6His-SlrP-C (65 kDa), respectivamente. Se analizó la expresión de las nuevas fusiones con resultados positivos (**Figura R.4.2**).

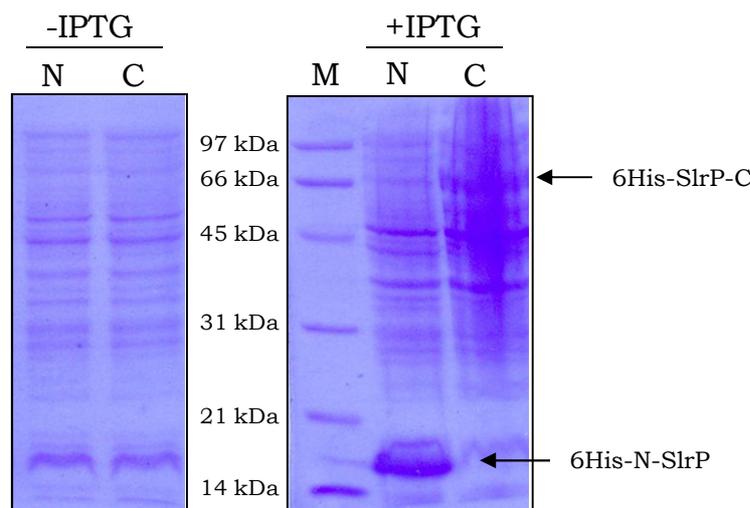


Figura R.4.2. Expresión de las fusiones 6His-N-SlrP y 6His-SlrP-C. Se obtuvieron extractos totales de cultivos de M15/pREP4 que expresaban las fusiones 6His-N-SlrP y 6His-SlrP-C antes y después de inducir con IPTG 1 mM. Las proteínas se eluyeron en tampón de Laemmli y se sometieron a SDS-PAGE. N, fusión 6His-N-SlrP; C, fusión 6His-SlrP-C; M, marcador de peso molecular.

4.2 Purificaciones de 6His-Trx, 6His-N-SlrP y 6His-SlrP-C

Antes de realizar la producción de las proteínas a gran escala con vistas a su cristalización, se llevaron a cabo ensayos de purificación a pequeña escala para optimizar el proceso. Todas las proteínas se expresaron en la estirpe de *E. coli* M15 que portaba el plásmido pREP4. Este plásmido produce altos niveles del represor LacI^q, lo que impide la producción de las proteínas de fusión 6His a partir del ADN clonado bajo el Plac presente en pQE30. Por ese motivo, para la expresión se requiere la adición de IPTG al medio de cultivo. La composición de los distintos tampones y de los medios de cultivo se encuentra en la sección **Material y Métodos**.

4.2.1 Purificaciones a pequeña escala

a) Purificación de Trx

Se siguió el protocolo descrito en el **apartado 4.3.2a** de **Material y Métodos**, manteniendo los cultivos a 37°C. Una muestra de 5 µl de proteína inmovilizada se sometió a SDS-PAGE. Las proteínas se detectaron mediante tinción con azul de Coomassie (**Figura R.4.3**)

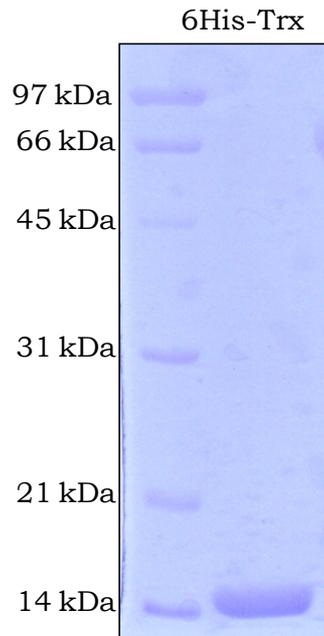


Figura R.4.3. Purificación a pequeña escala de Trx. La fusión 6His-Trx se produjo en la estirpe M15/pREP4 tras la inducción con 1 mM de IPTG. Se obtuvieron lisados en tampón de lisis fosfato y se incubaron con una matriz de agarosa-níquel. Tras varios lavados con tampón de lisis, las proteínas se eluyeron en tampón de Laemmli y se sometieron a SDS-PAGE. El marcador de peso molecular, en kDa, se muestra a la izquierda del panel.

b) Purificaciones de N-SlrP y SlrP-C

Las purificaciones de los dos fragmentos de SlrP etiquetados con la cola de histidina se realizaron en las mismas condiciones que para la purificación de Trx, con la diferencia de que el tampón de lisis fue tampón Tris-HCl con NP40 y la temperatura de inducción fue de 30°C, para mejorar la solubilidad (**Figura R.4.4**)

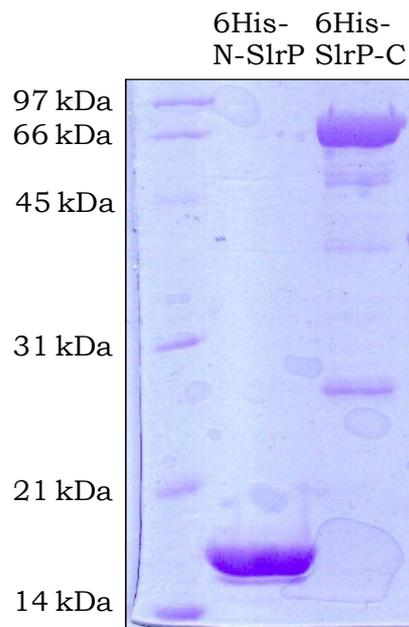


Figura R.4.4. Purificaciones de las fusiones 6His-N-SlrP y 6His-SlrP-C a pequeña escala. Las fusiones 6His-N-SlrP y 6His-SlrP-C se produjeron en la estirpe M15/pREP4 tras la inducción con 1 mM de IPTG. Se obtuvieron lisados en tampón de lisis NP40 y se incubaron con una matriz de agarosa-níquel. Tras varios lavados con tampón de lisis, las proteínas se eluyeron en tampón de Laemmli y se sometieron a SDS-PAGE. El marcador de peso molecular, en kDa, se muestra a la izquierda del panel.

4.2.2 Purificaciones a gran escala

Para los ensayos de cristalización se hace indispensable partir de una muestra homogénea de proteína considerablemente concentrada. Por este motivo se hace necesario un proceso de purificación a gran escala, partiendo de grandes volúmenes de cultivo (1 ó 2 litros). Además, se debe obtener una muestra de proteína suficientemente pura, que esté libre de otras proteínas contaminantes. Para ello, se realiza un proceso de purificación en dos pasos, según se describe en el **apartado 4.3.2b de Material y Métodos**.

a) Purificación de Trx

Se indujo la expresión de la proteína con 1 mM de IPTG durante 4 horas a 37°C. Se obtuvieron 3 gramos de sedimento por litro de cultivo que se lisaron mediante sonicación en tampón de lisis fosfato. La curva del primer paso de purificación mediante cromatografía de afinidad por níquel presentaba un pico de elución bastante claro. Las muestras que comprendían dicho pico se recogieron y se inyectaron en la columna de exclusión molecular. Sorprendentemente, la proteína no se eluyó según su

peso molecular, sino que salió repartida por todas las fracciones recogidas. Por tanto, la proteína se encontraba diluida y junto con los contaminantes que quedaban tras el primer paso de purificación. Este resultado podía deberse al tampón usado durante la purificación. Además, teniendo en cuenta que Trx es una proteína redox, el estado de oxidorreducción de la misma podría influir en la afinidad por la columna de exclusión molecular. Por estos motivos, decidimos repetir la purificación usando el tampón de lisis A (**apartado 4.3 de Material y Métodos**) suplementado con 5 mM de β -mercaptoetanol, un agente reductor, que mantendría la proteína en estado reducido. Tras estas modificaciones se obtuvo una muestra de Trx de alta pureza y concentración (**Figuras R.4.5 y R.4.7**). La proteína se eluyó como monómeros de 12 kDa, según el calibrado de la columna (**Figura R.4.6**). La Trx se produjo a un rendimiento de 22,56 mg/litro de cultivo y se concentró hasta 28,2 mg/ml (2,13 mM) en tampón Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM y β -mercaptoetanol 5 mM. La concentración de las proteínas se calculó aplicando la ley de Lambert-Beer: $A = \epsilon \cdot l \cdot C$, donde A, es la absorbancia; ϵ , el coeficiente de extinción molar; l, la longitud de la cubeta; y C, la concentración de la proteína. El ϵ de 6His-Trx es 0,531.

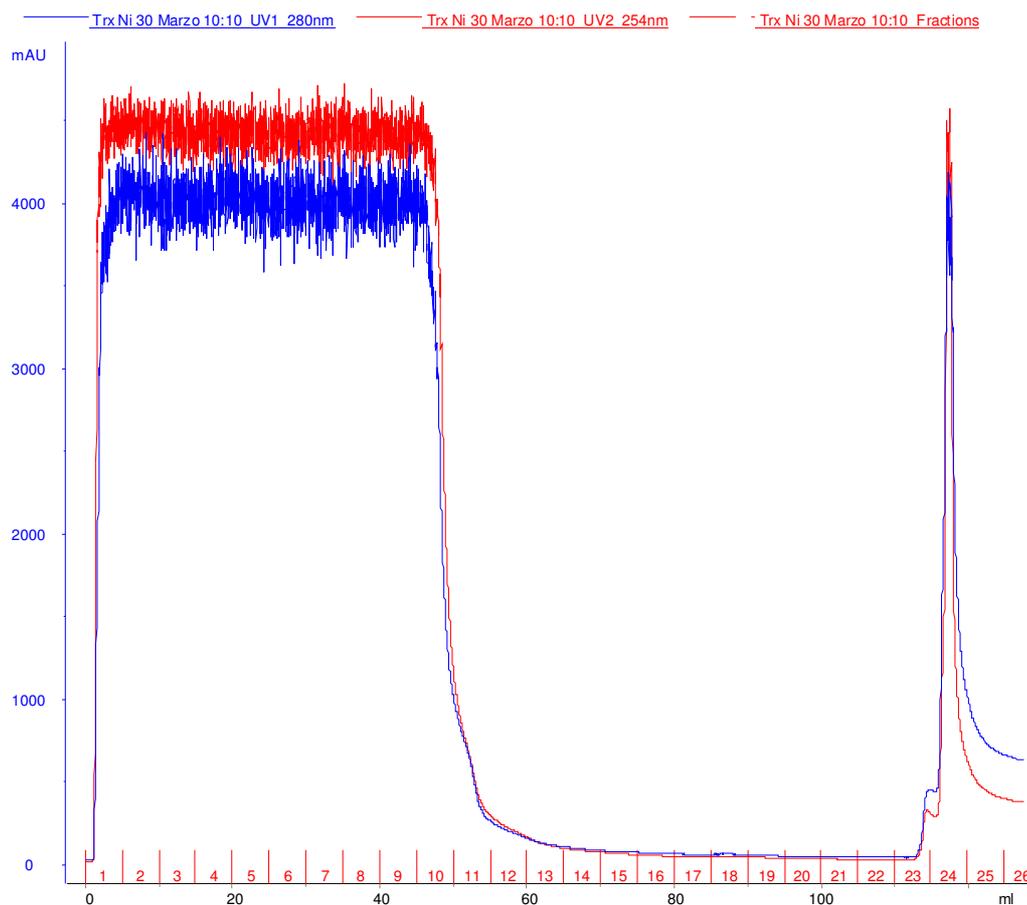


Figura R.4.5 Purificación de 6His-Trx mediante IMAC. Extractos solubles de la estirpe *E. coli* M15/pREP4 con el plásmido pIZ1750 se sometieron a cromatografía de afinidad sobre una matriz de Ni-NTA. La columna se lavó intensamente con tampón de lisis suplementado con β -mercaptoetanol 5 mM, para eliminar contaminantes, y las proteínas se eluyeron con el mismo tampón suplementado con 300 mM de imidazol. Línea azul, DO_{280} ; línea roja, DO_{254} .

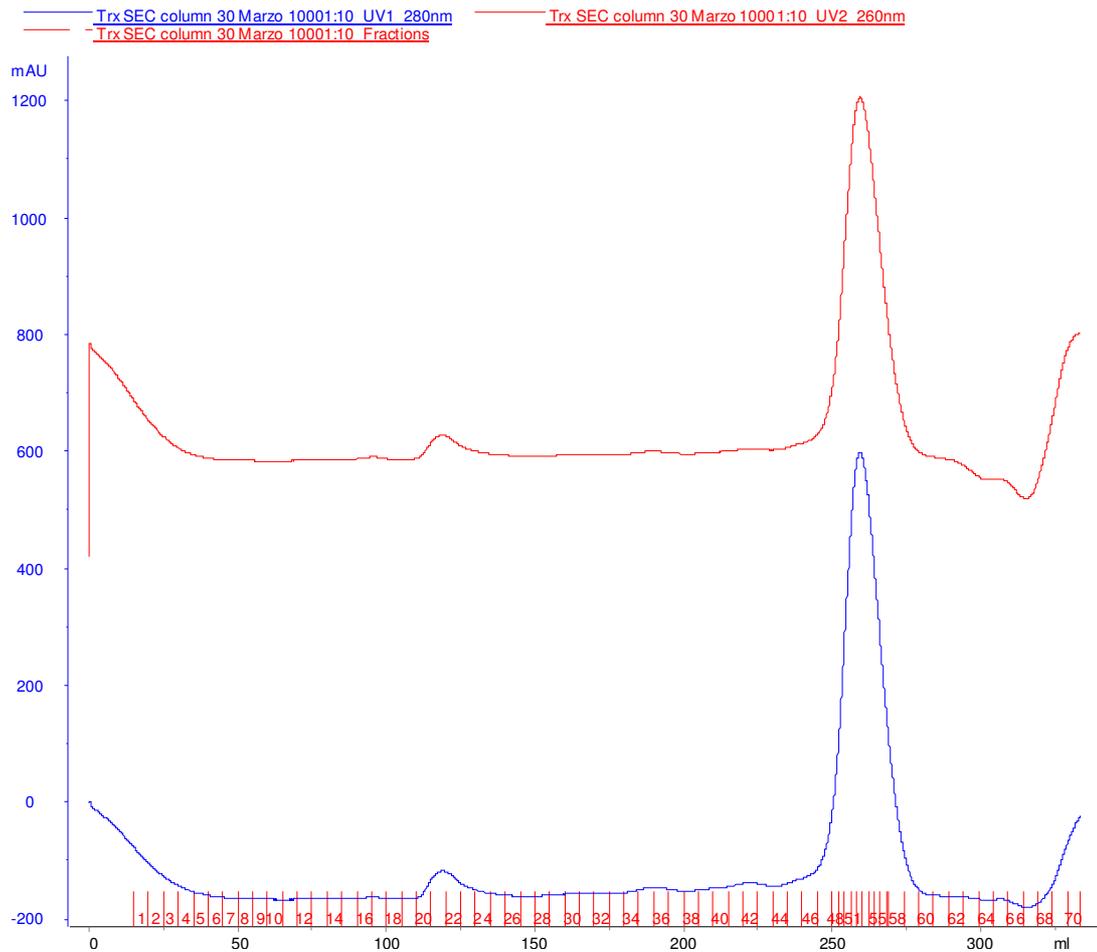


Figura R.4.6. Elución de Trx de la columna de exclusión molecular. La proteína purificada mediante cromatografía de afinidad (fracciones 24-25) se sometió a un paso de purificación adicional por filtración en gel usando una columna Superdex S75 HR26/60. La proteína se eluyó como un monómero de 12 kDa en tampón B (**Figura R.4.5**). Las fracciones comprendidas en el pico se analizaron mediante SDS-PAGE, se agruparon y se concentró la proteína mediante ultrafiltración. Línea azul, DO₂₈₀; línea roja, DO₂₅₄.

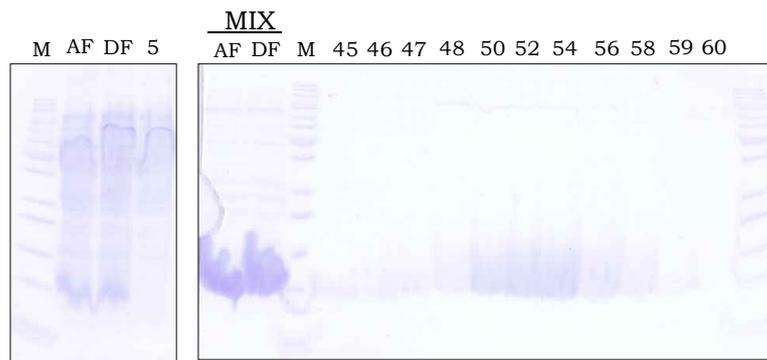


Figura R.4.7. Purificación a gran escala de 6His-Trx. La expresión de la fusión 6His-Trx se indujo con 1 mM de IPTG a 37°C. Se obtuvieron extractos solubles en tampón de lisis suplementado con β -mercaptoetanol. La proteína se purificó en dos pasos, primero por cromatografía de afinidad con columnas de agarosa-níquel y luego mediante exclusión molecular por tamaño. El panel de la izquierda se corresponde con el primer paso de purificación. El panel de la derecha se refiere a las fracciones obtenidas tras la purificación mediante exclusión por tamaño. AF, extracto soluble antes de filtrar; DF, extracto soluble después de filtrar; M, marcador de peso molecular; Mix, mezcla de las fracciones que contienen la proteína eluida.

b) Purificación de 6His-N-SlrP

La inducción se hizo a 30°C. El perfil de elución a partir de la columna de níquel se muestra en la **Figura R.4.8**.

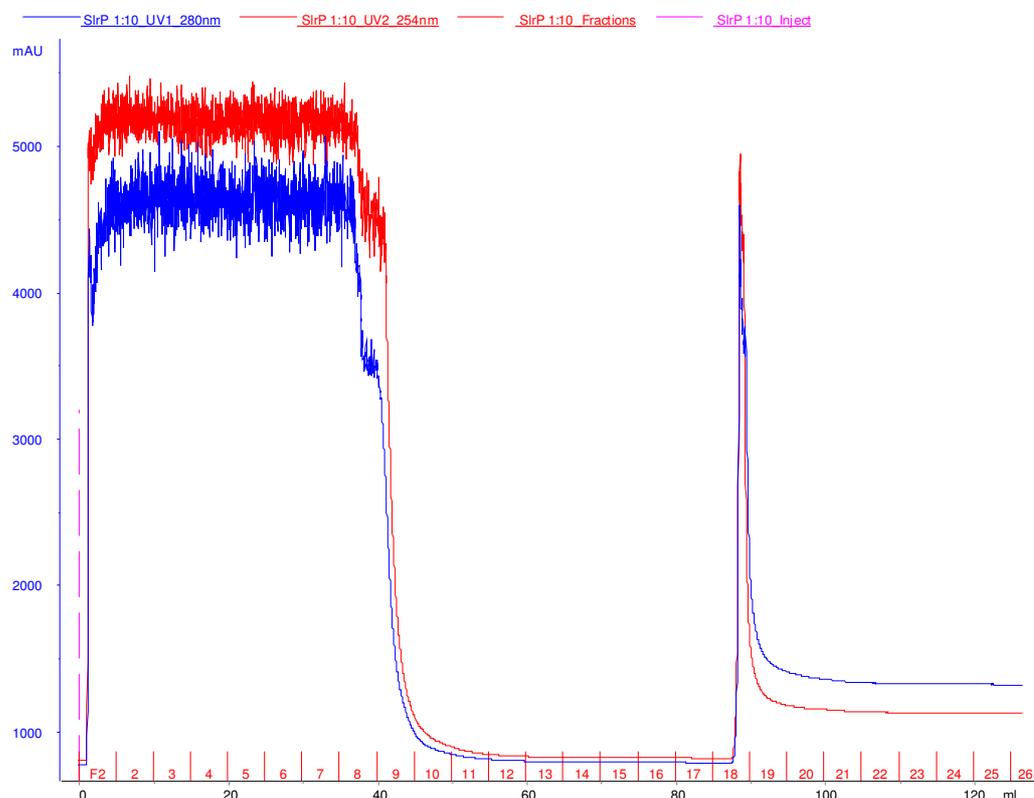


Figura R.4.8. Purificación de 6His-N-SlrP mediante IMAC. Extractos solubles de la estirpe *E. coli* M15/pREP4 con el plásmido pIZ1782 se sometieron a cromatografía de afinidad sobre una matriz de Ni-NTA. La columna se lavó intensamente con tampón de lisis para eliminar contaminantes y las proteínas se eluyeron con tampón de lisis suplementado con 300 mM de imidazol. Línea azul, DO₂₈₀; línea roja, DO₂₅₄

Las proteínas purificadas mediante *IMAC* (recogidas en las fracciones 18 y 19) se sometieron a un paso adicional de purificación mediante cromatografía de exclusión por tamaño. La proteína recombinante N-SlrP se eluyó en forma de monómero de 15 kDa, de acuerdo con la calibración de la columna (**Figura R.4.9**). A partir 1 litro de cultivo se obtuvieron 8,5 mg de la proteína N-SlrP pura y homogénea, que se concentró hasta 12 mg/ml (0.93 mM) en tampón B. El ϵ de 6His-N-SlrP es 0,792.

