



Butanda Ochoa A, Guevara Flores A, Guevara Fonseca J, Matuz Mares D, Lara Lemus R, Torres Durán PV. **Mensaje Bioquímico**, Vol. XLI, 65-84, Depto de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. Universitaria, México, D.F, MÉXICO. (2014). (<http://bq.unam.mx/comitetab/TAB2014>)

(ISSN-0188-137X)

EL INYECTISOMA DE BACTERIAS PATÓGENAS: DOS HISTORIAS DE UN DISPOSITIVO MOLECULAR

THE INJECTISOME OF PATHOGEN BACTERIA: TWO STORIES OF A MOLECULAR DISPOSITIVE

José Eduardo Soto Guzmán y Bertha González Pedrajo

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Apartado Postal 70-243, México, D.F. 04510 México. Teléfono: (5255) 5622-5965. Fax: (5255) 5622-5611

Dirección de correspondencia: Bertha González-Pedrajo, bpedrajo@ifc.unam.mx

Resumen

El sistema de secreción tipo III (SST3) o inyectisoma es un complejo multiproteico utilizado por bacterias Gram negativas para inyectar proteínas directamente al citoplasma de células eucariontes con el objeto de manipular procesos celulares en beneficio de la bacteria.

El estudio de los SST3 bacterianos ha sido de gran interés, ya que estos dispositivos moleculares son elementos clave tanto en la virulencia de bacterias patógenas, como en el establecimiento de relaciones simbióticas de muchas

bacterias con organismos eucariontes. De manera paralela, en años recientes, ha habido un interés creciente por explotar este sistema de secreción con fines biotecnológicos.

En la presente revisión se hace una reseña de la importancia que tienen los SST3 en la patogénesis microbiana, así como de las futuras aplicaciones que se vislumbran para esta nanomáquina en el campo de la medicina y la biotecnología.

Palabras clave: Inyectisoma, bacteria, secreción, patogénesis, nanomáquina.

Abstract

The type III secretion system (T3SS) or injectisome is a multi-protein complex used by Gram-negative bacteria to inject proteins directly into the cytoplasm of eukaryotic cells in order to manipulate normal cellular processes to the benefit of the bacterium.

The study of bacterial T3SS has been of great interest because these molecular devices are key elements underlying microbial pathogenesis and symbiotic relationships between bacteria and eukaryotic organisms. In addition, in recent years, there has been a growing interest to exploit this secretion system for biotechnological purposes.

In the present review, we discuss the importance of the T3SS for microbial pathogenesis as well as the potential future applications of this nano-machine in the medicine and biotechnology fields.

Keywords: Injectisome, bacteria, secretion, pathogenesis, nano-machine.

Introducción a los SST3

Cien años atrás, las infecciones bacterianas eran la principal causa de mortandad en países industrializados. Décadas después, en la era dorada de los antibióticos, se pensó que las infecciones bacterianas no eran más una amenaza a la salud pública por lo que los esfuerzos en investigación clínica se dirigieron a enfermedades no transmisibles. Sin embargo, según cifras de la Organización

Mundial de Salud, las enfermedades infecciosas actualmente son la segunda causa de muerte, sólo detrás de las enfermedades cardiovasculares [1].

En bacterias, la secreción de proteínas es particularmente importante para la manipulación y explotación de ciertos nichos ecológicos. Muchas bacterias Gram negativas utilizan el sistema de secreción tipo III (SST3) o inyectisoma para secretar proteínas que les permiten colonizar a hospederos eucariontes. Por esto el inyectisoma es un elemento crucial en las estrategias de patogenicidad y simbiosis de una gran variedad de bacterias.