En los distintos pasos de purificación se tomaron muestras que se analizaron mediante SDS-PAGE (**Figura R.4.10**)

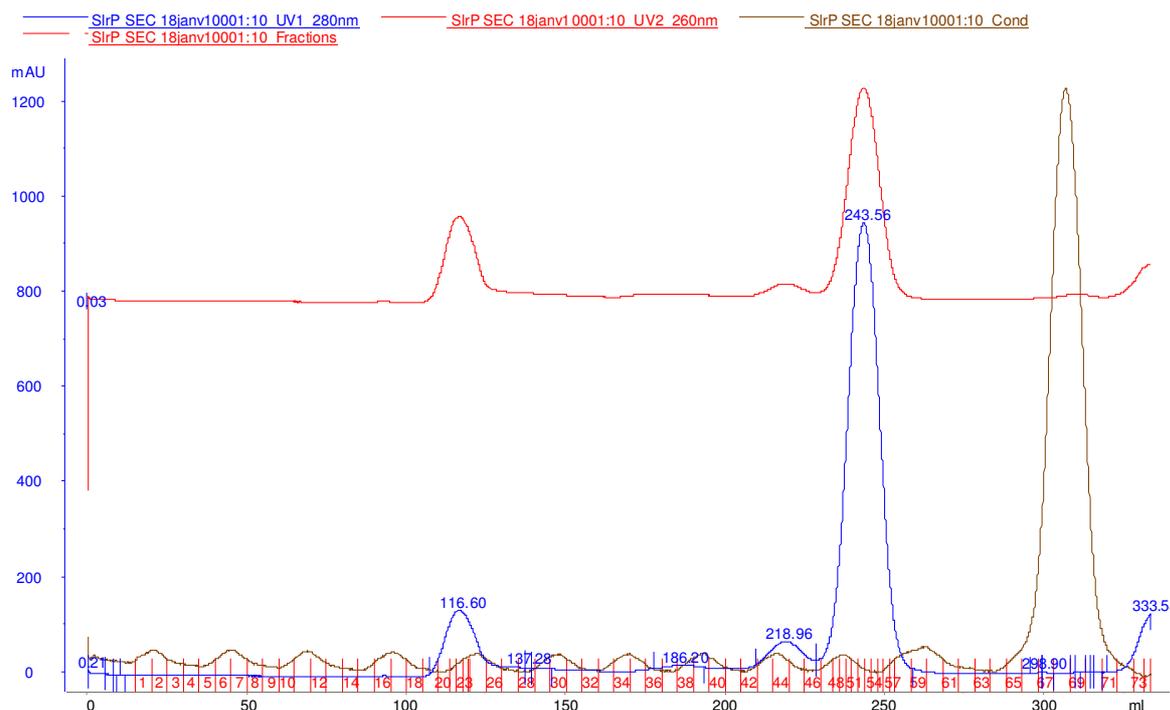


Figura R.4.9. Elución de N-SlrP de la columna de exclusión molecular. La proteína purificada mediante cromatografía de afinidad se sometió a un paso de purificación adicional por filtración en gel usando una columna Superdex S75 HR26/60. La proteína se eluyó como un monómero de 15 kDa en tampón B. Las fracciones comprendidas en el pico de absorción a 280 nm se analizaron mediante SDS-PAGE (**Figura R.4.8**), se agruparon y se concentró la proteína mediante ultrafiltración. Línea azul, DO₂₈₀; línea roja, DO₂₅₄; línea marrón, conductimetría.

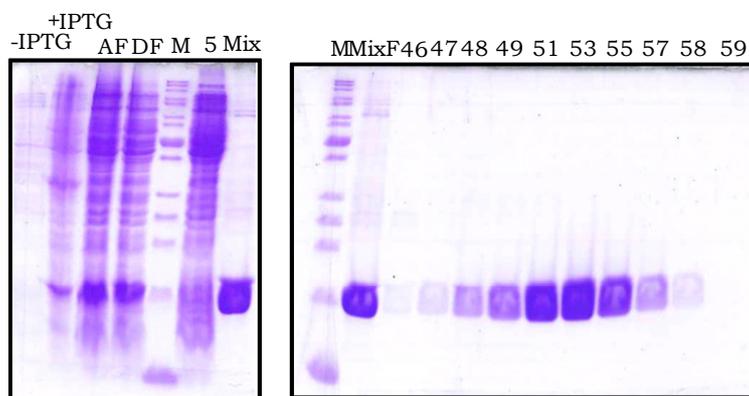


Figura R.4.10. Purificación a gran escala de 6His-N-SlrP. La expresión de la fusión 6His-N-SlrP se indujo con 1 mM de IPTG a 30°C. Se obtuvieron extractos solubles en tampón de lisis NP40. La proteína se purificó en dos pasos, primero por cromatografía de afinidad con columnas de agarosa-níquel y luego por exclusión molecular por tamaño. El panel de la izquierda se corresponde con el primer paso de purificación. El panel de la derecha se refiere a las fracciones obtenidas tras la purificación mediante exclusión por tamaño. – IPTG, extracto total antes de inducir; +IPTG, extracto total después de inducir; AF, extracto soluble antes de filtrar; DF, extracto soluble después de filtrar; M, marcador de peso molecular; Mix, mezcla de las fracciones que contienen la proteína eluida; MixF, mezcla de las fracciones que contienen la proteína eluida filtrada.

c) Purificación de 6His-SlrP-C

El primer paso de purificación del fragmento carboxilo terminal de SlrP (cromatografía de afinidad) se llevó a cabo en las mismas condiciones que en

el caso anterior (**Figura R.4.11**). Para el segundo paso (cromatografía de exclusión por tamaño) se empleó una columna Superdex S200 y la proteína recombinante SlrP-C se eluyó como un monómero de 65 kDa (**Figura R.4.12**) El rendimiento de la purificación fue de 13.44 mg/litro de cultivo que se concentraron hasta 20,68 mg/ml (0,27 mM) en tampón B. El ϵ de 6His-SlrP-C es 0,992.

En los distintos pasos de purificación se tomaron muestras que se analizaron mediante SDS-PAGE (**Figura R.4.13**).

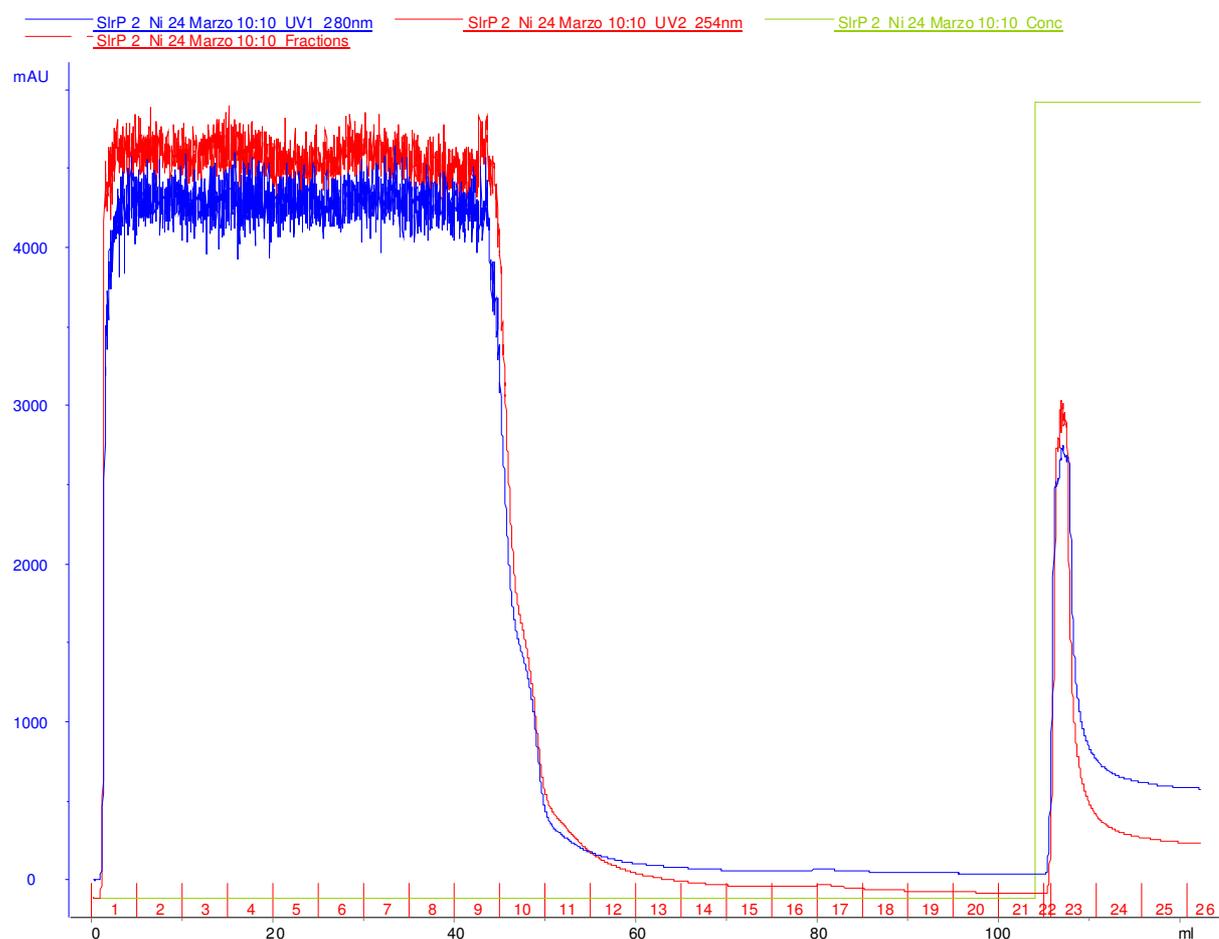


Figura R.4.11. Purificación de 6His-SlrP-C mediante IMAC. Extractos solubles de la estirpe *E. coli* M15/pREP4 con el plásmido pIZ1784 se sometieron a cromatografía de afinidad sobre una matriz de Ni-NTA. La columna se lavó intensamente con tampón de lisis para eliminar contaminantes y las proteínas se eluyeron con tampón de lisis suplementado con 300 mM de imidazol. Línea azul, DO_{280} ; línea roja, DO_{254} ; línea verde, inyección de tampón de elución.

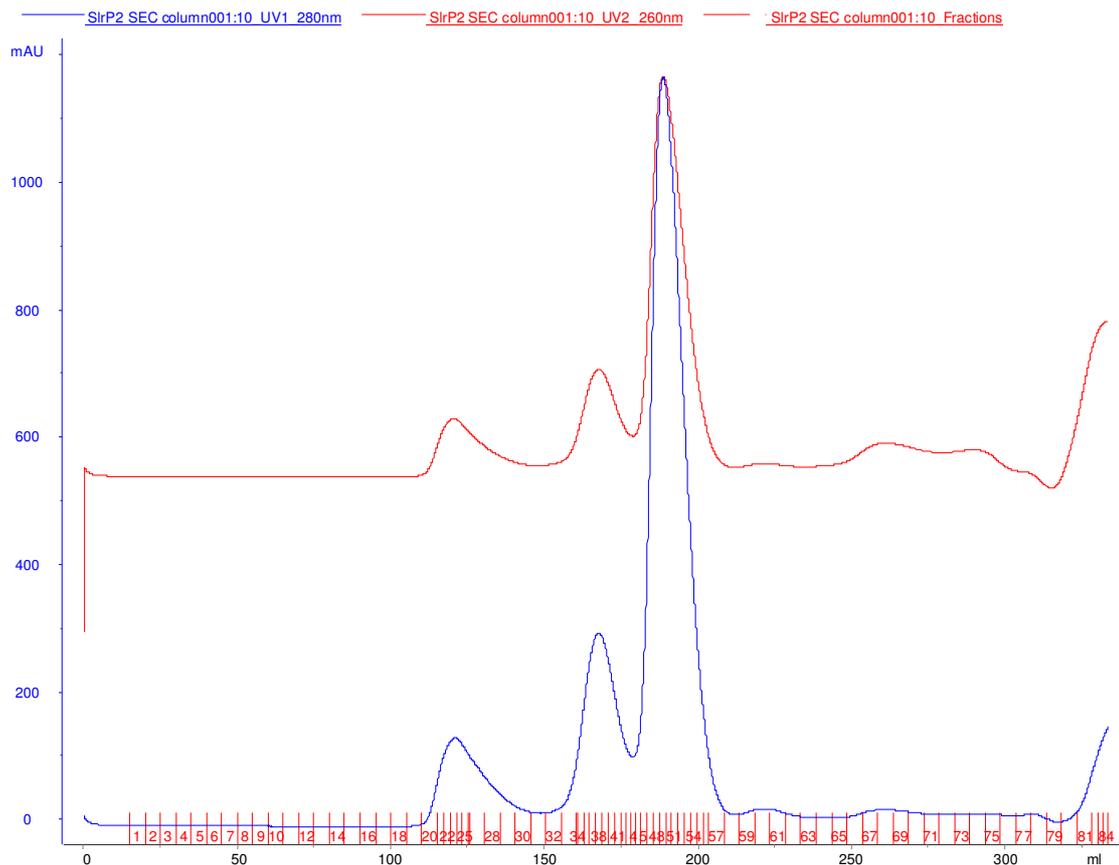


Figura R.4.12. Elución de SlrP-C de la columna de exclusión molecular. La proteína purificada mediante cromatografía de afinidad (fracciones 23 y 24) se sometió a un paso de purificación adicional por filtración en gel usando una columna Superdex S200 HR26/60. La proteína se eluyó como un monómero de 65 kDa en tampón B. Las fracciones comprendidas en el pico principal de absorción a 280 nm se analizaron mediante SDS-PAGE (**Figura R.4.11**), se agruparon y se concentró la proteína mediante ultrafiltración. Línea azul, DO₂₈₀; línea roja, DO₂₅₄.

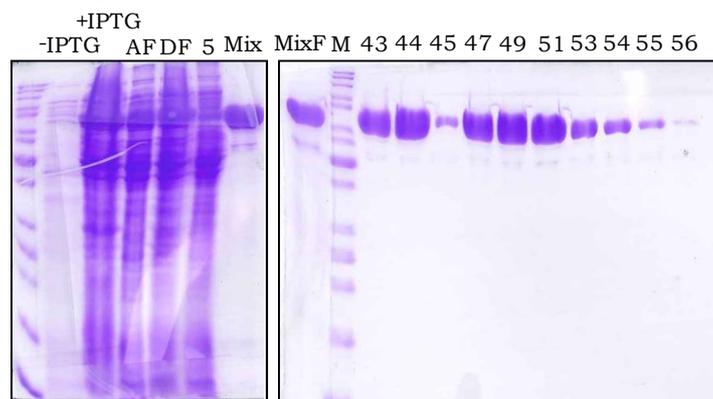


Figura R.4.13. Purificación a gran escala de 6His-SlrP-C. La expresión de la fusión 6His-SlrP-C se indujo con 1 mM de IPTG a 30°C. Se obtuvieron extractos solubles en tampón de lisis NP40. La proteína se purificó en dos pasos, primero por cromatografía de afinidad con columnas de agarosa-níquel y luego por exclusión molecular por tamaño. El panel de la izquierda se corresponde con el primer paso de purificación. El panel de la derecha se refiere a las fracciones obtenidas tras la purificación mediante exclusión por tamaño. - IPTG, extracto total antes de inducir; +IPTG, extracto total después de inducir; AF, extracto soluble antes de filtrar; DF, extracto soluble después de filtrar; M, marcador de peso molecular; Mix, mezcla de las fracciones que contienen la proteína eluida; MixF, mezcla de las fracciones que contienen la proteína eluida filtrada.

4.3 Ensayos de interacción mediante la técnica ITC

La interacción entre la forma completa de SlrP y Trx se demostró en el **capítulo 2**. Pero, puesto que los ensayos de cocrystalización se debían realizar usando los fragmentos N-SlrP y SlrP-C, era preciso averiguar si alguno de estos fragmentos era capaz, por sí solo, de interaccionar con Trx. Con este fin se empleó la técnica ITC (**apartado 5.5 de Material y Métodos**). Aunque se esperaba que el fragmento susceptible de interaccionar con Trx fuera el SlrP-C (que contiene las LRR), se realizaron tres ensayos distintos de interacción: 1) SlrP-C + Trx, 2) N-SlrP + Trx, 3) N-SlrP + SlrP-C + Trx. En la **Figura R.4.14** se representan los datos obtenidos en el primer ensayo de ITC. Dichos datos indican que el fragmento carboxilo terminal de SlrP interacciona con Trx, aunque la constante de unión no era muy alta ($K = 0,1 \mu\text{M}$). No ocurrió así con el fragmento amino terminal, que, según los datos obtenidos por ITC, no es capaz de interaccionar con Trx (**Figura R.4.15**). Cuando se analizó la interacción de los dos fragmentos de SlrP juntos con Trx se observó interacción y en este caso se obtuvo una constante de unión más elevada ($0,8 \mu\text{M}$) (**Figura R.4.16**). Estos datos sugieren que el fragmento carboxilo terminal de SlrP interacciona con Trx y que la adición del fragmento amino no dificulta dicha unión. Por tanto, se podían usar estos fragmentos para los ensayos de cocrystalización.

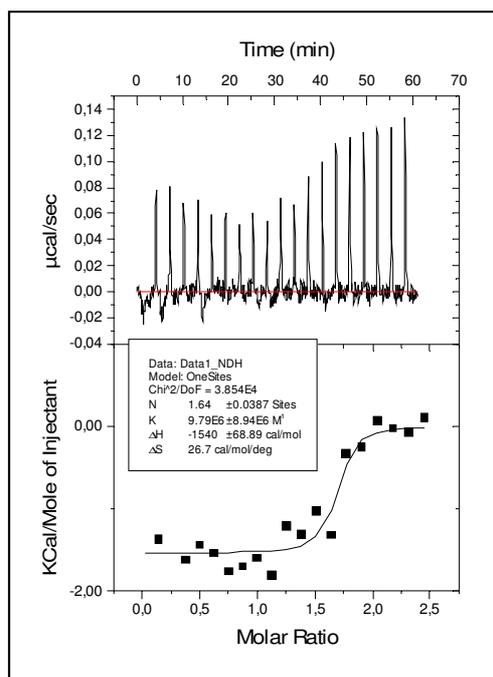


Figura R.4.14. ITC de SlrP-C/Trx. La parte superior muestra los datos obtenidos directamente en el experimento de titulación a 20°C en presencia de SlrP-C 30µM (en la celda) y Trx 360µM (en la jeringa), en tampón Tris-HCl 20 mM, pH8, NaCl 150 mM y β-mercaptoetanol 5 mM. Se realizaron 20 inyecciones de 2 µl espaciadas 180 s. En la parte de abajo se muestra la curva calculada utilizando los parámetros de mejor ajuste. En el cuadro se muestran los mejores valores de la estequiometría, la constante de unión, la entalpía y la entropía.

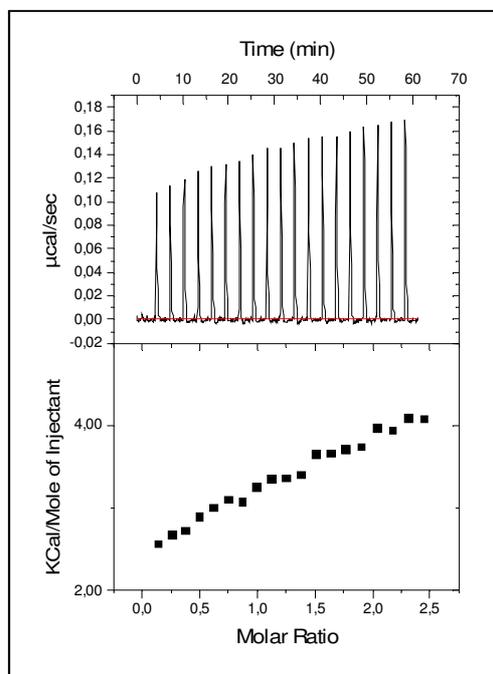


Figura R.4.15. ITC de N-SlrP/Trx. La parte superior muestra los datos obtenidos directamente en el experimento de titulación a 20°C en presencia de N-SlrP 30µM (en la celda) y Trx 360µM (en la jeringa), en tampón Tris-HCl 20 mM, pH8, NaCl 150 mM y β-mercaptoetanol 5 mM. Se realizaron 20 inyecciones de 2 µl espaciadas 180 s. En la parte de abajo se representan gráficamente los datos obtenidos con los que no se puede representar una curva de interacción.

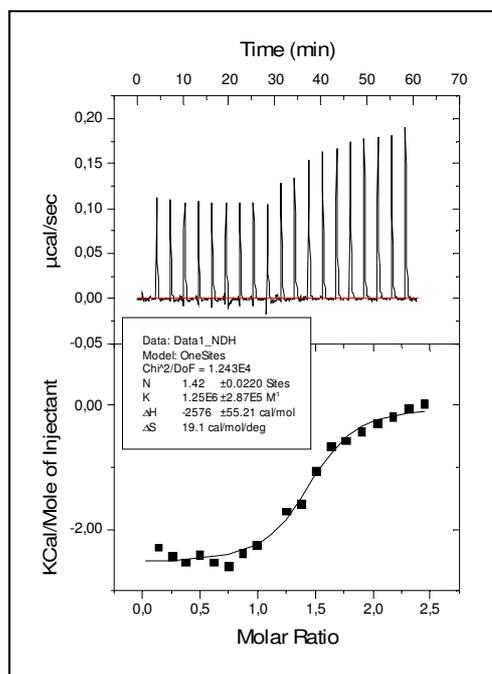


Figura R.4.16. ITC de N-SlrP/SlrP-C/Trx. La parte superior muestra los datos obtenidos directamente en el experimento de titulación a 20°C en presencia de SlrP-C 30 μ M y N-SlrP 30 μ M (en la celda) y Trx 360 μ M (en la jeringa), en tampón Tris-HCl 20 mM, pH8, NaCl 150 mM y β -mercaptoetanol 5 mM. Se realizaron 20 inyecciones de 2 μ l espaciadas 180 s. En la parte de abajo se muestra la curva calculada utilizando los parámetros de mejor ajuste. En el cuadro se muestran los mejores valores de la estequiometría, la constante de unión, la entalpía y la entropía .

4.4 Ensayos de cristalización

La cristalización de proteínas es el proceso mediante el cual las moléculas se ordenan de un modo natural formando un retículo repetitivo que denominamos cristal. Debido a que cada proteína cristaliza en unas determinadas condiciones de pH, concentración de tampón, del agente precipitante y de la propia proteína, se hace necesaria la realización de escrutinios para la búsqueda de las condiciones apropiadas en las que la proteína forma cristales. Los experimentos de cristalización comienzan con una solución relativamente concentrada de una proteína a la que se le va añadiendo algún reactivo con la intención de reducir la solubilidad de la proteína y generar una precipitación controlada de la misma. Durante dicha precipitación, si se dan las condiciones adecuadas se pueden formar cristales de proteína. El límite entre la cristalización y la precipitación de la

proteína es muy débil, y las condiciones en las que una proteína cristaliza son muy precisas (**Figura R.4.17**).