El SST3 es una compleja nano-estructura multi-proteica que funciona como una jeringa molecular, la cual permite translocar proteínas desde el citoplasma bacteriano directamente al interior de células eucariontes hospederas. Las proteínas que se translocan, a las que se les denomina efectores, despliegan un amplio arsenal de actividades bioquímicas dentro del citoplasma de la célula eucarionte con el objeto de modular las funciones biológicas normales del hospedero en beneficio de la bacteria [2]. Entre las enfermedades causadas por patógenos bacterianos a través del inyectisoma se encuentran la peste bubónica (Cuadro I), fiebre tifoidea, disentería, infecciones hospitalarias secundarias como neumonía y enfermedades de transmisión sexual, entre otras [3] (Tabla I).

Los genes que codifican para los SST3 comúnmente se encuentran agrupados en el cromosoma bacteriano como islas genómicas (cuando las islas codifican para genes que contribuyen a la virulencia se les llama islas de patogenicidad). Excepciones representativas a esto las encontramos en el inyectisoma de *Yersinia* spp. el cual se encuentra codificado en el plásmido pYV o el SST3 de *Chlamydia*, cuyos genes codificantes se encuentran diseminados en al menos 6 diferentes loci cromosomales [4].

Las bacterias típicamente adquieren las islas de patogenicidad que codifican para el SST3 mediante transferencia horizontal [5]. Un reflejo de esto es el contenido anómalo de G+C de estos genes respecto al del promedio del genoma bacteriano hospedero, así como la inserción de las islas dentro de genes que codifican para tRNAs redundantes o no esenciales [6].

Los SST3 de virulencia y el sistema de secreción flagelar bacteriano se encuentran relacionados evolutivamente [5]. Estos dos organelos comparten alrededor de 8 a 10 proteínas cuya secuencia y/o estructura se encuentran conservadas [7,8]. Estas proteínas homólogas están localizadas en la membrana interna bacteriana o se encuentran asociadas a ésta y conforman el núcleo del aparato de exportación. Datos recientes obtenidos por genómica comparativa

sugieren que los SST3 de virulencia surgieron a partir de un sistema flagelar ancestral mediante un proceso de exaptación (reclutamiento de componentes del aparato flagelar para llevar a cabo una nueva función de secreción) [9].

Cuadro I. La peste negra o cómo influyó el SST3 en la historia de Europa

La peste negra ha sido una de las pandemias más devastadoras en la historia de la humanidad, causando la muerte de más de un tercio de la población de Europa entre los años 1348 y 1350. Aunque existen diferentes teorías acerca del agente etiológico de la peste negra, análisis de DNA antiguo de víctimas del norte y sur de Europa indican que el patógeno bacteriano *Yersinia pestis* fue el responsable de esta epidemia [10,11]. La plaga trajo como consecuencia profundos cambios sociales, económicos, artísticos y hasta religiosos [12].



El efecto de la peste negra sobre la vida europea medieval fue tal que influenció de manera importante el trabajo artístico de la época. La imagen aquí mostrada del cuadro con tono apocalíptico de Pieter Brueghel, “El triunfo de la muerte”, se interpreta como una visión alegórica a las epidemias de ese entonces.

La plaga se transmite por la picadura de pulgas procedentes de ratas. Una vez dentro del torrente sanguíneo, *Yersinia pestis* es capturada por los macrófagos ganglionares, prolifera en los ganglios linfáticos y estos se hinchan formando un bubo (esto ocurre especialmente en la ingle, de ahí el nombre de peste bubónica pues “*boubon*” quiere decir “ingle” en griego).

Aunque existen otros factores de virulencia que contribuyen a la capacidad invasiva de *Y. pestis*, el tropismo por el tejido linfático y la capacidad de resistir a

la respuesta inmune primaria del organismo infectado se da esencialmente gracias al SST3 [13,14] del cual se habla en el texto principal.