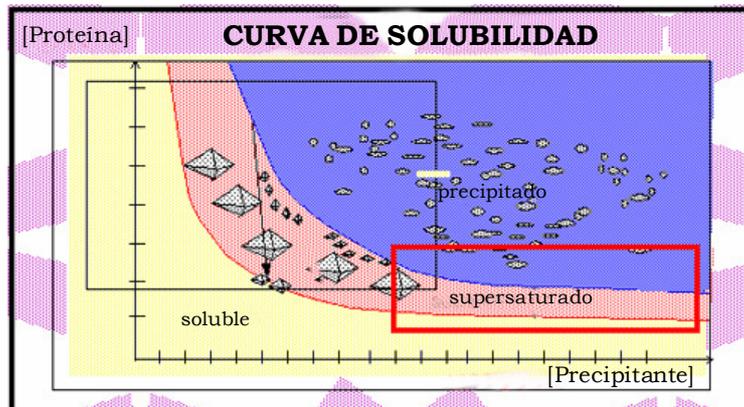


Figura R.4.17. Curva de solubilidad de una proteína. Se muestra de forma genérica, las distintas zonas de un sistema proteína-precipitante en función de las concentraciones de ambos componentes. La zona amarilla representa las condiciones en las que la proteína estaría solubilizada. En la zona de color azul la proteína dejaría de estar soluble y formaría precipitados. Ambas zonas están separadas por otra (de color rosa) en las que se dan las condiciones adecuadas para la nucleación y crecimiento cristalino. Esquema adaptado de los textos del curso de cristalografía del CSIC, Martín Martínez Ripoll y Félix Hernández Cano.

Por lo tanto, para maximizar la posibilidad de éxito de un intento de cristalización, es necesario diseñar distintos experimentos, partiendo de diferentes condiciones iniciales, es decir, de diferentes concentraciones de proteína y precipitante (**Figura R.4.18**).

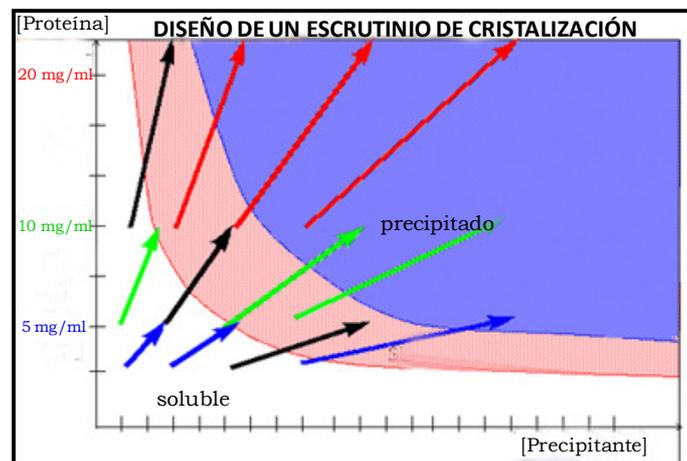


Figura R.4.18. Diseño de un escrutinio de cristalización. Al diseñar un escrutinio para buscar condiciones de cristalización de una proteína se debe partir de diferentes concentraciones de proteína y de agente precipitante y así se aumentan las posibilidades de éxito. Las flechas representan concentraciones de proteína o precipitante. Esquema adaptado de los textos del curso de cristalografía del CSIC, Martín Martínez Ripoll y Félix Hernández Cano.

Los ensayos de cristalización se llevaron a cabo en la plataforma robotizada del LEBS según se explica en el **apartado 8.1** de **Material y Métodos**.

Se realizaron experimentos de cristalización con el dominio SlrP-C solo, con el complejo binario SlrP-C/Trx y con el complejo ternario N-SlrP/SlrP-C/Trx. Los cuatro escrutinios diferentes descritos en **Material y Métodos** permitieron identificar condiciones en las que crecían pequeños cristales:

- 1) SlrP-C 5 ó 10 mg/ml en MB Class II n° 63 (PEG 4000 12%, NaCl 0.1M, MgCl₂ 0.1M, Hepes 0.1M pH 7.5)
- 2) SlrP-C 10 mg/ml en MB Class ((NH₄)₂SO₄ 0.7 M, Na/K PO₄ 1.0 M, pH 7.5)
- 3) N-SlrP/SlrP-C/Trx (0.2 mM 1/1/1) en PEG II n° 94 (PEG 8000 10%, MgAc 0.2 M)
- 4) SlrP-C/Trx (0.2 mM 1/1) y N-SlrP/SlrP-C/Trx (0.2 mM 1/1/1) MB Class II n° 63 (PEG 4000 12%, NaCl 0.1 M, MgCl₂ 0.1M, Hepes 0.1M pH 7.5)

En la **Figura R.4.19** se muestran los cristales obtenidos durante el rastreo de las condiciones de cristalización.

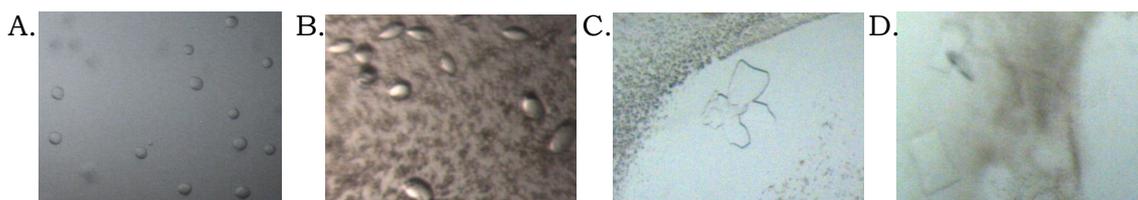


Figura R.4.19. Cristales de SlrP-C y del complejo SlrP-C/Trx. Las fotos A y B se corresponden con cristales del fragmento carboxilo terminal de SlrP, obtenidos en los sistemas comerciales Mb Class I y Mb Class II, respectivamente. Las fotos C y D se corresponden con los cristales de los complejos SlrP-C/Trx y N-SlrP/SlrP-C/Trx, respectivamente.

4.5 Ensayos de cristalización en gota suspendida

Los cristales obtenidos en los escrutinios se reprodujeron manualmente por el método de la gota suspendida (**apartado 8.1** de **Material y Métodos**) y se optimizaron las condiciones para obtener cristales

de mayor tamaño apropiados para las medidas de difracción de rayos X. Finalmente, se obtuvieron cristales de buena calidad en dos condiciones:

- 1) N-SlrP /SlrP-C/Trx en PEG 8000 16%, MgAc 0.2 M, Hepes 0.1 M
pH 7.8
- 2) SlrP-C/Trx en PEG 4000 15%, NaCl 0.1M, MgCl₂ 0.1M, Hepes 0.1M
pH 7.6

4.6 Difracción de rayos X

La cristalografía de rayos X implica la determinación de la estructura de proteínas mediante el estudio del patrón de difracción de rayos X a través de un cristal de proteína orientado de forma precisa. Los rayos X son radiaciones electromagnéticas que se caracterizan por ser capaces de penetrar en los cuerpos opacos. Tienen una longitud de onda del orden de 1 angstrom (Å), que es equivalente a 10^{-10} metros. Esta distancia es del mismo orden que la distancia interatómica en los cuerpos cristalinos, por lo que el modo como se difractan los rayos X depende de la densidad electrónica y la orientación espacial de los átomos en el cristal. Los mapas de densidad electrónica se reconstruyen a partir de los datos de difracción, usando un método matemático denominado transformada de Fourier; ello permite construir modelos estructurales.

Los ensayos de difracción por rayos X se llevaron a cabo en las instalaciones del sincrotrón de Soleil (Francia). Para ello, los cristales de proteína se recogieron y se sustituyó la solución donde se generaron por una solución crioprotectora. La incidencia de los rayos X sobre la muestra produce calor y radicales libres tanto en la proteína como en la solución precipitante y puede producir daños en el cristal. Por ello, es necesario refrigerar la muestra durante el experimento de difracción usando un flujo de nitrógeno a unos 100 Kelvin. Consecuentemente, para evitar la congelación de la muestra y la aparición de cristales de hielo, es necesario sustituir previamente la solución precipitante por una solución crioprotectora. Para obtener un patrón de difracción del cristal éste debe irse rotando, de modo que se recorran todos los ángulos de incidencia. Para ello,

la muestra se monta en un soporte llamado cabeza goniométrica, que puede hacerse girar con precisión. De esta forma se consigue un patrón de difracción de rayos X, que no es más que el conjunto de coordenadas espaciales de los átomos de una molécula.

Con los cristales de los complejos N-SlrP/SlrP-C/Trx y SlrP-C/Trx se obtuvieron varios conjuntos de datos de difracción. Ambos tipos de cristales difractaron a una resolución de entre 3,3 y 3,5 Å en el mismo grupo espacial P222 con parámetros similares para la celda unidad (parte del cristal que reproduce su globalidad por apilación repetida): $a = 107,3\text{Å}$, $b = 134,4\text{ Å}$, $c = 154,9\text{ Å}$, $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$. Los datos de difracción se procesaron usando los programas XDS (Kabsch, 2010) y CCP4 (Collaborative-Computational-Proyect, 1994). Los resultados se muestran en la **Tabla R.4**. Los análisis estadísticos del contenido de solvente de la celda unidad sugieren que ambos cristales podrían contener tres moléculas de SlrP-C o SlrP-C/Trx por unidad asimétrica (P222, multiplicidad $m=4$). Se intentó usar las estructuras homólogas de SspH2 (número de acceso PDB 3G06, 41% de identidad de secuencia con SlrP sobre 650 posiciones) o de IpaH3 (número de acceso PDB 3CVR, 34% identidad de secuencia con SlrP sobre 633 posiciones) para resolver el problema de fase por reemplazamiento molecular. Sin embargo, la rotación que presentan ambas moléculas entre los dominios LRR y NEL impidió que se pudieran usar como modelos para resolver la estructura de SlrP. El siguiente paso consiste en producir proteínas marcadas con selenometionina con el fin de usar el procedimiento cristalográfico MAD (*multiple wavelength anomalous diffraction*).

Tabla R.4. Datos estadísticos de difracción de los cristales de SlrP-C/Trx

Colección de datos	
Grupo espacial	P222
Dimensiones de la celda:	
a, b, c (Å)	107,61, 135,01, 155,22
α, β, γ (°)	90,00, 90,00, 90,00
Rango de resolución (Å)	44,22-3,51 (3,72-3,51) a
Número de observaciones aceptadas	104036 (14207) a
Número de reflexiones únicas	28608 (4323) a
Media (I/ σ (I)) b	10,49 (2,27) a
Rmeas ^c (%)	9,6 (59,0) a
Compleitud (%)	98,5 (94,2) a

- a Los numeros entre paréntesis representan los valores para el rango de mayor resolución
- b Media de las relaciones intensidad/sigma para las reflexiones únicas (después de la mezcla de observaciones relacionadas con simetrías)
- c Factor R independiente de redundancia: $R_{meas} = \frac{\sum_h \sum_i |I(h,i) - \langle I(h) \rangle|}{\sum_h \sum_i I(h,i)}$, donde I(h,i) es el valor de la intensidad de la medida i de h y $\langle I(h) \rangle$ es el correspondiente valor medio de I(h) para todas las medidas de I. Se basa en la similitud de las intensidades medidas en reflexiones de simetría equivalente.

DISCUSIÓN

Salmonella enterica posee dos SST3 relacionados con la virulencia, que son elementos fundamentales en su interacción con la célula eucariota. Se han descrito más de 30 efectores de ambos SST3 que están implicados en la virulencia de *Salmonella*, aunque el papel que algunos de ellos desempeñan durante la infección bacteriana aún no se conoce. En este estudio, hemos llevado a cabo un análisis estructural y funcional de SlrP, un efector de los dos SST3 de *S. enterica*. Hemos encontrado dos proteínas de la célula hospedadora eucariótica que interaccionan con SlrP y, además hemos demostrado una actividad bioquímica de este efector, previamente desconocida (Bernal-Bayard et al., 2010; Bernal-Bayard y Ramos-Morales, 2009).

La identificación de ligandos eucarióticos de los efectores de los SST3 es un paso esencial para el entendimiento de la función de dichos factores de virulencia. Además, la presencia de un dominio LRR en SlrP, un motivo frecuentemente implicado en interacciones proteína-proteína, sugería que este efector podría unirse a proteínas eucarióticas durante la infección. Por estos motivos, decidimos, como punto de partida de esta Tesis, llevar a cabo un escrutinio para buscar proteínas eucarióticas que interaccionaran con SlrP. Realizamos un escrutinio utilizando el sistema del doble híbrido en levaduras como resultado del cual encontramos dos ligandos de SlrP: la tiorredoxina (Trx) citosólica, una proteína, que protege a la célula contra el daño oxidativo; y ERdj3, una chaperona localizada en el retículo endoplásmico que pertenece a la familia DnaJ/Hsp40. La interacción de SlrP con ambas proteínas se confirmó mediante cromatografía de afinidad y experimentos de coimmunoprecipitación.

Trx se identificó originalmente en 1964 (Laurent et al., 1964) en *E. coli* como un donador de hidrógeno para la ribonucleótido reductasa que se requiere para la síntesis de ADN. Trx participa en diversas actividades relacionadas con el estado redox, que están conservadas desde *E. coli* hasta humanos. La importancia del sistema Trx se demuestra por el hecho de que ratones que carecen de este sistema mueren muy pronto durante la embriogénesis (Matsui et al., 1996; Nonn et al., 2003). Se trata de una proteína pequeña, de unos 12 kDa, ubicua y multifuncional que actúa como

reductasa intracelular mediante reacciones de cambio de grupos ditiol/disulfuro usando dos residuos de cisteína de la secuencia conservada -Cys-Gly-Pro-Cys- dentro de su centro activo (**Figura D.1**) (Holmgren, 1985; Holmgren, 1989).

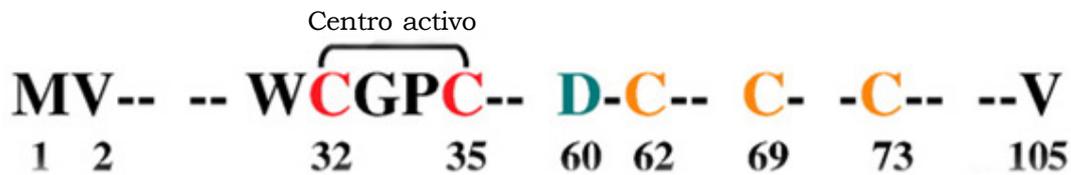


Figura D.1. Esquema de la secuencia proteica de Trx en el que se destacan sus residuos de cisteína. Además de las dos cisteínas conservadas del centro activo, Trx posee tres residuos de cisteína en las posiciones 62, 69 y 73 (Kaimul et al., 2007).

Además de las dos cisteínas que conforman el centro activo (Cys³² y Cys³⁵), Trx tiene 3 cisteínas adicionales en su estructura en las posiciones 62, 69 y 73, como se observa en la **Figura D.1**. Cuando Trx está completamente oxidada forma un segundo puente disulfuro entre los residuos Cys⁶² y Cys⁶⁹ (Watson et al., 2003) y puede dimerizar con otro monómero de Trx oxidado a través de la Cys⁷³ (Ren et al., 1993) (**Figura D.2**).

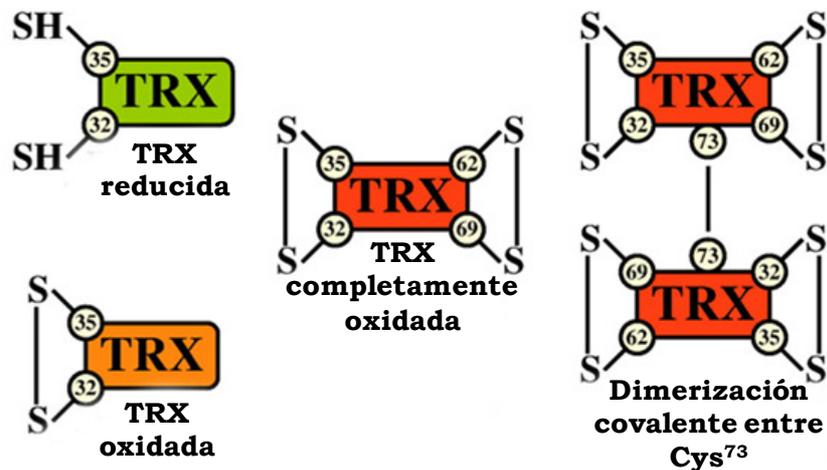


Figura D.2. Estados de oxidorreducción de Trx. En estado reducido los residuos de cisteína 32 y 35 poseen dos grupos tioles. En estado oxidado se forma un puente disulfuro entre ambos residuos de cisteína. Cuando la proteína está completamente oxidada se forma un segundo puente disulfuro entre los residuos 62 y 69. Dos moléculas de Trx oxidadas pueden dimerizar covalentemente mediante un puente disulfuro formado entre los residuos de cisteína 73 de ambas proteínas (Kaimul et al., 2007).

La forma reducida de Trx posee grupos ditiolos (-SH, -SH), mientras que la forma oxidada forma un puente disulfuro (S-S) en el centro activo. La

Trx en estado reducido interacciona con sus sustratos oxidados a los que les transfiere un ion hidrógeno (H^+) para reducirlos y como resultado de esta reacción la Trx queda oxidada. Trx es reducida de nuevo gracias al NADPH y la Trx reductasa, junto a los que actúa formando un sistema reductor de grupos sulfuros (Holmgren, 1985). El sistema Trx se encarga de mantener el ambiente reductor de la célula. Trx elimina el peróxido de hidrógeno del interior celular en colaboración con una familia de peroxidasa dependientes de Trx, las peroxirredoxinas (Fujii y Ikeda, 2002) (**Figura D.3**).

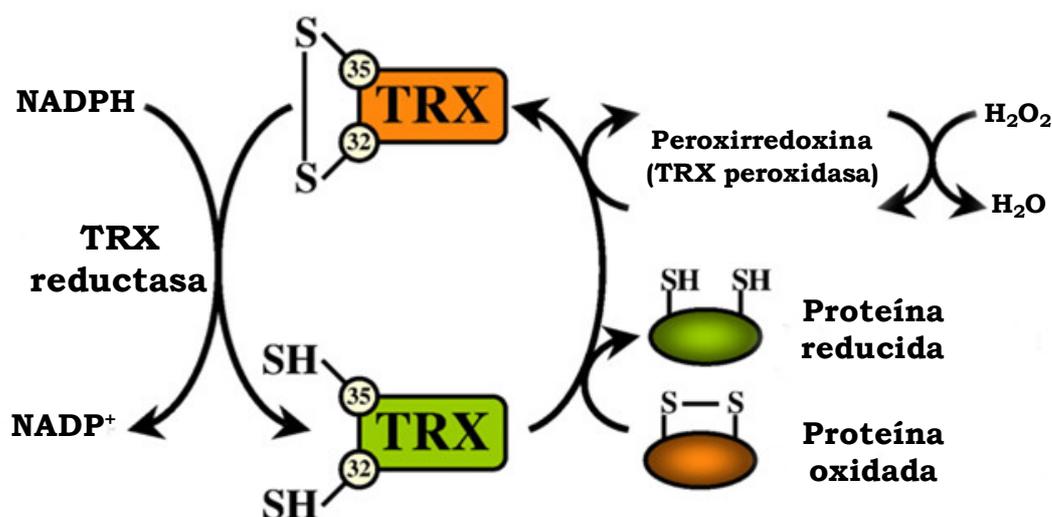


Figura D.3. Esquema del sistema Trx. El sistema está compuesto por la Trx, el donador de hidrógeno NADPH y la Trx reductasa. Trx también colabora con las peroxidasa dependientes de Trx (peroxirredoxinas) en la eliminación del peróxido de hidrógeno intracelular (Kaimul et al., 2007).

En mamíferos existen dos isoformas de Trx, una predominantemente citosólica (Trx1) y otra que se localiza en la mitocondria (Trx2). La isoforma que encontramos, mediante el sistema del doble híbrido, que interaccionaba con SlrP es la Trx citosólica, mientras que la Trx mitocondrial no interacciona (**Figura R.1.8**).

Trx1 desempeña un importante papel, mediante la eliminación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en varios eventos de señalización regulados por el balance redox y se sabe que participa en el control de numerosos procesos fisiológicos como el crecimiento, la supervivencia celular, la apoptosis, el desarrollo, la diferenciación y la proliferación (Nordberg y Arner, 2001; Powis y Montfort, 2001). En respuesta a varias condiciones de estrés, Trx1 es capaz de migrar desde el citosol al núcleo y de

inducir la actividad de varios factores de transcripción, tales como NF- κ B, AP-1 y p53 (Hirota et al., 1999), o puede ser secretada y tener funciones relacionadas con la modulación de la respuesta inmune, actuando como citoquina o quimioquina (Bertini et al., 1999; Bizzarri et al., 2005; Pekkari et al., 2005).

En relación con el control de la supervivencia celular, hay varias vías mediante las cuales el sistema Trx puede evitar la apoptosis [revisado en (Arner y Holmgren, 2000)]. Un ejemplo es la unión de Trx reducida a ASK-1, que provoca la inhibición de esta kinasa. ASK-1 (de kinasa reguladora de la señal de apoptosis 1) es una MAPKKK que activa las cascadas de señalización celular de las kinasas c-Jun y p38. Estas rutas de señalización suelen activarse en condiciones de estrés citotóxico, como el tratamiento con TNF- α , el peróxido de hidrógeno o la luz UV. La sobreexpresión de ASK-1 en cultivos de células epiteliales induce la muerte celular; además, la expresión de una forma mutante catalíticamente inactiva de ASK-1, que actúa como dominante negativo reduce la muerte celular inducida por TNF- α (Ichijo et al., 1997; Tobiume et al., 1997). Estos datos sugieren que ASK-1 es un componente importante en el proceso de apoptosis inducida por estrés y por citoquinas. Trx se une directamente al extremo amino terminal de ASK-1 e inhibe su actividad kinasa, así como la apoptosis dependiente de ASK-1. Esta interacción depende del estado redox de Trx, siendo capaz de interaccionar con la kinasa sólo en estado reducido. Esto sugiere un mecanismo de señalización de apoptosis que se iniciaría por la oxidación de Trx inducida por las ROS, seguida de la disociación de Trx de ASK-1 y la activación de la kinasa (Saitoh et al., 1998). Las ROS actúan como segundos mensajeros intracelulares para ciertas citoquinas y factores de crecimiento (Saitoh et al., 1998) y, además hay observaciones que sugieren que pueden mediar apoptosis: (i) varias condiciones de estrés citotóxico van acompañadas de un aumento en los niveles intracelulares de ROS (Jacobson, 1996; Yamauchi et al., 1989); (ii) la adición de ROS o la depleción de agentes antioxidantes inducen apoptosis (Buttke y Sandstrom, 1994); (iii) muchos antioxidantes inhiben o retrasan ciertos tipos de muerte celular inducida, por ejemplo, por el factor de necrosis tumoral α (TNF- α)

(Cossarizza et al., 1995; Mayer y Noble, 1994); y (iv) condiciones anaeróbicas de cultivo inhiben la muerte celular inducida por TNF- α (Matthews et al., 1987).