Tabla I. Rol ecológico de algunos SST3 bacterianos

Bacteria	Hospedero	Relación con el hospedero	Efecto de la interacción	Efectores participantes*
<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	Humano	Patógeno	Diarrea acuosa y persistente, cólicos	Tir, Map, EspF/G/H/Z, NleA/B1/B2/C/D/H1/H2
<i>Shigella flexneri</i>	Humano	Patógeno	Disentería bacilar, diarrea, vómito	IpaA/B/C, IpgB1/2/D, VirA, OspF/G
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	Humano, vaca, cerdo	Patógeno	Fiebre entérica, enterocolitis/diarrea, bacteremia	SPI-1 [®] : AvrA, SipA/C, SopA/B, SptP. SPI-2 [®] : SpiC, SopD/E, D2, E2, SifA
<i>Yersinia pestis</i>	Humano, vaca, roedores	Patógeno	Diarrea, enterocolitis, peste	YopE/H/J/M/T, YpkA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Humano	Patógeno oportunista	Neumonía, infecciones urinarias, infecciones post-operatorias en heridas y quemaduras	ExoS/T/U/Y
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Humano	Patógeno oportunista	Diarrea, otitis, endoftalmítis	VopA/C/E/F/L/T/V/X
<i>Chlamydia trachomatis</i>	Humano	Patógeno intracelular obligado	Infecciones oculares, genitales y pulmonares	CPAF, Tarp, CT621, CT622, CT694
<i>Aeromonas salmonicida</i>	Peces	Patógeno	Furunculosis	Ati2, AexT, AopH/O/P
<i>Edwardsiella tarda</i>	Peces	Patógeno	Edwardsiellosis (septicemia, hemorragias, nefritis, hepatitis)	EseG/H/I/J/K/L
<i>Xanthomonas campestris</i>	Plantas (pimiento, tomate)	Patógeno	Mancha bacteriana	XopC/D/E1/E2/J, AvrBs2/3
<i>Erwinia amylovora</i>	Plantas (manzano, peral, membrillo)	Patógeno	Fuego bacteriano (necrosis)	DspA/E, HrpA/N/W
<i>Bradyrhizobium elkanii</i>	Plantas (soya)	Simbionte	Necesario para la eficiente formación de nódulos fijadores de nitrógeno	NopL/M/P
<i>Sodalis glossinidius</i>	Insectos (mosca tse-tse)	Simbionte	Necesario para la exitosa invasión de las células hospederas de insecto	SG0576, SG0764

* Se incluye sólo un sub-conjunto representativo del total de los efectores secretados por las bacterias mencionadas.

& SPI-1: Isla de patogenicidad 1 de *Salmonella*; SPI-2: Isla de patogenicidad 2 de

Estructura y funcionamiento del SST3

La maquinaria del inyectisoma tiene una masa molecular aproximada de ~3.5 MDa y está conformada por alrededor de 20 proteínas distintas, muchas de ellas en estado oligomérico [15,16].

Por razones históricas, la nomenclatura que se utiliza para designar a las proteínas que conforman el inyectisoma en diferentes bacterias no se ha unificado (Tabla II). Sin embargo, para facilitar la comunicación, existe la propuesta de que los componentes de los nuevos sistemas de secreción identificados se nombren acorde con la nomenclatura existente para el inyectisoma de *Yersinia* [17].

Tabla II. Nomenclatura de los componentes del inyectisoma en distintas bacterias

	Función	<i>Yersinia</i>	EPEC	<i>Salmonella</i>	<i>Shigella</i>	<i>Pseudomonas</i>	<i>Chlamydia</i>	<i>Xanthomonas</i>	<i>Rhizobium</i>	Flagelo
Estructuras extracelulares	Tanslocón	YopB	EspD	SipB	IpaB	PopB	CopB2	HrpF	-	-
	Translocón	YopD	EspB	SipC	IpaC	PopD	-	-	-	-
	Punta de la aguja	LcrV	EspA	SipD	IpaD	PcrV	CT584	-	-	FliC*
	Aguja	YscF	EscF	PrgI	MxiH	PscF	CdsF	-	-	-
Cuerpo basal	Anillo de ME	YscC	EscC	InvG	MxiD	PscC	CdsC	HrpA1	RhcC1/RhcC2	-
	Anillo de MI	YscJ	EscJ	PrgK	MxiJ	PscJ	CdsJ	HrpB3	RhcJ	FliF
	Anillo de MI	YscD	EscD	PrgH	MxiG	PscD	CdsD	HrpD5	-	-
	Eje interno	YscI	EscI	PrgJ	MxiI	PscI	-	HrpB2	-	-
Aparato de exportación y componentes citosólicos	Aparato de exportación	YscR	EscR	SpaP	Spa24	PscR	CdsR	Orf2	RhcR	FliP
	Aparato de exportación	YscS	EscS	SpaQ	Spa9	PscS	CdsS	HrcS	RhcS	FliQ
	Aparato de exportación	YscT	EscT	SpaR	Spa29	PscT	CdsT	HrpB8	RhcT	FliR
	Aparato de exportación	YscU	EscU	SpaS	Spa40	PscU	CdsU	HrcC	RhcU	FliB
	Aparato de exportación	YscV	EscV	InvA	MxiA	PcrD	CdsV	HrpC2	RhcV	FliA
	Plataforma de clasificación (anillo C)	YscQ	EscQ	SpaO	Spa33	PscQ	CdsQ	HrcQ	RhcQ	FliM/FliN
	Plataforma de clasificación	YscK	EscK	OrgA	MxiK	PscK	CT560	HrpB4	-	FliG ¿?
	Tallo periférico (inhibidor de la ATPasa)	YscL	EscL	OrgB	MxiN	PscL	CdsL	HrpB5	RhcL	FliH
	ATPasa	YscN	EscN	InvC	Spa47	PscN	CdsN	HrpB6	RhcN	FliI
Tallo central (activador de la ATPasa y chaperona escolta)	YscO	EscO	InvI	Spa13	PscO	CdsO	-	-	FliJ	
Otro	Regla molecular	YscP	EscP	InvJ	Spa32	-	CT671	HpaC	-	FliK
	Regulador de la secreción	YopN	SepL	InvE	MxiC	-	CopN	-	-	-

ME: membrana externa, MI: membrana interna. Modificado de Chatterjee, 2013 [3], Abby, 2012 [9] y *Pallen [63]

En nuestro laboratorio utilizamos a la bacteria *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) como microorganismo modelo para el estudio del SST3. EPEC coloniza el epitelio intestinal humano, principalmente de niños menores de dos años de países en vías de desarrollo, produciendo una lesión histopatológica característica que da lugar a la enfermedad gastrointestinal [18]. En esta sección se usará el inyectisoma de EPEC como arquetipo para describir los componentes que conforman a los SST3 en general.

Morfológicamente es posible diferenciar tres estructuras que componen al SST3 (Fig. 1):

Estructuras extracelulares (aguja/translocón)

La aguja es un conducto extracelular elongado de una longitud, dependiendo de la especie bacteriana, de entre 45 y 80 nm; formado por la polimerización helicoidal de subunidades de la proteína EscF en el caso de EPEC, YscF en *Yersinia* o PrgI en el caso de *Salmonella*. En el interior de esta estructura existe un canal hueco de aproximadamente 2.5 nm de diámetro que permite el paso de los sustratos que serán secretados. Debido al diámetro interno de este conducto, es necesario que los sustratos viajen desplegados o parcialmente desplegados [19,20].

Una característica particular del inyectisoma de EPEC es la presencia de un filamento largo y flexible que se extiende desde la aguja (Fig. 1). Esta estructura tubular se forma por la polimerización de la proteína EspA, alcanzando una longitud de 75 a 260 nm, con un diámetro externo de 12 nm y un canal central con un diámetro de 2.5 nm [21]. Se piensa que esta peculiaridad del inyectisoma de EPEC se debe a que en el intestino esta bacteria se encuentra separada de su célula hospedera blanco -el enterocito- por una gruesa capa mucosa que recubre a estas células, por lo que la presencia del filamento EspA facilita el acceso a la membrana del enterocito [22].