Trx puede impedir también la inducción de apoptosis por daño oxidativo favoreciendo la actividad de peroxirredoxinas y otras funciones antioxidantes. Es interesante el hecho de que los niveles de Trx en cultivos celulares confluentes sean más altos que en cultivos con baja concentración de células (Spielberger et al., 2008). La confluencia de los cultivos produce también un aumento en la cantidad de otras proteínas de respuesta a estrés como la MnSOD (Oberley et al., 1995) y la NADH citocromo b₅ reductasa (Bello et al., 2003), pero el aumento de Trx parece ser particularmente importante para conseguir la disminución de las ROS que también se generan en los cultivos de células confluentes (Bello et al., 2003; Spielberger et al., 2008). Estos datos son coherentes con nuestras observaciones sobre la disminución de la actividad reductora de Trx en cultivos de células HeLa confluentes que expresan SlrP que, a su vez, correlaciona con el aumento en la tasa de muerte celular. Un esquema de las actividades antiapoptóticas de Trx se representa en la **Figura D.4**.

Trx también tiene un papel en la regulación del crecimiento celular. Una de sus dianas es la proteína TBP-2/VDUP1 (*Trx binding protein 2/vitamin D₃ upregulated protein 1*). TBP-2 es un regulador negativo del crecimiento celular y se une a la Trx en su forma reducida. En condiciones de estrés oxidativo se induce la expresión de Trx y se reprime la expresión de TBP-2. Además, células epiteliales humanas del ojo (HLE B3) que sobreexpresan TBP-2 muestran menor actividad Trx y son más susceptibles a apoptosis por estrés oxidativo (Liyanage et al., 2007). Por tanto, TBP-2 es un regulador negativo de la expresión y la función de Trx (Nishiyama et al., 1999).

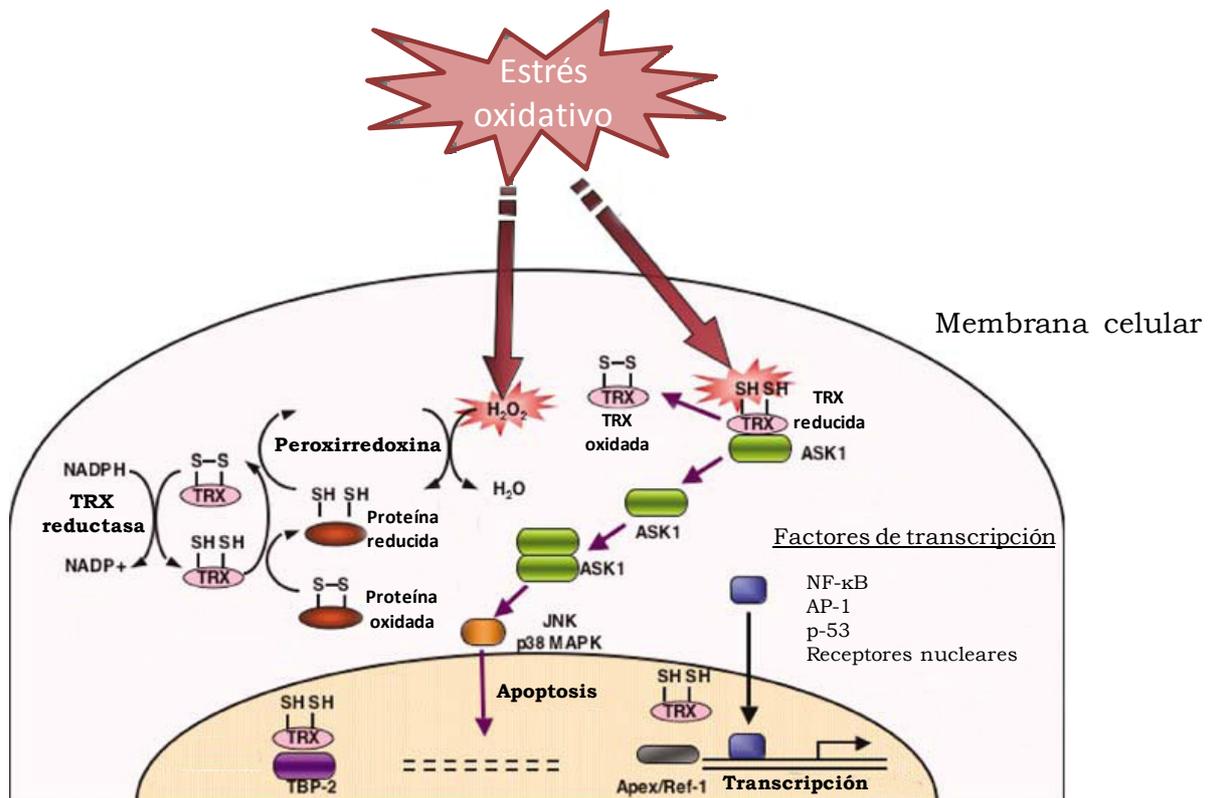


Figura D.4. Papel del sistema Trx y moléculas relacionadas en la regulación de la apoptosis. El sistema Trx está compuesto por varias moléculas que forman una red de interacciones con los residuos de cisteína de su centro activo, manteniendo el ambiente reductor celular y protegiendo las células del estrés oxidativo. Trx funciona junto con NADPH y Trx reductasa como un sistema reductor eficiente para proteínas con grupos disulfuros expuestos y coopera con las peroxirredoxinas para eliminar el peróxido de hidrógeno intracelular. Trx activa diferentes factores de transcripción a través de la endonucleasa Apex y el factor redox 1 (Ref-1). Trx es capaz, además de interactuar con varias proteínas diana. La proteína de interacción con Trx 2 (TBP-2) desempeña un importante papel en la regulación del crecimiento celular. Trx también interacciona con la ASK-1, un importante regulador de la apoptosis. En respuesta a estrés oxidativo, Trx se oxida y se separa de ASK-1. Ésta se activa e induce la señal de apoptosis (Masutani et al., 2005).

El cambio de las cisteínas de las posiciones 32 y 35 en el sitio activo de la Trx por dos alaninas, que impide la interacción con ASK-1 (Saitoh et al., 1998), no inhibe la interacción con SlrP (**Figura R.2.4**). Sin embargo, la oxidación de Trx evita ambas asociaciones (ver (Saitoh et al., 1998) y **Figura R.2.5**). Para entender este resultado se debe tener en cuenta, como antes se ha mencionado, que las cisteínas del sitio activo redox no son los únicos residuos que pueden estar afectados por condiciones oxidantes en Trx. De hecho, la oxidación provoca la dimerización entre dos Trx a través de un puente disulfuro entre los residuos Cis^{73} de ambos monómeros (**Figura D.2**) (Andersen et al., 1997; Weichsel et al., 1996). Los residuos necesarios para la interacción con SlrP podrían estar ocultos en la forma dimérica de Trx.

En esta Tesis, también se ha demostrado que el efector SlrP es una ligasa E3 de ubiquitina que puede catalizar la ubiquitinación de Trx, uno de sus ligandos en la célula hospedadora (**Figura R.2.6**). Esta modificación post-traducciona l consiste en la unión covalente de monómeros de ubiquitina a una proteína diana a través de una cascada enzimática que incluye tres pasos en los que están implicados tres enzimas diferentes: una enzima activadora de la ubiquitina (E1), una enzima conjugadora de la ubiquitina (E2) y una ligasa de ubiquitina (E3). Esta última controla la especificidad de la reacción mediante el reclutamiento de la proteína diana (Pickart, 2001). En la **Figura D.5** se muestra un esquema de una reacción de ubiquitinación. La ubiquitina se une a la proteína diana a través de un enlace isopeptídico entre el grupo carboxilo terminal de la ubiquitina y el grupo amino ϵ de un residuo de lisina del ligando. La ubiquitina contiene siete lisinas en su secuencia, una de las cuales se puede conjugar con otra ubiquitina, y así sucesivamente hasta formar un polímero de ubiquitina (Pickart, 2000). La función mejor caracterizada asociada a la ubiquitinación es la degradación de proteínas mediante la acción del proteasoma 26 S. Sin embargo, el sistema de ubiquitinación está implicado en otras funciones reguladoras. Por ejemplo, la monoubiquitación de una proteína no conduce a su degradación por el proteasoma, sino que puede ser una señal implicada en la reparación del ADN, la regulación transcripcional y el transporte de proteínas de membrana (Johnson, 2002). Las cadenas de poliubiquitinación también pueden tener funciones no relacionadas con la proteólisis. Por ejemplo, se ha demostrado que cadenas de poliubiquitina unidas por el residuo Lys⁶³ participan en la activación de proteínas kinasas, así como en la reparación de ADN y en el tráfico de vesículas. Tradicionalmente se pensaba que las proteínas poliubiquitinadas unidas por el residuo Lys⁴⁸ tenían como único destino la degradación por el proteasoma. Sin embargo, hay estudios recientes que revelan que este tipo de poliubiquitinación puede tener otras funciones no relacionadas con la proteólisis [revisado en (Li y Ye, 2008)]. Una de estas funciones es la regulación de la actividad de Met4 en *S. cerevisiae* (Flick et al., 2004). La poliubiquitinación por residuos Lys⁴⁸

reprime la actividad de este factor de transcripción sin afectar a su estabilidad.

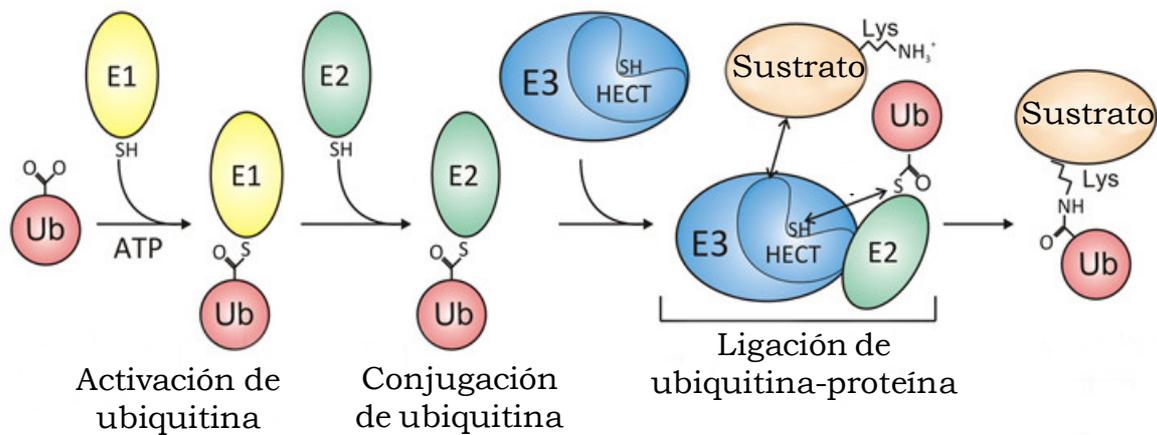


Figura D.5. Reacción de ubiquitinación. El proceso de ubiquitinación tiene lugar en tres pasos: activación de la ubiquitina, catalizado por la E1; conjugación de la ubiquitina, catalizado por la E2; y ligación de la ubiquitina a la proteína, catalizado por la E3.

Actualmente, se conoce un número creciente de efectores de los SST3 y SST4 de patógenos de plantas y animales que manipulan el sistema de ubiquitinación del hospedador [revisado en (Angot et al., 2007)]. Algunos efectores usan el sistema de ubiquitina para asegurar su propia degradación o modificación mediante ubiquitinación. Entre éstos se incluyen los efectores del SST3 de la SPI-1 de *Salmonella* SopA, SopB y SopE. Otros efectores como YopJ de *Yersinia pseudotuberculosis* interfieren con los niveles de ubiquitinación de proteínas hospedadoras importantes para la respuesta inmune. Finalmente, hay efectores que imitan ligasas de ubiquitina E3 del hospedador. Como por ejemplo, AvrPtoB de *Pseudomonas syringae* pv. *potato* y SopA de *S. enterica* serovar Typhimurium. El primero pertenece a la familia de ubiquitín ligasas tipo RING y el segundo a la familia tipo HECT.

Además de estos ejemplos, se ha demostrado recientemente, que el efector de *Shigella* IpaH9.8 y los efectores de *Salmonella* SspH1 y SspH2, los cuales pertenecen a la familia de efectores con dominios de repeticiones ricas en leucina, son ligasas de ubiquitina E3 (Quezada et al., 2009; Rohde et al., 2007). Estos efectores constituyen una nueva clase de ligasas E3, que no muestran similitud de secuencia ni de estructura con los principales grupos de ligasas de ubiquitina E3, esto es, los tipos HECT y RING

(Quezada et al., 2009; Singer et al., 2008; Zhu et al., 2008). Los efectores mencionados arriba, contienen un nuevo dominio ligasa E3, llamado “NEL” de *novel E3 ligase*, que también está presente en SlrP (Quezada et al., 2009; Rohde et al., 2007). En el **capítulo 2** de esta Tesis hemos demostrado que SlrP tiene actividad ligasa de ubiquitina y que el residuo Cys⁵⁴⁶, conservado en todos los miembros de la familia, es necesario para esta actividad. Por tanto, SlrP es un nuevo miembro de esta nueva familia de ligasas de ubiquitina.

IpaH9.8 es capaz de ubiquitinar la proteína de levaduras Ste7 *in vitro*, y la producción de IpaH9.8 en *S. cerevisiae* provoca la degradación por el proteasoma de Ste7 (Rohde et al., 2007), lo cual concuerda con el papel que puede tener la poliubiquitinación en cuanto al etiquetado de proteínas para su degradación. La expresión de SlrP en células HeLa no parece provocar la degradación de Trx, lo que sugiere que, en este caso, la ubiquitinación está ejerciendo una función independiente del proteasoma. Una ubiquitinación con función no proteolítica podría también explicar lo que se sabe de la interacción entre SspH1 y su ligando de la célula hospedadora PKN1. SspH1 es un efector de los SST3 de *Salmonella* que actúa como ligasa de ubiquitina para PKN1, una kinasa de serina y treonina (Rohde et al., 2007). Sin embargo, se piensa que la interacción entre SspH1 y PKN1 en células de mamífero, provoca la activación de la kinasa, la cual inhibe la ruta de señalización de NF- κ B (Haraga y Miller, 2006). Esta idea no concuerda con una degradación de PKN1 mediada por SspH1.

Nuestros resultados sobre SlrP y Trx apoyan un modelo en el que la ubiquitinación de Trx por SlrP, podría provocar, a través de una vía no proteolítica, una disminución de la actividad global de Trx de la célula. Esto podría aumentar la susceptibilidad de la célula a apoptosis en ciertas circunstancias. Sin embargo, es interesante el hecho de que la versión mutante de SlrP (SlrPC546A) sea capaz de provocar muerte celular, aunque en menor medida que la forma silvestre de SlrP. Este resultado sugiere que SlrP puede tener otras funciones independientes de su actividad ligasa de ubiquitina. Para ahondar en el significado fisiológico de los resultados obtenidos en las transfecciones, se analizaron los efectos de la infección con

Salmonella de cultivos de células HeLa. Los resultados fueron coherentes con los anteriores ya que la infección con *S. enterica* serovar Typhimurium provocaba la muerte de las células HeLa varias horas después de la entrada de la bacteria, y esa citotoxicidad estaba acompañada de una reducción de la actividad de Trx (**Figura R.2.10**).

Como se vio en la **Introducción**, las distintas formas, rápidas y lentas, de muerte celular inducida por *Salmonella* en macrófagos han sido objeto de numerosos estudios [revisado en (Fink y Cookson, 2007)]. Ciertos datos de la literatura indican que *Salmonella* no induce un tipo de muerte celular rápida en las líneas celulares epiteliales HeLa, Caco-2 y Henle-407 (Lundberg et al., 1999). Se sabe también, sin embargo, que las células epiteliales intestinales HT-29 sufren apoptosis 12-18 horas después de la entrada de las bacterias (Kim et al., 1998). Además, una estirpe PhoP^c de *S. enterica* serovar Typhimurium, provoca apoptosis en un 9-16% de una población de células epiteliales HeLa tras 24 horas de infección (Collier-Hyams et al., 2002). Hay otros patógenos que también inducen la apoptosis de células epiteliales intestinales (Philpott et al., 2001). La muerte celular programada por piroptosis o apoptosis (Fink y Cookson, 2007) se podría considerar como un mecanismo que contribuiría a la defensa del hospedador al eliminar tejidos infectados. Sin embargo, los efectores de *Salmonella* colaboran para modular esta respuesta de defensa del hospedador. De hecho, tanto la piroptosis rápida como la apoptosis retrasada que se puede dar en macrófagos, como se vio en la **Introducción**, están mediadas por el efector del SST3-1 SipB (Fink y Cookson, 2007; Knodler y Finlay, 2001). Esto podría ser un modo de eliminar células efectoras hospedadoras y, así debilitar la respuesta inmune. El efector del SST3-1 SopB/SigD evita la apoptosis temprana en células epiteliales, lo cual podría ser perjudicial tanto para la bacteria como para el hospedador (Knodler et al., 2005). La apoptosis tardía, por el contrario, podría ser necesaria para la salida de las bacterias de la célula hospedadora, que, de esta manera podrían infectar nuevas células y facilitar la diseminación de la infección. Los genes *spv*, que codifican efectores del SST3-2, y el efector del SST3-1 AvrA participan en este retraso de la apoptosis en células epiteliales

(Collier-Hyams et al., 2002; Paesold et al., 2002). Nuestros resultados sugieren que SlrP, podría ser otro efector que contribuye a modular la muerte celular de la célula hospedadora.

ERdj3 es la otra proteína diana del hospedador que interacciona con SlrP, encontrada en nuestro escrutinio. Como se comentó anteriormente, y al igual que ocurrió con Trx, se confirmó la interacción mediante tres métodos independientes: interacción *in vivo* en levaduras mediante el sistema del doble híbrido (**Figura R.1.6**), experimentos de copurificación con proteínas de fusión a GST producidas en bacterias (**Figura R.3.1**), y experimentos de coimmunoprecipitación a partir de células epiteliales humanas transfectadas (**Figura R.3.2**).

Aproximadamente un tercio de todas las proteínas celulares se transportan al lumen del retículo endoplásmico donde sufren modificaciones post-traduccionales, plegamientos y oligomerizaciones (Fink, 1999; Imaizumi et al., 2001; Kaufman, 1999; Ma y Hendershot, 2002). BiP (de *immunoglobulin heavy chain-binding protein*) es el único miembro de la familia de proteínas de choque térmico DnaK/Hsp70 localizado en el retículo endoplásmico y desempeña un papel esencial en el plegamiento y maduración de las proteínas de la vía secretora recién sintetizadas (Bertolotti et al., 2000). La actividad molecular de varios miembros de la familia Hsp70 está regulada por chaperonas Hsp40, que contienen un dominio de homología a DnaJ (dominio J) y estimulan la actividad ATPasa de las chaperonas Hsp70, ya que la actividad ATPasa intrínseca de estas proteínas es muy débil (Abdul et al., 2002; Cyr et al., 1994; Cheetham y Caplan, 1998; Greene et al., 1998; Kelley, 1998; Ohtsuka y Hata, 2000). ERdj3 es una de las proteínas de la familia Hsp40/DnaJ que se localizan en el retículo endoplásmico (Yu et al., 2000). ERdj3 se asocia con proteínas mal plegadas que son sustratos de la chaperona BiP (Bies et al., 1999; Meunier et al., 2002; Shen y Hendershot, 2005; Yu y Haslam, 2005) (**Figura D.6**). Además, ERdj3 es capaz de unirse a proteínas mal plegadas directamente e independientemente de BiP (Jin et al., 2009).

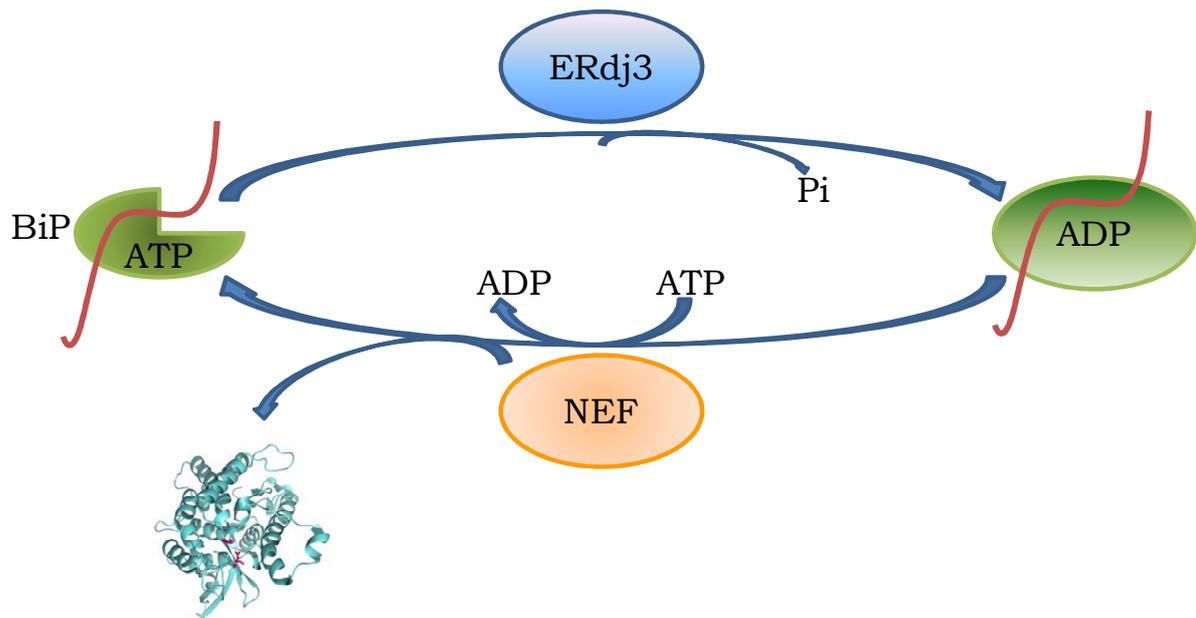


Figura D.6. ERdj3 estimula la actividad ATPasa de BiP. Chaperonas de la familia Hsp40 como ERdj3, se asocian con la chaperona BiP y estimulan su actividad ATPasa facilitando así el plegamiento de sustratos desnaturalizados.