El punto de contacto entre un inyectisoma y la célula hospedera está mediado por el translocón. Típicamente, el translocón es un complejo hetero-oligomérico constituido por una proteína hidrofílica (llamada punta, representada por EspA) que interacciona con la aguja, y dos proteínas hidrofóbicas (EspB y EspD) que forman un poro, el cual se inserta en la membrana plasmática de la célula eucarionte. De esta forma, el translocón forma un continuo con la aguja permitiendo así la translocación de sustratos [23].

Cuerpo basal

El cuerpo basal es una base cilíndrica, similar a la estructura basal del flagelo, compuesto por tres anillos embebidos en las membranas interna (MI) y externa (ME) (Fig. 1). En EPEC, el anillo embebido en la ME se encuentra formado por un estimado de 12 subunidades de la proteína EscC -la cual es un

miembro de la familia de las secretinas- [24,25]. En la MI se localizan dos anillos; uno formado por la lipoproteína periplásmica EscJ, la cual se piensa que se ancla a la MI como un anillo de 24 subunidades [26]. El otro anillo de MI se encuentra formado por la proteína EscD. Existe a su vez un eje interno periplásmico, formado por la proteína EscI, que une a los anillos de ambas membranas [27].

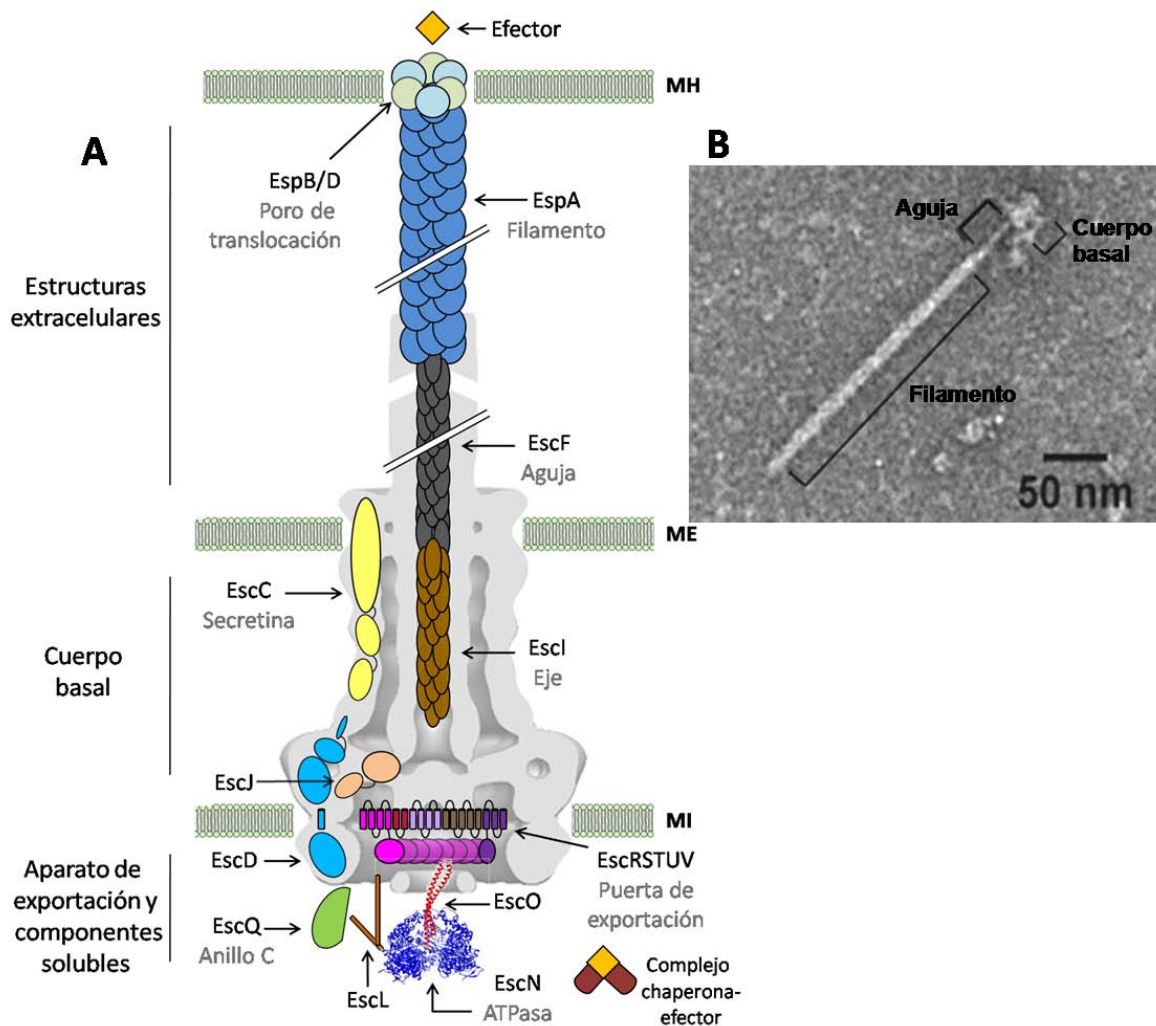


Figura 1. Estructura del SST3 de EPEC. (A) Esquema del inyectisoma de EPEC en donde se muestran las tres super-estructuras que lo componen. El esquema no se encuentra a escala y, por simplicidad, no se representan todos los cruces transmembrales para una mejor visualización de los componentes de la puerta de exportación. Membrana del hospedero eucariote (MH), membrana externa (ME) y membrana interna (MI). Modificado de Worrall, 2011 [28]. (B) Imagen de microscopía electrónica de transmisión de un inyectisoma purificado de EPEC. Tomado de Monjarás, 2012 [29].

Aparato de exportación y componentes solubles

En la base del SST3 se encuentra un conjunto de proteínas citoplásmicas y de proteínas intermembranales asociadas a la membrana interna, altamente conservadas entre los SST3 de diferentes patógenos bacterianos y que se conocen como el aparato de exportación. Se considera que el aparato de exportación es el encargado de reconocer los sustratos a secretarse [30], así como de hacer al SST3 competente para la secreción [31].

Este grupo de proteínas incluye a cinco componentes esenciales que forman la puerta de exportación (EscRSTUV) (Fig. 1). Se predice que la estructura de EscR, EscS y EscT se encuentra dominada por cruces transmembranales, mientras que EscU y EscV, además de las hélices transmembranales, tienen grandes dominios citoplásmicos [30].

Del lado citosólico del inyectisoma se encuentra la ATPasa EscN, componente esencial de los SST3. La ATPasa del inyectisoma está relacionada evolutivamente con la ATPasa flagelar (FliI) y con las subunidades α y β de la F₀F₁-ATP sintasa [9,32]. La ATPasa del SST3 de virulencia juega un rol crítico en el reconocimiento de los efectores que serán secretados.

La operación eficaz del inyectisoma requiere de la asistencia de una serie de proteínas pequeñas llamadas chaperonas las cuales se unen en el citoplasma a los sustratos específicos que serán secretados, estabilizándolos y manteniéndolos en una conformación parcialmente desplegada o competente para la secreción [33,34]. La ATPasa reconoce y disocia los complejos chaperona-sustrato de manera ATP dependiente para permitir el paso de estos últimos a través del complejo aguja [35].

La proteína EscL interacciona con la ATPasa EscN [36] y se ha mostrado que es un regulador negativo de la actividad de la ATPasa tal como su homólogo flagelar FliH [37]. Otro componente que interacciona con EscN y con EscL es la proteína EscO, que al igual que FliJ en el sistema flagelar, estimula la actividad catalítica de la ATPasa EscN (Romo M., datos no publicados). Las tres proteínas en conjunto forman lo que se conoce como el complejo ATPasa del SST3 de virulencia.