La interacción de SlrP con una proteína del retículo endoplásmico nos llevó a estudiar su localización subcelular. Un estudio previo, realizado con microscopía de inmunofluorescencia convencional, indicaba que una versión de SlrP etiquetada con HA estaba presente en el citoplasma y excluida del núcleo de células Raw-TT10 y CHO-K1 transfectadas transtoriamente (Haraga y Miller, 2003). Nuestros experimentos de microscopía confocal confirman que SlrP se distribuye uniformemente en el citoplasma de las células HeLa, pero también muestran un solapamiento significativo con ERdj3 (**Figura R.3.6**). La localización parcial de SlrP en el retículo endoplásmico se confirmó mediante el análisis de una fracción microsómica obtenida a partir de células HeLa transfectadas. La comparación cuantitativa de las bandas en la **Figura R.3.7** indica que, al menos, un 10% de SlrP está en la fracción microsómica. Las proteínas que viajan al retículo endoplásmico tienen una secuencia señal, que es necesaria para poder entrar en el orgánulo. Por ello, se usó el programa Sig-Pred (J. R. Bradford, University of Leeds, http://bmbpcu36.leeds.ac.uk/prot_analysis/Sigma.html) para tratar de identificar una secuencia señal que pudiera dirigir la translocación de SlrP desde el citosol al retículo endoplásmico. Se identificó la presunta secuencia señal: ISAFFSSEHQVEA. Sin embargo, no

se pudo predecir ninguna secuencia señal cuando se usaron otros programas informáticos, incluido el programa SignalP (Bendtsen et al., 2004). La presencia de una secuencia señal imperfecta podría explicar la localización sólo parcial de SlrP en el retículo endoplásmico, que indican nuestros experimentos. De hecho, diferentes secuencias señal tienen diferentes eficiencias en la iniciación de la translocación (Kang et al., 2006; Kim et al., 2002), lo cual podría explicar los ejemplos previos de proteínas que residen en diferentes compartimentos celulares (Johnson et al., 2001). En el caso de SlrP, este hecho podría permitir la interacción con dos ligandos diferentes en la célula eucariótica, Trx y ERdj3, que están localizados en compartimentos celulares distintos y, por tanto, no competirían entre sí por unirse a SlrP. Una prueba a favor de que en SlrP existe un péptido señal que se elimina durante la translocación al retículo endoplásmico se presenta en la **Figura R.3.8** en la que se observan diferentes pesos moleculares para las fracciones de SlrP presentes en el retículo endoplásmico y en el citosol.

Los miembros de la familia DnaJ se clasifican en tres grupos: tipo I, tipo II y tipo III. Las proteínas de tipo I contienen 3 regiones en común: un dominio J, de unos 70 aminoácidos aproximadamente, que media la interacción con la chaperona Hsp70 y regula su actividad ATPasa; un dominio rico en glicina y fenilalanina (G/F), que actúa como punto de unión flexible; y un dominio rico en cisteínas consistente en cuatro motivos CXXCXG que funcionan en parejas, siendo cada pareja capaz de unirse a una molécula de zinc. Las proteínas de tipo II contienen el dominio J y el dominio rico en G/F, mientras que las proteínas de tipo III sólo tienen en común con las demás el dominio J (Cheetham y Caplan, 1998; Fan et al., 2003). ERdj3 contiene un dominio J y un dominio rico en G/F, pero además contiene un dominio rico en cisteína atípico, con sólo un motivo CXC y un motivo CXXC, cuya presencia y estado redox contribuyen a la interacción con sus sustratos (Marcus et al., 2007). ERdj3 es similar a la proteína de levaduras Ydj1 (Li et al., 2003; Li y Sha, 2005). Ésta posee, además de los dominios J y G/F, una región carboxilo terminal que puede dividirse en los dominios I, II y III. De ellos, es el dominio II el que posee los motivos de

cisteína. Los tres dominios se pueden reconocer también en ERdj3. Se sabe que el dominio I y el dominio II de ERdj3 son esenciales para la interacción con el sustrato (Jin et al., 2009). Nuestros experimentos con formas truncadas de ERdj3 (**Figuras R.3.3, R.3.4 y R.3.5**) indican que el dominio II es esencial para la interacción con SlrP y que, en cambio, los dominios I, J y G/F no son necesarios. Estos resultados sugieren que SlrP no está actuando simplemente como un sustrato desnaturalizado de ERdj3 (que requeriría el concurso del dominio I), sino que la interacción SlrP/ERdj3 es específica. Los resultados son también coherentes con los obtenidos en los experimentos funcionales presentados en las **Figuras R.3.9, R.3.10 y R.3.11**. La presencia de SlrP no afectó a la interacción de ERdj3 con la chaperona BiP, ni a la estimulación de su actividad ATPasa (que son dependientes del dominio J), pero sí produjo una reducción significativa de la interacción entre ERdj3 y un sustrato desnaturalizado, como la tiroglobulina. Esto podría tener importantes consecuencias funcionales: debido a que el dominio II de ERdj3 es esencial tanto para la interacción de SlrP, como para la interacción con sustratos desnaturalizados, la competición por este dominio podría llevar a la acumulación de proteínas desnaturalizadas en el retículo endoplásmico. Esta acumulación podría iniciar la respuesta a proteínas mal plegadas. Finalmente, si el defecto en el mal plegamiento de las proteínas no se resuelve, la activación crónica de dicho sistema de respuesta a proteínas mal plegadas podría inducir apoptosis [revisado en (Malhotra y Kaufman, 2007)]. Ya se ha mencionado que las infecciones de cultivos celulares por *Salmonella* suelen conducir a un proceso de apoptosis u otras formas de muerte celular (Collier-Hyams et al., 2002; Fink y Cookson, 2007; Kim et al., 1998). Además, en esta Tesis se ha demostrado que la expresión del efector SlrP en cultivos de células HeLa aumenta la tasa de muerte celular (**Figura R2.9**). Por tanto, es posible que la interacción de SlrP con ERdj3 contribuya al aumento de la muerte celular observado en cultivos celulares que expresan SlrP o en cultivos infectados por *Salmonella*.

Estudios previos han mostrado que *S. enterica* serovar Typhimurium inhibe la presentación de antígeno en células dendríticas y la proliferación

de células T dependiente de esa presentación de antígenos. Además se sabe que el SST3-2 está implicado en dicha inhibición (Cheminay et al., 2005; Tobar et al., 2006) y que SlrP es uno de los efectores de este sistema de secreción que están implicados en la interferencia con la presentación de antígenos (Halici et al., 2008). La interacción de SlrP con ERdj3 y su competición por sustratos desnaturalizados podrían tener también una conexión con esos resultados y servirles de explicación, ya que se sabe que el estrés en el retículo endoplásmico bloquea la presentación de péptidos por parte del del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (Granados et al., 2009).

Puesto que SlrP es una ligasa de ubiquitina E3 que puede usar Trx como sustrato (**capítulo 2**), cabe preguntarse si ERdj3 podría ser otro sustrato para la ubiquitinación dependiente de SlrP. De hecho, en experimentos de ubiquitinación *in vitro* y usando SlrP como ligasa de ubiquitina se observan bandas que podrían corresponderse con formas ubiquitinadas de ERdj3 (datos no mostrados). Sin embargo, la ubiquitinación de ERdj3 *in vivo*, se antoja poco probable debido a que se trata de una proteína residente en el lumen del retículo endoplásmico y no se ha descrito ubiquitinación en ese compartimento. Teniendo en cuenta estas consideraciones, concluimos que el papel de SlrP en el retículo endoplásmico se desarrolla por una vía independiente de la ubiquitinación. Esta idea está reforzada por los resultados obtenidos con la versión mutante de SlrP, en la que se cambió en la posición 546 una cisteína clave para la actividad ligasa de ubiquitina por una alanina, y que es, por tanto enzimáticamente inactiva. Este mutante, al igual que la versión silvestre de SlrP, es capaz de interaccionar con ERdj3 (**Figura R.3.1**) y de interferir en la interacción de ERdj3 con sustratos desnaturalizados (**Figura R.3.11**). Además, este mutante aumenta la muerte celular en cultivos confluentes de células HeLa transfectados con SlrP, aunque no al mismo nivel que la versión silvestre del efector (**Figura R.2.9**). En consonancia con esto, se ha propuesto también una función no relacionada con la ubiquitinación para el dominio carboxilo terminal de SspH2 (Quezada et al., 2009), otro efector del

SST3-2 que pertenece a la misma familia de SlrP y que también tiene actividad ligasa de ubiquitina.

Teniendo en cuenta todos los resultados anteriormente mencionados, proponemos un modelo en el que SlrP, tras ser translocado al citosol de la célula eucariota por los dos SST3 de *S. enterica*, favorece la muerte de la célula hospedadora por dos mecanismos complementarios: (i) la interacción con Trx en el citosol provoca la ubiquitinación de su ligando y causa una disminución de su actividad redox; (ii) la interacción con ERdj3 en el retículo endoplásmico interfiere, por una vía independiente de la ubiquitinación, en la función de esta chaperona, provocando la acumulación de proteínas mal plegadas en este compartimento celular. Además, este segundo efecto podría explicar, como antes se ha mencionado, la inhibición, dependiente de SlrP, de la presentación de antígeno en células dendríticas. En la **Figura D.7** se presenta un esquema de este modelo.

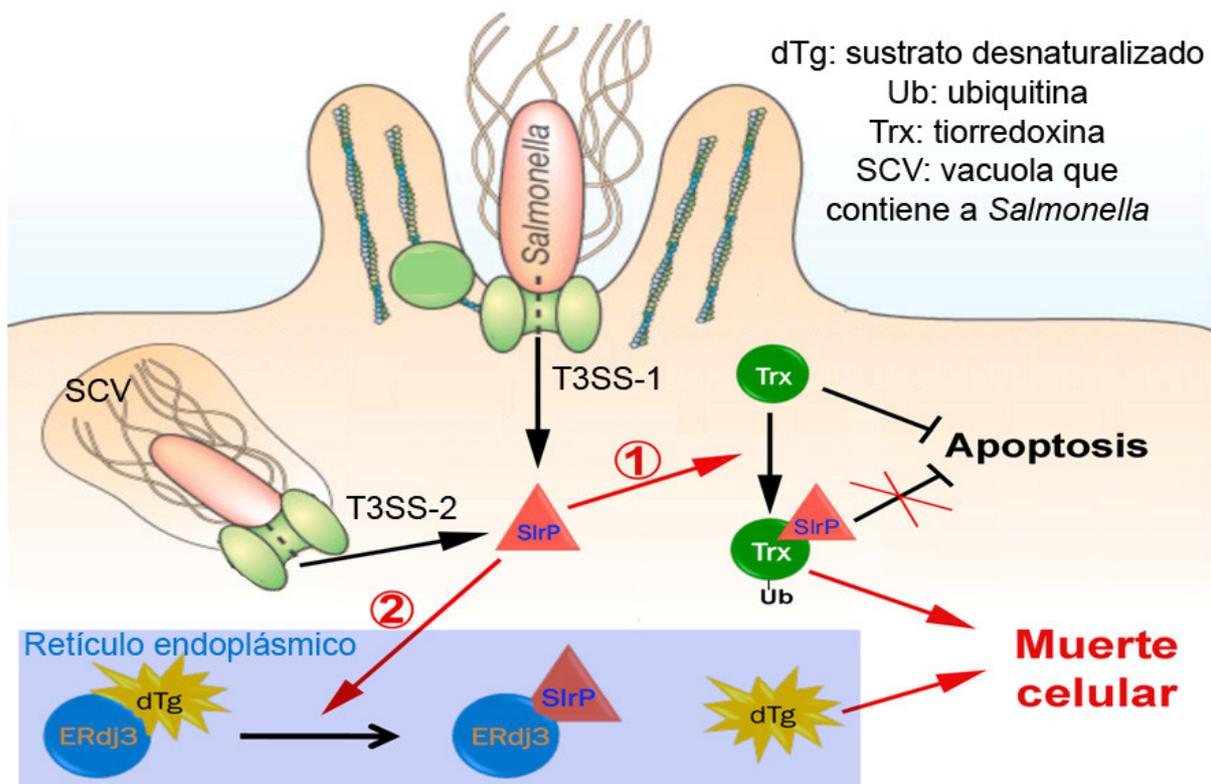


Figura D.7. Modelo del mecanismo de acción de SlrP

El análisis estructural de proteínas mediante métodos cristalográficos es una herramienta clave para el entendimiento de los mecanismos moleculares que dirigen las interacciones proteína-proteína y para la

comprensión de su función. Por este motivo el último capítulo de este trabajo se dedicó a realizar un estudio preliminar encaminado a resolver la estructura del complejo SlrP-Trx. Esta parte del trabajo se realizó durante una estancia en el LEBS (Gif-sur-Yvette, Francia).

Para conseguir suficiente cantidad de las proteínas SlrP y Trx en las condiciones necesarias para los ensayos de cristalización (alta concentración y pureza) se utilizó el sistema de las 6His y se llevó a cabo un proceso de optimización de la producción a pequeña y gran escala. Además, puesto que no fue posible purificar la proteína completa SlrP, fue preciso purificar dos fragmentos de la misma, N-SlrP y SlrP-C, y demostrar que el segundo era capaz de interactuar con Trx. Para esto último se empleó la técnica ITC. Los experimentos de calorimetría demostraron la interacción entre el SlrP-C y Trx. No se observó, sin embargo, interacción entre Trx y N-SlrP, lo cual era esperable, debido a que el dominio LRR, implicado en interacciones proteína-proteína se encuentra en SlrP-C.

Los problemas iniciales para la purificación de Trx se resolvieron con la adición de un agente reductor (β -mercaptoetanol). Esto permitió obtener muestras concentradas y de alta pureza de Trx en forma monomérica. Debido a que el estado redox de Trx resulta clave para la interacción con otras proteínas, las preparaciones de fragmentos de SlrP también se suplementaron con β -mercaptoetanol para mantener el ambiente reductor a la hora de hacer los experimentos de ITC y los ensayos de cocrystalización.

Se llevaron a cabo ensayos de cristalización para SlrP-C y para las combinaciones SlrP-C/Trx y N-SlrP/SlrP-C/Trx. En todos los casos se tuvo éxito en la obtención de cristales en determinadas condiciones a pequeña escala. Recientemente se han resuelto las estructuras de los efectores IpaH de *Shigella* (Zhu et al., 2008) y SspH2 de *S. enterica* (Quezada et al., 2009), efectores de la misma familia que SlrP y que también son ligasas de ubiquitina (**Figuras D.8 y D.9**). SlrP presenta un 41% de identidad en la secuencia aminoacídica con SspH2 y un 34% con IpaH, por lo que sus estructuras deben ser bastante similares. Pareció, por tanto, más interesante abordar el análisis estructural de SlrP en complejo con su sustrato, Trx. Por ello, la optimizaron de las condiciones de cristalización

para obtener cristales de mayor tamaño que fueran válidos para los ensayos de difracción de rayos X, se llevó a cabo para los complejos binario y ternario. Ambos difractaron a 3,5 Å de resolución en el mismo grupo espacial (P222), con los mismos parámetros de la celda unidad. Esto sugiere que los cristales analizados contienen lo mismo, o bien SlrP-C solo o el complejo SlrP-C/Trx. Esto no se ha podido determinar debido a que no se obtuvieron suficientes cristales para poder analizar su composición mediante SDS-PAGE. La posibilidad de que los cristales contengan el fragmento SlrP-C solo es alta, ya que se obtuvieron cristales de este dominio aislado en las mismas condiciones. Sin embargo, la proteína sola y el complejo podrían cristalizar en las mismas condiciones pero con diferente empaquetamiento.

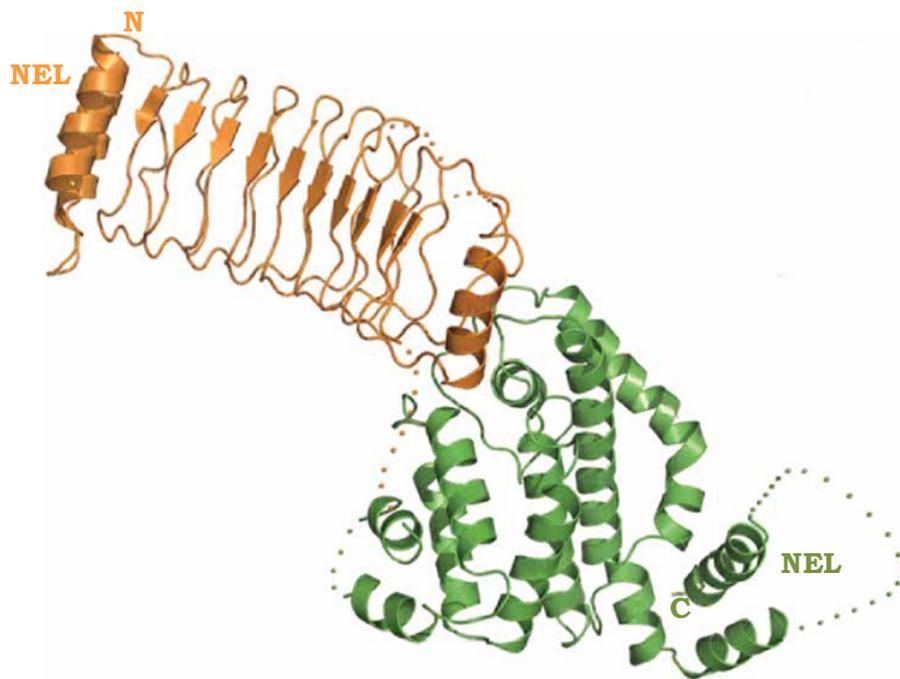


Figura D.8. Estructura del efector de *Shigella* IpaH. La estructura de IpaH se muestra como un diagrama de lazos, en el que aparece el dominio LRR en naranja y el dominio NEL en verde. Las líneas de puntos representan regiones lazo desordenadas. N, extremo amino terminal; C, extremo carboxilo terminal (Zhu et al., 2008).

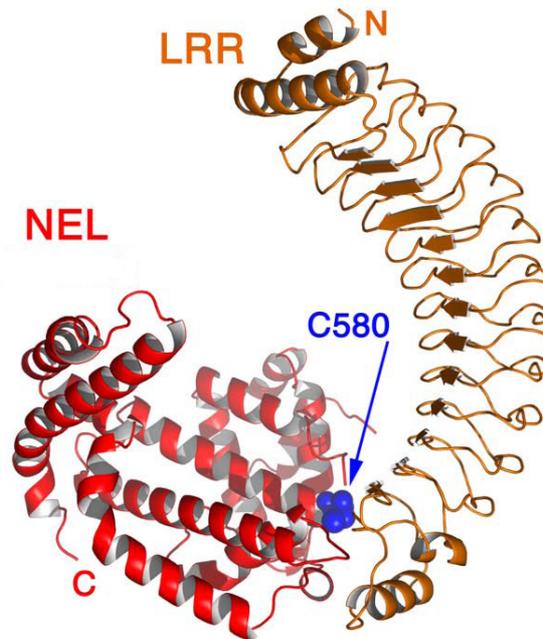


Figura D.9. Estructura del efector de *S. enterica* SspH2. La estructura de SspH2 se muestra como un diagrama de lazos, en el que aparece el dominio LRR en naranja y el dominio NEL en rojo. El residuo de cisteína catalítica se muestra en azul. N, extremo amino terminal; C, extremo carboxilo terminal (Quezada et al., 2009).

A pesar del alto porcentaje de identidad de las secuencias de SlrP y de los efectores SspH2 de *Salmonella* o de IpaH3 de *Shigella*, por el momento no ha sido posible resolver la estructura de SlrP mediante reemplazamiento molecular. La rotación que presentan los dominios LRR y NEL de las dos proteínas de estructura conocida (**Figura D.10**) explica las dificultades para resolver la estructura de SlrP por esta vía. A pesar de ello, hay que resaltar que se han dado pasos importantes en la dirección adecuada, con la optimización de las condiciones de producción de las proteínas, la elección de los dominios apropiados y la optimización de las condiciones de cristalización. Una aproximación que está previsto usar como alternativa consiste en producir proteínas sustituidas por selenometionina con objeto de utilizar el procedimiento cristalográfico MAD (*multiple wavelength anomalous diffraction*) para poder resolver el problema de fase y así poder determinar la estructura de SlrP y del complejo SlrP/Trx.