EscQ es otro componente citosólico esencial del inyectisoma de EPEC [36]. Aunque hace falta evidencia directa, se sugiere que EscQ forma una estructura anular en la base del inyectisoma equivalente al anillo C del flagelo (formado por las proteínas FliM y FliN). Adicionalmente, se ha visto por estudios genéticos que

su homólogo SpaO en el SST3 de *Salmonella* funge como una plataforma de clasificación para la secreción ordenada de sustratos [38].

Biogénesis del SST3 o como ensamblar una máquina de secreción molecular

El inyectisoma es una compleja máquina molecular que se autoensambla, lo cual requiere de una serie de pasos ordenados.

En *Yersinia enterocolitica* se ha estudiado recientemente la biogénesis del SST3 de virulencia [30,39,40], por lo que en este apartado se mencionarán los datos que se tienen a la fecha del ensamblaje de este inyectisoma. Sin embargo, existen reportes en inyectisomas de otros patógenos como EPEC [29,41] y *Salmonella* [31] en donde se encuentran paralelismos en el proceso de ensamblaje con el de *Yersinia* por lo que se piensa que la ruta de biosíntesis se encuentra conservada en los distintos SST3.

El ensamblaje inicial del inyectisoma comienza en las membranas bacterianas a través de dos ramas independientes (Fig. 2). Por un lado, la inserción en la membrana externa y oligomerización de la secretina YscC, sirve como punto de nucleación para el ensamblaje de los dos anillos de membrana interna constituidos por las proteínas YscD y YscJ. Por otro lado, en una ruta separada, los componentes de la puerta de exportación (YscRSTUV) se ensamblan en la membrana interna de manera autónoma. Cuando ambas plataformas convergen interaccionando el anillo de ME con el de MI, YscJ conecta a estas dos estructuras. En esta primera etapa, los componentes se exportan e insertan en la membrana mediante la vía general de secreción Sec.

Posteriormente se incorporan los componentes citoplásmicos (complejo ATPasa y anillo C) en la base del inyectisoma [39]. Cuando el complejo ATPasa se ha acoplado en la base de la puerta de exportación, la estructura basal del inyectisoma recién formada puede comenzar a secretar sustratos vía SST3. Entre las primeras proteínas que se secretan por esta vía se encuentran el eje (YscI) y la aguja (YscF), a las cuales se les denomina “sustratos tempranos” [42].