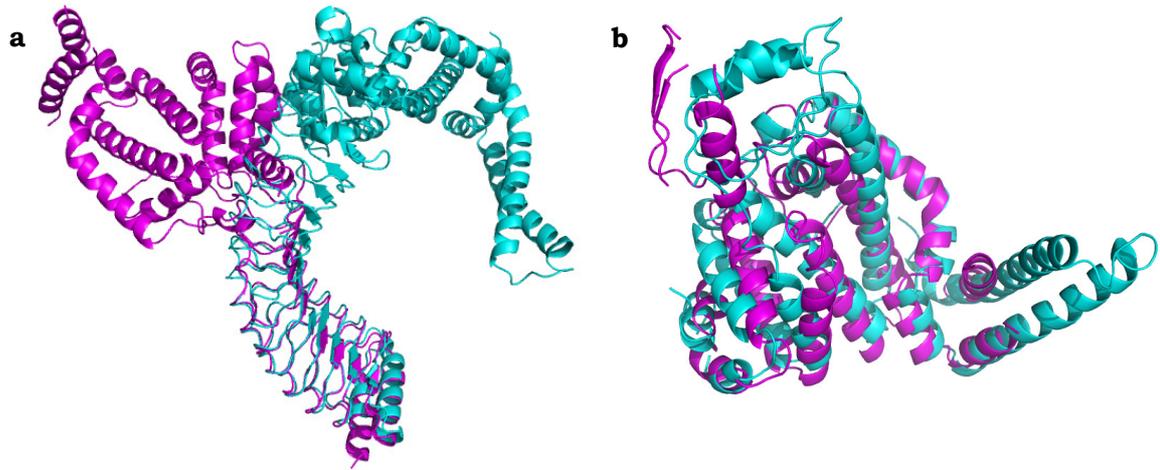


Figura D.10. Superposición de las estructuras de los efectores IpaH de *Shigella* y SspH2 de *Salmonella*. Las estructuras de SspH2 (morado) e IpaH (turquesa) muestran un importante grado de rotación entre los dominios LRR y NEL, por lo que la orientación relativa de dichos dominios en ambas proteínas es muy diferente. **a.** Superposición de las estructuras de las dos proteínas completas. **b.** Superposición del dominio carboxilo terminal de ambas proteínas.

CONCLUSIONES

1. Se han detectado dos proteínas humanas capaces de interactuar con el efector de los sistemas de secreción de tipo III de *Salmonella* SlrP: la tiorredoxina citosólica y la chaperona del retículo endoplásmico ERdj3.
2. Una vez en la célula hospedadora, SlrP se localiza en el citosol y en el retículo endoplásmico.
3. SlrP es una ligasa de ubiquitina E3 que puede usar la tiorredoxina citosólica humana como sustrato y provocar la disminución de su actividad redox.
4. La interacción de SlrP con ERdj3 requiere el dominio II de esta chaperona e interfiere, por una vía independiente de la ubiquitinación, con su función.
5. Se ha cristalizado el complejo SlrP-Trx y se han obtenido datos de difracción de rayos X con objeto de resolver la estructura del complejo.
6. Los resultados obtenidos apoyan un modelo según el cual SlrP podría favorecer la muerte de la célula hospedadora por dos mecanismos complementarios: 1) el descenso de la actividad tiorredoxina debido a la interacción con la tiorredoxina citosólica y su ubiquitinación; 2) la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico como consecuencia de la interferencia con la función de ERdj3

CONCLUSIONS

1. Two human proteins have been detected that are able to interact with the *Salmonella* type III secretion system effector SlrP: cytosolic thioredoxin and the endoplasmic reticulum chaperon ERdj3.
2. SlrP localizes to the cytosol and the endoplasmic reticulum of the eukaryotic host cell.
3. SlrP is an E3 ubiquitin ligase that is able to use human cytosolic thioredoxin as a substrate and to cause a decrease in its redox activity.
4. The interaction of SlrP with ERdj3 requires domain II of this chaperon and interferes with its function in an ubiquitination independent manner.
5. The complex SlrP-Trx has been crystallized and X-ray diffraction data have been obtained with the aim of solving the structure of this complex.
6. The results presented here support a model in which SlrP could promote death of the host cell by two complementary mechanisms: 1) decrease in thioredoxin activity due to interaction with cytosolic thioredoxin and ubiquitination of this target; 2) accumulation of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum as a consequence of the interference with the function of ERdj3.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdul, K. M., Terada, K., Gotoh, T., Hafizur, R. M. y Mori, M.** (2002). Characterization and functional analysis of a heart-enriched DnaJ/ Hsp40 homolog dj4/DjA4. *Cell Stress Chaperones* **7**, 156-166.
- Aiastui, A., Pucciarelli, M. G. y Garcia-del Portillo, F.** (2010). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium invades fibroblasts by multiple routes differing from the entry into epithelial cells. *Infect Immun* **78**, 2700-2713.
- Akeda, Y. y Galan, J. E.** (2005). Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion. *Nature* **437**, 911-915.
- Alvarez-Martinez, C. E. y Christie, P. J.** (2009). Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 775-808.
- Andersen, J. F., Sanders, D. A., Gasdaska, J. R., Weichsel, A., Powis, G. y Montfort, W. R.** (1997). Human thioredoxin homodimers: regulation by pH, role of aspartate 60, and crystal structure of the aspartate 60 --> asparagine mutant. *Biochemistry* **36**, 13979-13988.
- Angot, A., Vergunst, A., Genin, S. y Peeters, N.** (2007). Exploitation of eukaryotic ubiquitin signaling pathways by effectors translocated by bacterial type III and type IV secretion systems. *PLoS Pathog* **3**, e3.
- Arner, E. S. y Holmgren, A.** (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *Eur J Biochem* **267**, 6102-6109.
- Arner, E. S., Zhong, L. y Holmgren, A.** (1999). Preparation and assay of mammalian thioredoxin and thioredoxin reductase. *Methods Enzymol* **300**, 226-239.
- Backert, S. y Meyer, T. F.** (2006). Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr Opin Microbiol* **9**, 207-217.
- Bakowski, M. A., Braun, V. y Brumell, J. H.** (2008). *Salmonella*-containing vacuoles: directing traffic and nesting to grow. *Traffic* **9**, 2022-2031.
- Barthel, M., Hapfelmeier, S., Quintanilla-Martinez, L., Kremer, M., Rohde, M., Hogardt, M., Pfeffer, K., Russmann, H. y Hardt, W. D.** (2003). Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host. *Infect Immun* **71**, 2839-2858.
- Baumler, A. J., Tsolis, R. M., Ficht, T. A. y Adams, L. G.** (1998). Evolution of host adaptation in *Salmonella enterica*. *Infect Immun* **66**, 4579-4587.
- Bellamy, R.** (1999). The natural resistance-associated macrophage protein and susceptibility to intracellular pathogens. *Microbes Infect* **1**, 23-27.
- Bello, R. I., Alcain, F. J., Gomez-Diaz, C., Lopez-Lluch, G., Navas, P. y Villalba, J. M.** (2003). Hydrogen peroxide- and cell-density-regulated expression of NADH-cytochrome b5 reductase in HeLa cells. *J Bioenerg Biomembr* **35**, 169-179.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. y Brunak, S.** (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**, 783-795.
- Bernal-Bayard, J., Cardenal-Munoz, E. y Ramos-Morales, F.** (2010). The *Salmonella* type III secretion effector, *Salmonella* leucine-rich repeat protein (SlrP), targets the human chaperone ERdj3. *J Biol Chem* **285**, 16360-16368.

- Bernal-Bayard, J. y Ramos-Morales, F.** (2009). *Salmonella* type III secretion effector SlrP is an E3 ubiquitin ligase for mammalian thioredoxin. *J Biol Chem* **284**, 27587-27595.
- Bertini, R., Howard, O. M., Dong, H. F., Oppenheim, J. J., Bizzarri, C., Sergi, R., Caselli, G., Pagliei, S., Romines, B., Wilshire, J. A. et al.** (1999). Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med* **189**, 1783-1789.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. y Ron, D.** (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* **2**, 326-332.
- Beuzon, C. R., Banks, G., Deiwick, J., Hensel, M. y Holden, D. W.** (1999). pH-dependent secretion of SseB, a product of the SPI-2 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **33**, 806-816.
- Beuzon, C. R. y Holden, D. W.** (2001). Use of mixed infections with *Salmonella* strains to study virulence genes and their interactions *in vivo*. *Microbes Infect* **3**, 1345-1352.
- Beuzon, C. R., Meresse, S., Unsworth, K. E., Ruiz-Albert, J., Garvis, S., Waterman, S. R., Ryder, T. A., Boucrot, E. y Holden, D. W.** (2000). *Salmonella* maintains the integrity of its intracellular vacuole through the action of SifA. *EMBO J* **19**, 3235-3249.
- Bies, C., Guth, S., Janoschek, K., Nastainczyk, W., Volkmer, J. y Zimmermann, R.** (1999). A Scj1p homolog and folding catalysts present in dog pancreas microsomes. *Biol Chem* **380**, 1175-1182.
- Birnboim, H. C.** (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* **100**, 243-255.
- Bizzarri, C., Holmgren, A., Pekkari, K., Chang, G., Colotta, F., Ghezzi, P. y Bertini, R.** (2005). Requirements for the different cysteines in the chemotactic and desensitizing activity of human thioredoxin. *Antioxid Redox Signal* **7**, 1189-1194.
- Blanc-Potard, A. B., Solomon, F., Kayser, J. y Groisman, E. A.** (1999). The SPI-3 pathogenicity island of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **181**, 998-1004.
- Blattner, F. R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C. A., Perna, N. T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J. D., Rode, C. K., Mayhew, G. F. et al.** (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453-1462.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P. y Allaoui, A.** (2001). Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secreton. *Mol Microbiol* **39**, 652-663.
- Blondel, C. J., Jimenez, J. C., Contreras, I. y Santiviago, C. A.** (2009). Comparative genomic analysis uncovers 3 novel loci encoding type six secretion systems differentially distributed in *Salmonella* serotypes. *BMC Genomics* **10**, 354.
- Boucrot, E., Beuzon, C. R., Holden, D. W., Gorvel, J. P. y Meresse, S.** (2003). *Salmonella typhimurium* SifA effector protein requires its membrane-anchoring C-terminal hexapeptide for its biological function. *J Biol Chem* **278**, 14196-14202.
- Boyd, E. F., Wang, F. S., Whittam, T. S. y Selander, R. K.** (1996). Molecular genetic relationships of the *salmonellae*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 804-808.

- Boyle, E. C., Brown, N. F. y Finlay, B. B.** (2006). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium effectors SopB, SopE, SopE2 and SipA disrupt tight junction structure and function. *Cell Microbiol* **8**, 1946-1957.
- Brandtzaeg, P.** (1989). Overview of the mucosal immune system. *Curr Top Microbiol Immunol* **146**, 13-25.
- Brawn, L. C., Hayward, R. D. y Koronakis, V.** (2007). *Salmonella* SPI1 effector SipA persists after entry and cooperates with a SPI2 effector to regulate phagosome maturation and intracellular replication. *Cell Host Microbe* **1**, 63-75.
- Brennan, M. A. y Cookson, B. T.** (2000). *Salmonella* induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. *Mol Microbiol* **38**, 31-40.
- Bronzan, R. N., Taylor, T. E., Mwenechanya, J., Tembo, M., Kayira, K., Bwanaisa, L., Njobvu, A., Kondowe, W., Chalira, C., Walsh, A. L. et al.** (2007). Bacteremia in Malawian children with severe malaria: prevalence, etiology, HIV coinfection, and outcome. *J Infect Dis* **195**, 895-904.
- Brown, N. F., Vallance, B. A., Coombes, B. K., Valdez, Y., Coburn, B. A. y Finlay, B. B.** (2005). *Salmonella* pathogenicity island 2 is expressed prior to penetrating the intestine. *PLoS Pathog* **1**, e32.
- Brumell, J. H., Kujat-Choy, S., Brown, N. F., Vallance, B. A., Knodler, L. A. y Finlay, B. B.** (2003). SopD2 is a novel type III secreted effector of *Salmonella typhimurium* that targets late endocytic compartments upon delivery into host cells. *Traffic* **4**, 36-48.
- Brumell, J. H., Rosenberger, C. M., Gotto, G. T., Marcus, S. L. y Finlay, B. B.** (2001). SifA permits survival and replication of *Salmonella typhimurium* in murine macrophages. *Cell Microbiol* **3**, 75-84.
- Buchwald, G., Friebel, A., Galan, J. E., Hardt, W. D., Wittinghofer, A. y Scheffzek, K.** (2002). Structural basis for the reversible activation of a Rho protein by the bacterial toxin SopE. *EMBO J* **21**, 3286-3295.
- Bujny, M. V., Ewels, P. A., Humphrey, S., Attar, N., Jepson, M. A. y Cullen, P. J.** (2008). Sorting nexin-1 defines an early phase of *Salmonella*-containing vacuole-remodeling during *Salmonella* infection. *J Cell Sci* **121**, 2027-2036.
- Buttke, T. M. y Sandstrom, P. A.** (1994). Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* **15**, 7-10.
- Cain, R. J., Hayward, R. D. y Koronakis, V.** (2004). The target cell plasma membrane is a critical interface for *Salmonella* cell entry effector-host interplay. *Mol Microbiol* **54**, 887-904.
- Cain, R. J., Hayward, R. D. y Koronakis, V.** (2008). Deciphering interplay between *Salmonella* invasion effectors. *PLoS Pathog* **4**, e1000037.
- Cano, D. A., Martinez-Moya, M., Pucciarelli, M. G., Groisman, E. A., Casadesus, J. y Garcia-Del Portillo, F.** (2001). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium response involved in attenuation of pathogen intracellular proliferation. *Infect Immun* **69**, 6463-6474.
- Cascales, E.** (2008). The type VI secretion toolkit. *EMBO Rep* **9**, 735-741.
- Cianciotto, N. P.** (2005). Type II secretion: a protein secretion system for all seasons. *Trends Microbiol* **13**, 581-588.

- Coburn, B., Li, Y., Owen, D., Vallance, B. A. y Finlay, B. B.** (2005). *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 2 is necessary for complete virulence in a mouse model of infectious enterocolitis. *Infect Immun* **73**, 3219-3227.
- Collaborative-Computational-Proyect.** (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**, 760-763.
- Collier-Hyams, L. S., Zeng, H., Sun, J., Tomlinson, A. D., Bao, Z. Q., Chen, H., Madara, J. L., Orth, K. y Neish, A. S.** (2002). Cutting edge: *Salmonella* AvrA effector inhibits the key proinflammatory, anti-apoptotic NF-kappa B pathway. *J Immunol* **169**, 2846-2850.
- Collins, C. A. y Brown, E. J.** (2010). Cytosol as battleground: ubiquitin as a weapon for both host and pathogen. *Trends Cell Biol* **20**, 205-213.
- Cookson, B. T. y Brennan, M. A.** (2001). Pro-inflammatory programmed cell death. *Trends Microbiol* **9**, 113-114.
- Cornelis, G. R.** (2006). The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**, 811-825.
- Cossarizza, A., Franceschi, C., Monti, D., Salvioli, S., Bellesia, E., Rivabene, R., Biondo, L., Rainaldi, G., Tinari, A. y Malorni, W.** (1995). Protective effect of N-acetylcysteine in tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in U937 cells: the role of mitochondria. *Exp Cell Res* **220**, 232-240.
- Crawford, R. W., Rosales-Reyes, R., Ramirez-Aguilar Mde, L., Chapa-Azuela, O., Alpuche-Aranda, C. y Gunn, J. S.** (2010). Gallstones play a significant role in *Salmonella* spp. gallbladder colonization and carriage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4353-4358.
- Crump, J. A., Luby, S. P. y Mintz, E. D.** (2004). The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ* **82**, 346-353.
- Cyr, D. M., Langer, T. y Douglas, M. G.** (1994). DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem Sci* **19**, 176-181.
- Cheetham, M. E. y Caplan, A. J.** (1998). Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones* **3**, 28-36.
- Cheminay, C., Mohlenbrink, A. y Hensel, M.** (2005). Intracellular *Salmonella* inhibit antigen presentation by dendritic cells. *J Immunol* **174**, 2892-2899.
- d'Enfert, C., Ryter, A. y Pugsley, A. P.** (1987). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Klebsiella pneumoniae* genes for production, surface localization and secretion of the lipoprotein pullulanase. *EMBO J* **6**, 3531-3538.
- Datsenko, K. A. y Wanner, B. L.** (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640-6645.
- De Buck, E., Lammertyn, E. y Anne, J.** (2008). The importance of the twin-arginine translocation pathway for bacterial virulence. *Trends Microbiol* **16**, 442-453.
- De Wit, S., Taelman, H., Van de Perre, P., Rouvroy, D. y Clumeck, N.** (1988). *Salmonella* bacteremia in African patients with human immunodeficiency virus infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **7**, 45-47.

- Deane, J. E., Abrusci, P., Johnson, S. y Lea, S. M.** (2010). Timing is everything: the regulation of type III secretion. *Cell Mol Life Sci* **67**, 1065-1075.
- Deiwick, J., Nikolaus, T., Shea, J. E., Gleeson, C., Holden, D. W. y Hensel, M.** (1998). Mutations in *Salmonella* pathogenicity island 2 (SPI2) genes affecting transcription of SPI1 genes and resistance to antimicrobial agents. *J Bacteriol* **180**, 4775-4780.
- Desvaux, M., Parham, N. J. y Henderson, I. R.** (2004). Type V protein secretion: simplicity gone awry? *Curr Issues Mol Biol* **6**, 111-124.
- Diacovich, L., Dumont, A., Lafitte, D., Soprano, E., Guilhon, A. A., Bignon, C., Gorvel, J. P., Bourne, Y. y Meresse, S.** (2009). Interaction between the SifA virulence factor and its host target SKIP is essential for *Salmonella* pathogenesis. *J Biol Chem* **284**, 33151-33160.
- Diao, J., Zhang, Y., Huibregtse, J. M., Zhou, D. y Chen, J.** (2008). Crystal structure of SopA, a *Salmonella* effector protein mimicking a eukaryotic ubiquitin ligase. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 65-70.
- Dorsey, C. W., Laarakker, M. C., Humphries, A. D., Weening, E. H. y Baumler, A. J.** (2005). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Mol Microbiol* **57**, 196-211.
- Drecktrah, D., Knodler, L. A., Galbraith, K. y Steele-Mortimer, O.** (2005). The *Salmonella* SPI1 effector SopB stimulates nitric oxide production long after invasion. *Cell Microbiol* **7**, 105-113.
- Dukes, J. D., Lee, H., Hagen, R., Reaves, B. J., Layton, A. N., Galyov, E. E. y Whitley, P.** (2006). The secreted *Salmonella dublin* phosphoinositide phosphatase, SopB, localizes to PtdIns(3)P-containing endosomes and perturbs normal endosome to lysosome trafficking. *Biochem J* **395**, 239-247.
- Duong, F. y Wickner, W.** (1997). The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J* **16**, 4871-4879.
- Dutta, U., Garg, P. K., Kumar, R. y Tandon, R. K.** (2000). Typhoid carriers among patients with gallstones are at increased risk for carcinoma of the gallbladder. *Am J Gastroenterol* **95**, 784-787.
- Ehrbar, K., Miroid, S., Friebel, A., Stender, S. y Hardt, W. D.** (2002). Characterization of effector proteins translocated via the SPI1 type III secretion system of *Salmonella typhimurium*. *Int J Med Microbiol* **291**, 479-485.
- Elsinghorst, E. A.** (1994). Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods Enzymol* **236**, 405-420.
- Fan, C. Y., Lee, S. y Cyr, D. M.** (2003). Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress Chaperones* **8**, 309-316.
- Figueroa-Bossi, N., Uzzau, S., Maloriol, D. y Bossi, L.** (2001). Variable assortment of prophages provides a transferable repertoire of pathogenic determinants in *Salmonella*. *Mol Microbiol* **39**, 260-271.
- Filloux, A.** (2004). The underlying mechanisms of type II protein secretion. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 163-179.

- Filloux, A., Hachani, A. y Bleves, S.** (2008). The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes. *Microbiology* **154**, 1570-1583.
- Fink, A. L.** (1999). Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev* **79**, 425-449.
- Fink, S. L. y Cookson, B. T.** (2006). Caspase-1-dependent pore formation during pyroptosis leads to osmotic lysis of infected host macrophages. *Cell Microbiol* **8**, 1812-1825.
- Fink, S. L. y Cookson, B. T.** (2007). Pyroptosis and host cell death responses during *Salmonella* infection. *Cell Microbiol* **9**, 2562-2570.
- Flick, K., Ouni, I., Wohlschlegel, J. A., Capati, C., McDonald, W. H., Yates, J. R. y Kaiser, P.** (2004). Proteolysis-independent regulation of the transcription factor Met4 by a single Lys 48-linked ubiquitin chain. *Nat Cell Biol* **6**, 634-641.
- Folkesson, A., Lofdahl, S. y Normark, S.** (2002). The *Salmonella enterica* subspecies I specific centisome 7 genomic island encodes novel protein families present in bacteria living in close contact with eukaryotic cells. *Res Microbiol* **153**, 537-545.
- Freter, R., O'Brien, P. C. y Macsai, M. S.** (1981). Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: in vivo studies. *Infect Immun* **34**, 234-240.
- Friebel, A., Ilchmann, H., Aepfelbacher, M., Ehrbar, K., Machleidt, W. y Hardt, W. D.** (2001). SopE and SopE2 from *Salmonella typhimurium* activate different sets of RhoGTPases of the host cell. *J Biol Chem* **276**, 34035-34040.
- Fronzes, R., Christie, P. J. y Waksman, G.** (2009). The structural biology of type IV secretion systems. *Nat Rev Microbiol* **7**, 703-714.
- Fujii, J. y Ikeda, Y.** (2002). Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein. *Redox Rep* **7**, 123-130.
- Galan, J. E.** (2001). *Salmonella* interactions with host cells: type III secretion at work. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 53-86.
- Galan, J. E., Ginocchio, C. y Costeas, P.** (1992). Molecular and functional characterization of the *Salmonella* invasion gene *invA*: homology of *InvA* to members of a new protein family. *J Bacteriol* **174**, 4338-4349.
- Galyov, E. E., Wood, M. W., Rosqvist, R., Mullan, P. B., Watson, P. R., Hedges, S. y Wallis, T. S.** (1997). A secreted effector protein of *Salmonella dublin* is translocated into eukaryotic cells and mediates inflammation and fluid secretion in infected ileal mucosa. *Mol Microbiol* **25**, 903-912.
- Garcia-del Portillo, F. y Finlay, B. B.** (1995). Targeting of *Salmonella typhimurium* to vesicles containing lysosomal membrane glycoproteins bypasses compartments with mannose 6-phosphate receptors. *J Cell Biol* **129**, 81-97.
- Garcia-del Portillo, F., Zwick, M. B., Leung, K. Y. y Finlay, B. B.** (1993). *Salmonella* induces the formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins in epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10544-10548.
- Gerlach, R. G., Claudio, N., Rohde, M., Jackel, D., Wagner, C. y Hensel, M.** (2008). Cooperation of *Salmonella* pathogenicity islands 1 and 4 is required to breach epithelial barriers. *Cell Microbiol* **10**, 2364-2376.

- Gerlach, R. G. y Hensel, M.** (2007). Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol* **297**, 401-415.
- Gerlach, R. G., Jackel, D., Stecher, B., Wagner, C., Lupas, A., Hardt, W. D. y Hensel, M.** (2007). *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cell Microbiol* **9**, 1834-1850.
- Giacomodonato, M. N., Uzzau, S., Bacciu, D., Caccuri, R., Sarnacki, S. H., Rubino, S. y Cerquetti, M. C.** (2007). SipA, SopA, SopB, SopD and SopE2 effector proteins of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium are synthesized at late stages of infection in mice. *Microbiology* **153**, 1221-1228.
- Gietz, D., St Jean, A., Woods, R. A. y Schiestl, R. H.** (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* **20**, 1425.
- Govoni, G. y Gros, P.** (1998). Macrophage NRAMP1 and its role in resistance to microbial infections. *Inflamm Res* **47**, 277-284.
- Granados, D. P., Tanguay, P. L., Hardy, M. P., Caron, E., de Verteuil, D., Meloche, S. y Perreault, C.** (2009). ER stress affects processing of MHC class I-associated peptides. *BMC Immunol* **10**, 10.
- Greene, M. K., Maskos, K. y Landry, S. J.** (1998). Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6108-6113.
- Grimont, F., Lejay-Collin, M., Talukder, K. A., Carle, I., Issenhuth, S., Le Roux, K. y Grimont, P. A.** (2007). Identification of a group of *shigella*-like isolates as *Shigella boydii* 20. *J Med Microbiol* **56**, 749-754.
- Groisman, E. A. y Ochman, H.** (1994). How to become a pathogen. *Trends Microbiol* **2**, 289-294.
- Groisman, E. A. y Ochman, H.** (1996). Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* **87**, 791-794.
- Groisman, E. A. y Ochman, H.** (1997). How *Salmonella* became a pathogen. *Trends Microbiol* **5**, 343-349.
- Gruenheid, S., Pinner, E., Desjardins, M. y Gros, P.** (1997). Natural resistance to infection with intracellular pathogens: the Nramp1 protein is recruited to the membrane of the phagosome. *J Exp Med* **185**, 717-730.
- Guignot, J., Caron, E., Beuzon, C., Bucci, C., Kagan, J., Roy, C. y Holden, D. W.** (2004). Microtubule motors control membrane dynamics of *Salmonella*-containing vacuoles. *J Cell Sci* **117**, 1033-45.
- Gulig, P. A., Danbara, H., Guiney, D. G., Lax, A. J., Norel, F. y Rhen, M.** (1993). Molecular analysis of spv virulence genes of the *Salmonella* virulence plasmids. *Mol Microbiol* **7**, 825-830.
- Guy, R. L., Gonias, L. A. y Stein, M. A.** (2000). Aggregation of host endosomes by *Salmonella* requires SPI2 translocation of SseFG and involves SpvR and the fms-aroE intragenic region. *Mol Microbiol* **37**, 1417-1435.
- Haas, A.** (2007). The phagosome: compartment with a license to kill. *Traffic* **8**, 311-330.
- Hacker, J. y Kaper, J. B.** (2000). Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* **54**, 641-679.

- Halici, S., Zenk, S. F., Jantsch, J. y Hensel, M.** (2008). Functional analysis of the *Salmonella* pathogenicity island 2-mediated inhibition of antigen presentation in dendritic cells. *Infect Immun* **76**, 4924-4933.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hansen-Wester, I. y Hensel, M.** (2001). *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes Infect* **3**, 549-559.
- Hapfelmeier, S. y Hardt, W. D.** (2005). A mouse model for *S. typhimurium*-induced enterocolitis. *Trends Microbiol* **13**, 497-503.
- Haraga, A. y Miller, S. I.** (2003). A *Salmonella enterica* serovar Typhimurium translocated leucine-rich repeat effector protein inhibits NF-kappa B-dependent gene expression. *Infect Immun* **71**, 4052-4058.
- Haraga, A. y Miller, S. I.** (2006). A *Salmonella* type III secretion effector interacts with the mammalian serine/threonine protein kinase PKN1. *Cell Microbiol* **8**, 837-846.
- Haraga, A., Ohlson, M. B. y Miller, S. I.** (2008). *Salmonellae* interplay with host cells. *Nat Rev Microbiol* **6**, 53-66.
- Harper, J. W., Adami, G. R., Wei, N., Keyomarsi, K. y Elledge, S. J.** (1993). The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805-816.
- Hayward, R. D. y Koronakis, V.** (2002). Direct modulation of the host cell cytoskeleton by *Salmonella* actin-binding proteins. *Trends Cell Biol* **12**, 15-20.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. y Ala'Aldeen, D.** (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 692-744.
- Henry, T., Couillault, C., Rockenfeller, P., Boucrot, E., Dumont, A., Schroeder, N., Hermant, A., Knodler, L. A., Lecine, P., Steele-Mortimer, O. et al.** (2006). The *Salmonella* effector protein PipB2 is a linker for kinesin-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13497-13502.
- Hensel, M.** (2000). *Salmonella* pathogenicity island 2. *Mol Microbiol* **36**, 1015-1023.
- Hensel, M.** (2004). Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica* *Int J Med Microbiol* **294**, 95-102.
- Hensel, M., Shea, J. E., Raupach, B., Monack, D., Falkow, S., Gleeson, C., Kubo, T. y Holden, D. W.** (1997). Functional analysis of ssaJ and the ssaK/U operon, 13 genes encoding components of the type III secretion apparatus of *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Mol Microbiol* **24**, 155-167.
- Hernandez, L. D., Hueffer, K., Wenk, M. R. y Galan, J. E.** (2004). *Salmonella* modulates vesicular traffic by altering phosphoinositide metabolism. *Science* **304**, 1805-1807.
- Hersh, D., Monack, D. M., Smith, M. R., Ghori, N., Falkow, S. y Zychlinsky, A.** (1999). The *Salmonella* invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2396-2401.
- Hirota, K., Murata, M., Sachi, Y., Nakamura, H., Takeuchi, J., Mori, K. y Yodoi, J.** (1999). Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus.

- A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *J Biol Chem* **274**, 27891-27897.
- Hodgkinson, J. L., Horsley, A., Stabat, D., Simon, M., Johnson, S., da Fonseca, P. C., Morris, E. P., Wall, J. S., Lea, S. M. y Blocker, A. J.** (2009). Three-dimensional reconstruction of the *Shigella* T3SS transmembrane regions reveals 12-fold symmetry and novel features throughout. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 477-485.
- Holden, D. W.** (2002). Trafficking of the *Salmonella* vacuole in macrophages. *Traffic* **3**, 161-169.
- Holmgren, A.** (1985). Thioredoxin. *Annu Rev Biochem* **54**, 237-271.
- Holmgren, A.** (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* **264**, 13963-13966.
- Hueck, C. J.** (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**, 379-433.
- Humphreys, D., Hume, P. J. y Koronakis, V.** (2009). The *Salmonella* effector SptP dephosphorylates host AAA+ ATPase VCP to promote development of its intracellular replicative niche. *Cell Host Microbe* **5**, 225-233.
- Hunt, J. F., Weinkauff, S., Henry, L., Fak, J. J., McNicholas, P., Oliver, D. B. y Deisenhofer, J.** (2002). Nucleotide control of interdomain interactions in the conformational reaction cycle of SecA. *Science* **297**, 2018-26.
- Ibarra, J. A. y Steele-Mortimer, O.** (2009). *Salmonella*--the ultimate insider. *Salmonella* virulence factors that modulate intracellular survival. *Cell Microbiol* **11**, 1579-1586.
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K. y Gotoh, Y.** (1997). Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science* **275**, 90-94.
- Imaizumi, K., Miyoshi, K., Katayama, T., Yoneda, T., Taniguchi, M., Kudo, T. y Tohyama, M.** (2001). The unfolded protein response and Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* **1536**, 85-96.
- Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. y Kimura, A.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163-8.
- Jacobson, M. D.** (1996). Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem Sci* **21**, 83-86.
- Jaffe, A. B. y Hall, A.** (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-269.
- Jesenberger, V., Procyk, K. J., Yuan, J., Reipert, S. y Baccarini, M.** (2000). *Salmonella*-induced caspase-2 activation in macrophages: a novel mechanism in pathogen-mediated apoptosis. *J Exp Med* **192**, 1035-1046.
- Jin, Y., Zhuang, M. y Hendershot, L. M.** (2009). ERdj3, a luminal ER DnaJ homologue, binds directly to unfolded proteins in the mammalian ER: identification of critical residues. *Biochemistry* **48**, 41-49.
- Johnson, E. S.** (2002). Ubiquitin branches out. *Nat Cell Biol* **4**, E295-8.

- Johnson, S., Michalak, M., Opas, M. y Eggleton, P.** (2001). The ins and outs of calreticulin: from the ER lumen to the extracellular space. *Trends Cell Biol* **11**, 122-129.
- Jones, B. D., Ghorri, N. y Falkow, S.** (1994). *Salmonella typhimurium* initiates murine infection by penetrating and destroying the specialized epithelial M cells of the Peyer's patches. *J Exp Med* **180**, 15-23.
- Jones, R. M., Wu, H., Wentworth, C., Luo, L., Collier-Hyams, L. y Neish, A. S.** (2008). *Salmonella* AvrA Coordinates Suppression of Host Immune and Apoptotic Defenses via JNK Pathway Blockade. *Cell Host Microbe* **3**, 233-244.
- Junn, E., Han, S. H., Im, J. Y., Yang, Y., Cho, E. W., Um, H. D., Kim, D. K., Lee, K. W., Han, P. L., Rhee, S. G. et al.** (2000). Vitamin D3 up-regulated protein 1 mediates oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. *J Immunol* **164**, 6287-6295.
- Kabsch, W.** (2010). Xds. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **66**, 125-32.
- Kaimul, A. M., Nakamura, H., Masutani, H. y Yodoi, J.** (2007). Thioredoxin and thioredoxin-binding protein-2 in cancer and metabolic syndrome. *Free Radic Biol Med* **43**, 861-8.
- Kang, S. W., Rane, N. S., Kim, S. J., Garrison, J. L., Taunton, J. y Hegde, R. S.** (2006). Substrate-specific translocational attenuation during ER stress defines a pre-emptive quality control pathway. *Cell* **127**, 999-1013.
- Kaniga, K., Uralil, J., Bliska, J. B. y Galan, J. E.** (1996). A secreted protein tyrosine phosphatase with modular effector domains in the bacterial pathogen *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **21**, 633-641.
- Karavolos, M. H., Roe, A. J., Wilson, M., Henderson, J., Lee, J. J., Gally, D. L. y Khan, C. M.** (2005). Type III secretion of the *Salmonella* effector protein SopE is mediated via an N-terminal amino acid signal and not an mRNA sequence. *J Bacteriol* **187**, 1559-1567.
- Kaufman, R. J.** (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev* **13**, 1211-1233.
- Kelley, W. L.** (1998). The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem Sci* **23**, 222-227.
- Kim, J. M., Eckmann, L., Savidge, T. C., Lowe, D. C., Witthoft, T. y Kagnoff, M. F.** (1998). Apoptosis of human intestinal epithelial cells after bacterial invasion. *J Clin Invest* **102**, 1815-1823.
- Kim, S. J., Mitra, D., Salerno, J. R. y Hegde, R. S.** (2002). Signal sequences control gating of the protein translocation channel in a substrate-specific manner. *Dev Cell* **2**, 207-217.
- Kimbrough, T. G. y Miller, S. I.** (2000). Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 11008-11013.
- Kingsley, R. A., Santos, R. L., Keestra, A. M., Adams, L. G. y Baumler, A. J.** (2002). *Salmonella enterica* serotype Typhimurium ShdA is an outer membrane fibronectin-binding protein that is expressed in the intestine. *Mol Microbiol* **43**, 895-905.

- Kingsley, R. A., van Amsterdam, K., Kramer, N. y Baumler, A. J.** (2000). The *shdA* gene is restricted to serotypes of *Salmonella enterica* subspecies I and contributes to efficient and prolonged fecal shedding. *Infect Immun* **68**, 2720-2727.
- Klein, J. R. y Jones, B. D.** (2001). *Salmonella* pathogenicity island 2-encoded proteins SseC and SseD are essential for virulence and are substrates of the type III secretion system. *Infect Immun* **69**, 737-743.
- Knodler, L. A. y Finlay, B. B.** (2001). *Salmonella* and apoptosis: to live or let die? *Microbes Infect* **3**, 1321-1326.
- Knodler, L. A., Finlay, B. B. y Steele-Mortimer, O.** (2005). The *Salmonella* effector protein SopB protects epithelial cells from apoptosis by sustained activation of Akt. *J Biol Chem* **280**, 9058-9064.
- Knodler, L. A. y Steele-Mortimer, O.** (2005). The *Salmonella* effector PipB2 affects late endosome/lysosome distribution to mediate Sif extension. *Mol Biol Cell* **16**, 4108-4123.
- Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, M. J., Nisan, I., Neves, B. C., Bain, C., Wolff, C., Dougan, G. y Frankel, G.** (1998). A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* **17**, 2166-2176.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J. E. y Aizawa, S. I.** (1998). Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**, 602-605.
- Kuhle, V. y Hensel, M.** (2004). Cellular microbiology of intracellular *Salmonella enterica*: functions of the type III secretion system encoded by *Salmonella* pathogenicity island 2. *Cell Mol Life Sci* **61**, 2812-2826.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lai, C. W., Chan, R. C., Cheng, A. F., Sung, J. Y. y Leung, J. W.** (1992). Common bile duct stones: a cause of chronic salmonellosis. *Am J Gastroenterol* **87**, 1198-1199.
- Lalitha, M. K. y John, R.** (1994). Unusual manifestations of salmonellosis--a surgical problem. *Q J Med* **87**, 301-309.
- Latasa, C., Roux, A., Toledo-Arana, A., Ghigo, J. M., Gamazo, C., Penades, J. R. y Lasa, I.** (2005). BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Mol Microbiol* **58**, 1322-1339.
- Laurent, T. C., Moore, E. C. y Reichard, P.** (1964). Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleotides. Iv. Isolation and Characterization of Thioredoxin, the Hydrogen Donor from *Escherichia Coli B*. *J Biol Chem* **239**, 3436-3444.
- Lavigne, J. P. y Blanc-Potard, A. B.** (2008). Molecular evolution of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and pathogenic *Escherichia coli*: from pathogenesis to therapeutics. *Infect Genet Evol* **8**, 217-226.
- Lawley, T. D., Chan, K., Thompson, L. J., Kim, C. C., Govoni, G. R. y Monack, D. M.** (2006). Genome-wide screen for *Salmonella* genes required for long-term systemic infection of the mouse. *PLoS Pathog* **2**, e11.

- Layton, A. N. y Galyov, E. E.** (2007). *Salmonella*-induced enteritis: molecular pathogenesis and therapeutic implications. *Expert Rev Mol Med* **9**, 1-17.
- Le Negrate, G., Faustin, B., Welsh, K., Loeffler, M., Krajewska, M., Hasegawa, P., Mukherjee, S., Orth, K., Krajewski, S., Godzik, A. et al.** (2008). *Salmonella* secreted factor L deubiquitinase of *Salmonella typhimurium* inhibits NF-kappaB, suppresses IkappaBalpha ubiquitination and modulates innate immune responses. *J Immunol* **180**, 5045-5056.
- Lee, S. H. y Galan, J. E.** (2004). *Salmonella* type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol Microbiol* **51**, 483-495.
- Li, H., Xu, H., Zhou, Y., Zhang, J., Long, C., Li, S., Chen, S., Zhou, J. M. y Shao, F.** (2007). The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. *Science* **315**, 1000-1003.
- Li, J., Qian, X. y Sha, B.** (2003). The crystal structure of the yeast Hsp40 Ydj1 complexed with its peptide substrate. *Structure* **11**, 1475-1483.
- Li, J. y Sha, B.** (2005). Structure-based mutagenesis studies of the peptide substrate binding fragment of type I heat-shock protein 40. *Biochem J* **386**, 453-460.
- Li, W. y Ye, Y.** (2008). Polyubiquitin chains: functions, structures, and mechanisms. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2397-2406.
- Liao, A. P., Petrof, E. O., Kuppireddi, S., Zhao, Y., Xia, Y., Claud, E. C. y Sun, J.** (2008). *Salmonella* type III effector AvrA stabilizes cell tight junctions to inhibit inflammation in intestinal epithelial cells. *PLoS One* **3**, e2369.
- Lin, S. L., Le, T. X. y Cowen, D. S.** (2003). SptP, a *Salmonella typhimurium* type III-secreted protein, inhibits the mitogen-activated protein kinase pathway by inhibiting Raf activation. *Cell Microbiol* **5**, 267-275.
- Liyanage, N. P., Fernando, M. R. y Lou, M. F.** (2007). Regulation of the bioavailability of thioredoxin in the lens by a specific thioredoxin-binding protein (TBP-2). *Exp Eye Res* **85**, 270-279.
- Lossi, N. S., Rolhion, N., Magee, A. I., Boyle, C. y Holden, D. W.** (2008). The *Salmonella* SPI-2 effector SseJ exhibits eukaryotic activator-dependent phospholipase A and glycerophospholipid : cholesterol acyltransferase activity. *Microbiology* **154**, 2680-2688.
- Loistroh, C. P. y Lee, C. A.** (2001). The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system. *Microbes Infect* **3**, 1281-1291.
- Lundberg, U., Vinatzer, U., Berdnik, D., von Gabain, A. y Baccarini, M.** (1999). Growth phase-regulated induction of *Salmonella*-induced macrophage apoptosis correlates with transient expression of SPI-1 genes. *J Bacteriol* **181**, 3433-3437.
- Luthman, M. y Holmgren, A.** (1982). Rat liver thioredoxin and thioredoxin reductase: purification and characterization. *Biochemistry* **21**, 6628-6633.
- Llosa, M., Roy, C. y Dehio, C.** (2009). Bacterial type IV secretion systems in human disease. *Mol Microbiol* **73**, 141-151.
- Ma, Y. y Hendershot, L. M.** (2002). The mammalian endoplasmic reticulum as a sensor for cellular stress. *Cell Stress Chaperones* **7**, 222-229.
- Macnab, R. M.** (2003). How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* **57**, 77-100.

- Malhotra, J. D. y Kaufman, R. J.** (2007). The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin Cell Dev Biol* **18**, 716-731.
- Maloy, S. R.** (1990). Experimental techniques in bacterial genetics. *Boston: Jones and Bartlett*.
- Mallo, G. V., Espina, M., Smith, A. C., Terebiznik, M. R., Aleman, A., Finlay, B. B., Rameh, L. E., Grinstein, S. y Brumell, J. H.** (2008). SopB promotes phosphatidylinositol 3-phosphate formation on *Salmonella* vacuoles by recruiting Rab5 and Vps34. *J Cell Biol* **182**, 741-752.
- Marcus, N. Y., Marcus, R. A., Schmidt, B. Z. y Haslam, D. B.** (2007). Contribution of the HEDJ/ERdj3 cysteine-rich domain to substrate interactions. *Arch Biochem Biophys* **468**, 147-158.
- Marlovits, T. C., Kubori, T., Sukhan, A., Thomas, D. R., Galan, J. E. y Unger, V. M.** (2004). Structural insights into the assembly of the type III secretion needle complex. *Science* **306**, 1040-1042.
- Marlovits, T. C. y Stebbins, C. E.** (2010). Type III secretion systems shape up as they ship out. *Curr Opin Microbiol* **13**, 47-52.
- Martoglio, B. y Dobberstein, B.** (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* **8**, 410-415.
- Masutani, H., Ueda, S. y Yodoi, J.** (2005). The thioredoxin system in retroviral infection and apoptosis. *Cell Death Differ* **12 Suppl 1**, 991-998.
- Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, J. y Taketo, M. M.** (1996). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev Biol* **178**, 179-185.
- Matthews, N., Neale, M. L., Jackson, S. K. y Stark, J. M.** (1987). Tumour cell killing by tumour necrosis factor: inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. *Immunology* **62**, 153-155.
- Mayer, M. y Noble, M.** (1994). N-acetyl-L-cysteine is a pluripotent protector against cell death and enhancer of trophic factor-mediated cell survival in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 7496-7500.
- Mazurkiewicz, P., Thomas, J., Thompson, J. A., Liu, M., Arbibe, L., Sansonetti, P. y Holden, D. W.** (2008). SpvC is a *Salmonella* effector with phosphothreonine lyase activity on host mitogen-activated protein kinases. *Mol Microbiol* **67**, 1371-1383.
- McClelland, M., Sanderson, K. E., Spieth, J., Clifton, S. W., Latreille, P., Courtney, L., Porwollik, S., Ali, J., Dante, M., Du, F. et al.** (2001). Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**, 852-856.
- McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. y Read, R. J.** (2007). Phaser crystallographic software. *J Appl Crystallogr* **40**, 658-674.
- McGhie, E. J., Brawn, L. C., Hume, P. J., Humphreys, D. y Koronakis, V.** (2009). *Salmonella* takes control: effector-driven manipulation of the host. *Curr Opin Microbiol* **12**, 117-124.

- McQuiston, J. R., Parrenas, R., Ortiz-Rivera, M., Gheesling, L., Brenner, F. y Fields, P. I.** (2004). Sequencing and comparative analysis of flagellin genes *fliC*, *fljB*, and *flpA* from *Salmonella*. *J Clin Microbiol* **42**, 1923-1932.
- Meresse, S., Unsworth, K. E., Habermann, A., Griffiths, G., Fang, F., Martinez-Lorenzo, M. J., Waterman, S. R., Gorvel, J. P. y Holden, D. W.** (2001). Remodelling of the actin cytoskeleton is essential for replication of intravacuolar *Salmonella*. *Cell Microbiol* **3**, 567-577.
- Meunier, L., Usherwood, Y. K., Chung, K. T. y Hendershot, L. M.** (2002). A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell* **13**, 4456-4469.
- Miao, E. A., Brittnacher, M., Haraga, A., Jeng, R. L., Welch, M. D. y Miller, S. I.** (2003). *Salmonella* effectors translocated across the vacuolar membrane interact with the actin cytoskeleton. *Mol Microbiol* **48**, 401-415.
- Miao, E. A. y Miller, S. I.** (2000). A conserved amino acid sequence directing intracellular type III secretion by *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 7539-7544.
- Miao, E. A., Scherer, C. A., Tsolis, R. M., Kingsley, R. A., Adams, L. G., Baumler, A. J. y Miller, S. I.** (1999). *Salmonella typhimurium* leucine-rich repeat proteins are targeted to the SPI1 and SPI2 type III secretion systems. *Mol Microbiol* **34**, 850-864.
- Mickael, C. S., Lam, P. K., Berberov, E. M., Allan, B., Potter, A. A. y Koster, W.** (2010). *Salmonella enterica* serovar Enteritidis *tatB* and *tatC* Mutants are Impaired in Caco-2 Cell Invasion in-vitro and Show Reduced Systemic Spread in Chickens. *Infect Immun*.
- Mills, D. M., Bajaj, V. y Lee, C. A.** (1995). A 40 kb chromosomal fragment encoding *Salmonella typhimurium* invasion genes is absent from the corresponding region of the *Escherichia coli* K-12 chromosome. *Mol Microbiol* **15**, 749-759.
- Monack, D. M., Detweiler, C. S. y Falkow, S.** (2001). *Salmonella* pathogenicity island 2-dependent macrophage death is mediated in part by the host cysteine protease caspase-1. *Cell Microbiol* **3**, 825-837.
- Monack, D. M., Raupach, B., Hromockyj, A. E. y Falkow, S.** (1996). *Salmonella typhimurium* invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9833-9838.
- Moraes, T. F., Spreter, T. y Strynadka, N. C.** (2008). Piecing together the type III injectisome of bacterial pathogens. *Curr Opin Struct Biol* **18**, 258-266.
- Morgan, E., Bowen, A. J., Carnell, S. C., Wallis, T. S. y Stevens, M. P.** (2007). SiiE is secreted by the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium pathogenicity island 4-encoded secretion system and contributes to intestinal colonization in cattle. *Infect Immun* **75**, 1524-1533.
- Morpeth, S. C., Ramadhani, H. O. y Crump, J. A.** (2009). Invasive non-Typhi *Salmonella* disease in Africa. *Clin Infect Dis* **49**, 606-611.
- Mukherjee, K., Parashuraman, S., Raje, M. y Mukhopadhyay, A.** (2001). SopE acts as an Rab5-specific nucleotide exchange factor and recruits non-prenylated Rab5 on *Salmonella*-containing phagosomes to promote fusion with early endosomes. *J Biol Chem* **276**, 23607-23615.

- Muller, S. A., Pozidis, C., Stone, R., Meesters, C., Chami, M., Engel, A., Economou, A. y Stahlberg, H.** (2006). Double hexameric ring assembly of the type III protein translocase ATPase HrcN. *Mol Microbiol* **61**, 119-125.
- Murli, S., Watson, R. O. y Galan, J. E.** (2001). Role of tyrosine kinases and the tyrosine phosphatase SptP in the interaction of *Salmonella* with host cells. *Cell Microbiol* **3**, 795-810.
- Nagai, H., Kagan, J. C., Zhu, X., Kahn, R. A. y Roy, C. R.** (2002). A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on *Legionella* phagosomes. *Science* **295**, 679-682.
- Nakanishi, K., Kamiguchi, K., Torigoe, T., Nabeta, C., Hirohashi, Y., Asanuma, H., Tobioka, H., Koge, N., Harada, O., Tamura, Y. et al.** (2004). Localization and function in endoplasmic reticulum stress tolerance of ERdj3, a new member of Hsp40 family protein. *Cell Stress Chaperones* **9**, 253-264.
- Natale, P., Bruser, T. y Driessen, A. J.** (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms. *Biochim Biophys Acta* **1778**, 1735-1756.
- Nikolaus, T., Deiwick, J., Rappl, C., Freeman, J. A., Schroder, W., Miller, S. I. y Hensel, M.** (2001). SseBCD proteins are secreted by the type III secretion system of *Salmonella* pathogenicity island 2 and function as a translocon. *J Bacteriol* **183**, 6036-6045.
- Nishiyama, A., Matsui, M., Iwata, S., Hirota, K., Masutani, H., Nakamura, H., Takagi, Y., Sono, H., Gon, Y. y Yodoi, J.** (1999). Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J Biol Chem* **274**, 21645-21650.
- Nonn, L., Williams, R. R., Erickson, R. P. y Powis, G.** (2003). The absence of mitochondrial thioredoxin 2 causes massive apoptosis, exencephaly, and early embryonic lethality in homozygous mice. *Mol Cell Biol* **23**, 916-922.
- Nordberg, J. y Arner, E. S.** (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* **31**, 1287-1312.
- Oberley, T. D., Schultz, J. L., Li, N. y Oberley, L. W.** (1995). Antioxidant enzyme levels as a function of growth state in cell culture. *Free Radic Biol Med* **19**, 53-65.
- Ochman, H., Soncini, F. C., Solomon, F. y Groisman, E. A.** (1996). Identification of a pathogenicity island required for *Salmonella* survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7800-7804.
- Ohl, M. E. y Miller, S. I.** (2001). *Salmonella*: a model for bacterial pathogenesis. *Annu Rev Med* **52**, 259-274.
- Ohlson, M. B., Fluhr, K., Birmingham, C. L., Brumell, J. H. y Miller, S. I.** (2005). SseJ deacylase activity by *Salmonella enterica* serovar Typhimurium promotes virulence in mice. *Infect Immun* **73**, 6249-6259.
- Ohtsuka, K. y Hata, M.** (2000). Mammalian HSP40/DNAJ homologs: cloning of novel cDNAs and a proposal for their classification and nomenclature. *Cell Stress Chaperones* **5**, 98-112.
- Paesold, G., Guiney, D. G., Eckmann, L. y Kagnoff, M. F.** (2002). Genes in the *Salmonella* pathogenicity island 2 and the *Salmonella* virulence plasmid are essential for *Salmonella*-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* **4**, 771-781.

- Palmer, T., Sargent, F. y Berks, B. C.** (2005). Export of complex cofactor-containing proteins by the bacterial Tat pathway. *Trends Microbiol* **13**, 175-180.
- Parsons, D. A. y Heffron, F.** (2005). sciS, an icmF homolog in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, limits intracellular replication and decreases virulence. *Infect Immun* **73**, 4338-4345.
- Parsot, C., Hamiaux, C. y Page, A. L.** (2003). The various and varying roles of specific chaperones in type III secretion systems. *Curr Opin Microbiol* **6**, 7-14.
- Patel, J. C. y Galan, J. E.** (2005). Manipulation of the host actin cytoskeleton by *Salmonella*--all in the name of entry. *Curr Opin Microbiol* **8**, 10-15.
- Patel, J. C. y Galan, J. E.** (2006). Differential activation and function of Rho GTPases during *Salmonella*-host cell interactions. *J Cell Biol* **175**, 453-463.
- Peabody, C. R., Chung, Y. J., Yen, M. R., Vidal-Ingigliardi, D., Pugsley, A. P. y Saier, M. H., Jr.** (2003). Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella. *Microbiology* **149**, 3051-3072.
- Pekkari, K., Goodarzi, M. T., Scheynius, A., Holmgren, A. y Avila-Carino, J.** (2005). Truncated thioredoxin (Trx80) induces differentiation of human CD14+ monocytes into a novel cell type (TAMs) via activation of the MAP kinases p38, ERK, and JNK. *Blood* **105**, 1598-1605.
- Penheiter, K. L., Mathur, N., Giles, D., Fahlen, T. y Jones, B. D.** (1997). Non-invasive *Salmonella typhimurium* mutants are avirulent because of an inability to enter and destroy M cells of ileal Peyer's patches. *Mol Microbiol* **24**, 697-709.
- Philpott, D. J., Girardin, S. E. y Sansonetti, P. J.** (2001). Innate immune responses of epithelial cells following infection with bacterial pathogens. *Curr Opin Immunol* **13**, 410-416.
- Pickart, C. M.** (2000). Ubiquitin in chains. *Trends Biochem Sci* **25**, 544-548.
- Pickart, C. M.** (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu Rev Biochem* **70**, 503-533.
- Poh, J., Odendall, C., Spanos, A., Boyle, C., Liu, M., Freemont, P. y Holden, D. W.** (2008). SteC is a *Salmonella* kinase required for SPI-2-dependent F-actin remodelling. *Cell Microbiol* **10**, 20-30.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. y Meyer, T. F.** (1987). Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**, 458-462.
- Powis, G. y Montfort, W. R.** (2001). Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**, 261-295.
- Pukatzki, S., McAuley, S. B. y Miyata, S. T.** (2009). The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains. *Curr Opin Microbiol* **12**, 11-17.
- Quezada, C. M., Hicks, S. W., Galan, J. E. y Stebbins, C. E.** (2009). A family of *Salmonella* virulence factors functions as a distinct class of autoregulated E3 ubiquitin ligases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 4864-4869.
- Raffatellu, M., Wilson, R. P., Chessa, D., Andrews-Polymenis, H., Tran, Q. T., Lawhon, S., Khare, S., Adams, L. G. y Baumler, A. J.** (2005). SipA, SopA, SopB, SopD, and SopE2 contribute to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium invasion of epithelial cells. *Infect Immun* **73**, 146-154.

- Ramsden, A. E., Mota, L. J., Munter, S., Shorte, S. L. y Holden, D. W.** (2007). The SPI-2 type III secretion system restricts motility of *Salmonella*-containing vacuoles. *Cell Microbiol* **9**, 2517-2529.
- Reed, L. J. y Muench, H.** (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hygiene* **27**, 493-497.
- Rego, A. T., Chandran, V. y Waksman, G.** (2010). Two-step and one-step secretion mechanisms in Gram-negative bacteria: contrasting the type IV secretion system and the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Biochem J* **425**, 475-488.
- Ren, X., Bjornstedt, M., Shen, B., Ericson, M. L. y Holmgren, A.** (1993). Mutagenesis of structural half-cystine residues in human thioredoxin and effects on the regulation of activity by selenodiglutathione. *Biochemistry* **32**, 9701-9708.
- Rohde, J. R., Breitkreutz, A., Chenal, A., Sansonetti, P. J. y Parsot, C.** (2007). Type III secretion effectors of the IpaH family are E3 ubiquitin ligases. *Cell Host Microbe* **1**, 77-83.
- Rosselin, M., Virlogeux-Payant, I., Roy, C., Bottreau, E., Sizaret, P. Y., Mijouin, L., Germon, P., Caron, E., Velge, P. y Wiedemann, A.** (2010). Rck of *Salmonella enterica*, subspecies enterica serovar Enteritidis, mediates Zipper-like internalization. *Cell Res* **20**, 647-664.
- Rossier, O., Starckenburg, S. R. y Cianciotto, N. P.** (2004). *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires' disease pneumonia. *Infect Immun* **72**, 310-321.
- Rotger, R. y Casadesus, J.** (1999). The virulence plasmids of *Salmonella*. *Int Microbiol* **2**, 177-184.
- Ruiz-Albert, J., Yu, X. J., Beuzon, C. R., Blakey, A. N., Galyov, E. E. y Holden, D. W.** (2002). Complementary activities of SseJ and SifA regulate dynamics of the *Salmonella typhimurium* vacuolar membrane. *Mol Microbiol* **44**, 645-661.
- Rusch, S. L. y Kendall, D. A.** (2007). Oligomeric states of the SecA and SecYEG core components of the bacterial Sec translocon. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 5-12.
- Saier, M. H., Jr.** (2006). Protein secretion and membrane insertion systems in gram-negative bacteria. *J Membr Biol* **214**, 75-90.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K. y Ichijo, H.** (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *Embo J* **17**, 2596-2606.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis.** (1989). Molecular cloning.
- Sanderson, K. E., Hessel, A. y Rudd, K. E.** (1995). Genetic map of *Salmonella typhimurium*, edition VIII. *Microbiol Rev* **59**, 241-303.
- Sandkvist, M.** (2001). Type II secretion and pathogenesis. *Infect Immun* **69**, 3523-3535.
- Schlumberger, M. C., Friebel, A., Buchwald, G., Scheffzek, K., Wittinghofer, A. y Hardt, W. D.** (2003). Amino acids of the bacterial toxin SopE involved in G nucleotide exchange on Cdc42. *J Biol Chem* **278**, 27149-27159.
- Schraidt, O., Lefebvre, M. D., Brunner, M. J., Schmied, W. H., Schmidt, A., Radics, J., Mechtler, K., Galan, J. E. y Marlovits, T. C.** (2010). Topology and

organization of the *Salmonella typhimurium* type III secretion needle complex components. *PLoS Pathog* **6**, e1000824.

Segal, G., Feldman, M. y Zusman, T. (2005). The Icm/Dot type-IV secretion systems of *Legionella pneumophila* and *Coxiella burnetii*. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 65-81.

Segura, I., Casadesus, J. y Ramos-Morales, F. (2004). Use of mixed infections to study cell invasion and intracellular proliferation of *Salmonella enterica* in eukaryotic cell cultures. *J Microbiol Methods* **56**, 83-91.

Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C. y Abe, A. (2001). Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11638-11643.

Shea, J. E., Hensel, M., Gleeson, C. y Holden, D. W. (1996). Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2593-2597.

Shen, Y. y Hendershot, L. M. (2005). ERdj3, a stress-inducible endoplasmic reticulum DnaJ homologue, serves as a cofactor for BiP's interactions with unfolded substrates. *Mol Biol Cell* **16**, 40-50.

Sherman, F., Fink, G. R. y Hicks, J. B. (1986). Methods in yeast genetics. Nueva York.

Shotland, Y., Kramer, H. y Groisman, E. A. (2003). The *Salmonella* SpiC protein targets the mammalian Hook3 protein function to alter cellular trafficking. *Mol Microbiol* **49**, 1565-1576.

Singer, A. U., Rohde, J. R., Lam, R., Skarina, T., Kagan, O., Dileo, R., Chirgadze, N. Y., Cuff, M. E., Joachimiak, A., Tyers, M. et al. (2008). Structure of the *Shigella* T3SS effector IpaH defines a new class of E3 ubiquitin ligases. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 1293-1301.

Spielberger, J. C., Moody, A. D. y Watson, W. H. (2008). Oxidation and nuclear localization of thioredoxin-1 in sparse cell cultures. *J Cell Biochem* **104**, 1879-1889.

Spreter, T., Yip, C. K., Sanowar, S., Andre, I., Kimbrough, T. G., Vuckovic, M., Pfuetzner, R. A., Deng, W., Yu, A. C., Finlay, B. B. et al. (2009). A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 468-476.

Stavrinides, J., McCann, H. C. y Guttman, D. S. (2008). Host-pathogen interplay and the evolution of bacterial effectors. *Cell Microbiol* **10**, 285-292.

Stebbins, C. E. y Galan, J. E. (2000). Modulation of host signaling by a bacterial mimic: structure of the *Salmonella* effector SptP bound to Rac1. *Mol Cell* **6**, 1449-1460.

Steele-Mortimer, O. (2008). The *Salmonella*-containing vacuole: moving with the times. *Curr Opin Microbiol* **11**, 38-45.

Steele-Mortimer, O., Brumell, J. H., Knodler, L. A., Meresse, S., Lopez, A. y Finlay, B. B. (2002). The invasion-associated type III secretion system of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium is necessary for intracellular proliferation and vacuole biogenesis in epithelial cells. *Cell Microbiol* **4**, 43-54.

- Stein, M. A., Leung, K. Y., Zwick, M., Garcia-del Portillo, F. y Finlay, B. B.** (1996). Identification of a *Salmonella* virulence gene required for formation of filamentous structures containing lysosomal membrane glycoproteins within epithelial cells. *Mol Microbiol* **20**, 151-164.
- Tampakaki, A. P., Fadouloglou, V. E., Gazi, A. D., Panopoulos, N. J. y Kokkinidis, M.** (2004). Conserved features of type III secretion. *Cell Microbiol* **6**, 805-816.
- Taylor, R. K., Miller, V. L., Furlong, D. B. y Mekalanos, J. J.** (1987). Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 2833-2837.
- Thanabalu, T., Koronakis, E., Hughes, C. y Koronakis, V.** (1998). Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from *E.coli*: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *EMBO J* **17**, 6487-6496.
- Tierrez, A. y Garcia-del Portillo, F.** (2005). New concepts in *Salmonella* virulence: the importance of reducing the intracellular growth rate in the host. *Cell Microbiol* **7**, 901-909.
- Tindall, B. J., Grimont, P. A., Garrity, G. M. y Euzéby, J. P.** (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 521-524.
- Tobar, J. A., Carreno, L. J., Bueno, S. M., Gonzalez, P. A., Mora, J. E., Quezada, S. A. y Kalergis, A. M.** (2006). Virulent *Salmonella enterica* serovar Typhimurium evades adaptive immunity by preventing dendritic cells from activating T cells. *Infect Immun* **74**, 6438-6448.
- Tobiame, K., Inage, T., Takeda, K., Enomoto, S., Miyazono, K. y Ichijo, H.** (1997). Molecular cloning and characterization of the mouse apoptosis signal-regulating kinase 1. *Biochem Biophys Res Commun* **239**, 905-910.
- Tseng, T. T., Tyler, B. M. y Setubal, J. C.** (2009). Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol* **9 Suppl 1**, S2.
- Tsolis, R. M., Townsend, S. M., Miao, E. A., Miller, S. I., Ficht, T. A., Adams, L. G. y Baumler, A. J.** (1999). Identification of a putative *Salmonella enterica* serotype Typhimurium host range factor with homology to IpaH and YopM by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun* **67**, 6385-6393.
- Uchiya, K., Barbieri, M. A., Funato, K., Shah, A. H., Stahl, P. D. y Groisman, E. A.** (1999). A *Salmonella* virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J* **18**, 3924-3933.
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S. y Bossi, L.** (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 15264-15269.
- van der Velden, A. W., Velasquez, M. y Starnbach, M. N.** (2003). *Salmonella* rapidly kill dendritic cells via a caspase-1-dependent mechanism. *J Immunol* **171**, 6742-6749.
- Vogel, J. P. y Isberg, R. R.** (1999). Cell biology of *Legionella pneumophila*. *Curr Opin Microbiol* **2**, 30-34.
- Wall, D. M., Nadeau, W. J., Pazos, M. A., Shi, H. N., Galyov, E. E. y McCormick, B. A.** (2007). Identification of the *Salmonella enterica* serotype Typhimurium SipA

domain responsible for inducing neutrophil recruitment across the intestinal epithelium. *Cell Microbiol* **9**, 2299-2313.

Wallis, T. S. y Galyov, E. E. (2000). Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microbiol* **36**, 997-1005.

Wasylnka, J. A., Bakowski, M. A., Szeto, J., Ohlson, M. B., Trimble, W. S., Miller, S. I. y Brumell, J. H. (2008). Role for myosin II in regulating positioning of *Salmonella*-containing vacuoles and intracellular replication. *Infect Immun* **76**, 2722-2735.

Waterman, S. R. y Holden, D. W. (2003). Functions and effectors of the *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system. *Cell Microbiol* **5**, 501-511.

Watson, W. H., Pohl, J., Montfort, W. R., Stuchlik, O., Reed, M. S., Powis, G. y Jones, D. P. (2003). Redox potential of human thioredoxin 1 and identification of a second dithiol/disulfide motif. *J Biol Chem* **278**, 33408-33415.

Weichsel, A., Gasdaska, J. R., Powis, G. y Montfort, W. R. (1996). Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer. *Structure* **4**, 735-751.

Wilharm, G., Dittmann, S., Schmid, A. y Heesemann, J. (2007). On the role of specific chaperones, the specific ATPase, and the proton motive force in type III secretion. *Int J Med Microbiol* **297**, 27-36.

Winnen, B., Schlumberger, M. C., Sturm, A., Schupbach, K., Siebenmann, S., Jenny, P. y Hardt, W. D. (2008). Hierarchical effector protein transport by the *Salmonella Typhimurium* SPI-1 type III secretion system. *PLoS One* **3**, e2178.

Yahr, T. L. y Wickner, W. T. (2000). Evaluating the oligomeric state of SecYEG in preprotein translocase. *EMBO J* **19**, 4393-4401.

Yamauchi, N., Kuriyama, H., Watanabe, N., Neda, H., Maeda, M. y Niitsu, Y. (1989). Intracellular hydroxyl radical production induced by recombinant human tumor necrosis factor and its implication in the killing of tumor cells in vitro. *Cancer Res* **49**, 1671-1675.

Ye, Z., Petrof, E. O., Boone, D., Claud, E. C. y Sun, J. (2007). *Salmonella* effector AvrA regulation of colonic epithelial cell inflammation by deubiquitination. *Am J Pathol* **171**, 882-892.

Yip, C. K., Kimbrough, T. G., Felise, H. B., Vuckovic, M., Thomas, N. A., Pfuetzner, R. A., Frey, E. A., Finlay, B. B., Miller, S. I. y Strynadka, N. C. (2005). Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature* **435**, 702-707.

Yu, M. y Haslam, D. B. (2005). Shiga toxin is transported from the endoplasmic reticulum following interaction with the luminal chaperone HEDJ/ERdj3. *Infect Immun* **73**, 2524-2532.

Yu, M., Haslam, R. H. y Haslam, D. B. (2000). HEDJ, an Hsp40 co-chaperone localized to the endoplasmic reticulum of human cells. *J Biol Chem* **275**, 24984-24992.

Yu, X. J., Liu, M. y Holden, D. W. (2004). SsaM and SpiC interact and regulate secretion of *Salmonella* pathogenicity island 2 type III secretion system effectors and translocators. *Mol Microbiol* **54**, 604-619.

Zhang, Y., Higashide, W., Dai, S., Sherman, D. M. y Zhou, D. (2005). Recognition and ubiquitination of *Salmonella* type III effector SopA by a ubiquitin E3 ligase, HsRMA1. *J Biol Chem* **280**, 38682-38688.

Zhu, Y., Li, H., Hu, L., Wang, J., Zhou, Y., Pang, Z., Liu, L. y Shao, F. (2008). Structure of a *Shigella* effector reveals a new class of ubiquitin ligases. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 1302-1308.

ANEXO

Relación de artículos publicados