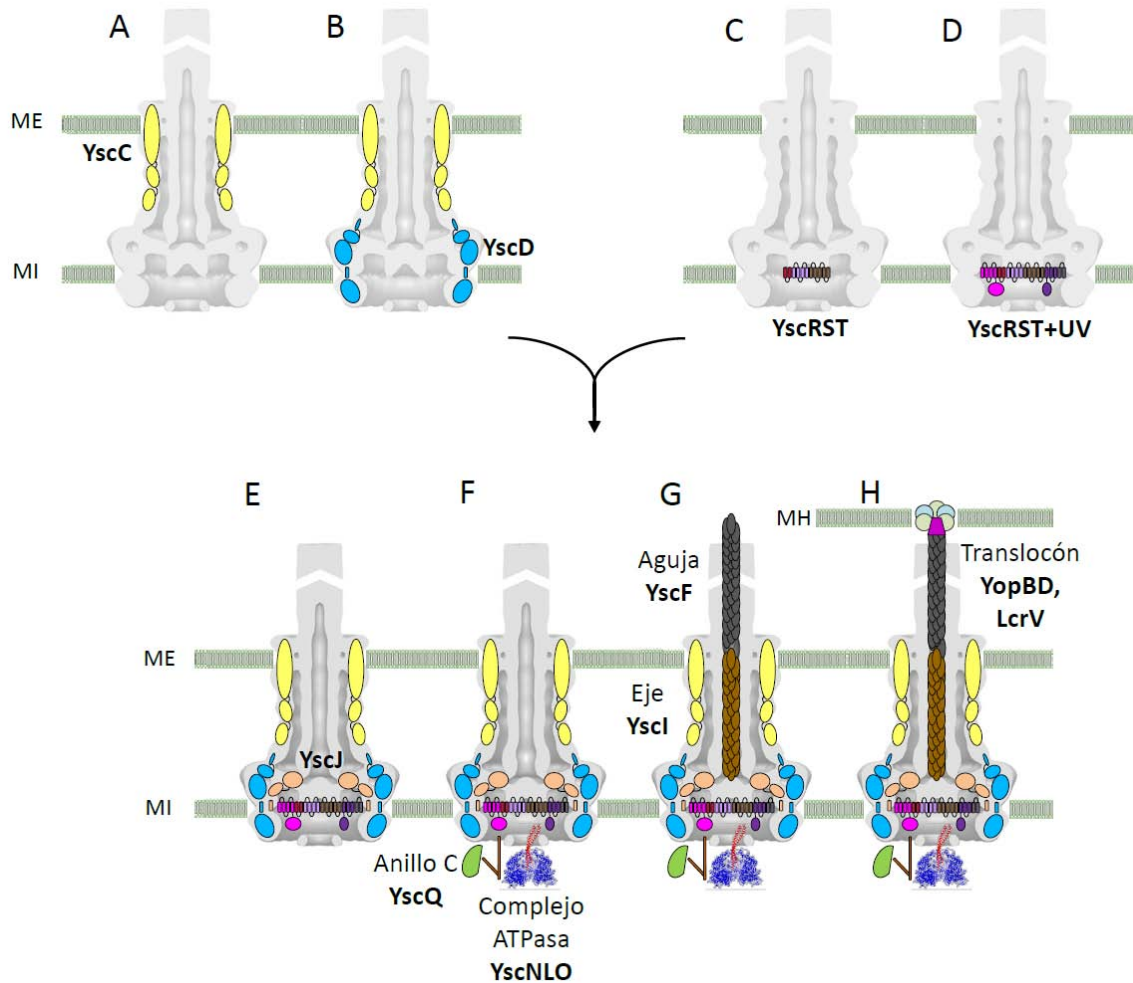


Figura 2. Modelo de ensamblaje del inyectisoma de *Yersinia*. **(A)** La rama de ensamblaje de la ME comienza con la formación del anillo oligomérico de la secretina YscC. **(B)** El anillo YscC sirve como punto de nucleación para la formación del anillo YscD. **(C)** Se incorporan en la MI las proteínas YscRST **(D)** Se promueve la oligomerización del anillo formado por YscV y la incorporación de YscU a la puerta de exportación. **(E)** Cuando ambas plataformas se encuentran en la membrana, el anillo YscJ une a las dos ramas. **(F)** El complejo ATPasa y el anillo C se ensamblan en la base del inyectisoma. **(G)** Se secretan los sustratos tempranos que forman el eje interno y la aguja. **(H)** Se ensambla el translocón que hace contacto con la célula hospedera para la translocación de los efectores.

Una vez que se secretan los sustratos tempranos, existe un cambio de especificidad de sustratos a nivel de la proteína YscU de la puerta de exportación. Esta proteína sufre un corte auto-proteolítico permitiendo el reconocimiento y la

salida de los sustratos intermedios o proteínas translocadoras que forman el poro de translocación [42,43].

Para que se lleve a cabo la translocación eficiente de efectores al interior de la célula eucarionte, se necesita la formación del poro de translocación. Por esta razón existe un complejo molecular (formado en *Yersinia* por las proteínas YopN-TyeA-YscB-SycN) que previene la secreción de efectores hasta que el poro de translocación se ha formado, es decir, hasta que la bacteria ha establecido contacto con la célula hospedera [44]. Una vez que se ha formado en la parte distal de la aguja el complejo translocón y éste ha hecho contacto con la célula hospedera, el proceso de secreción culmina con la translocación de efectores a la célula infectada [15,42].

La otra historia: Controlando al inyectisoma

El conocimiento acerca del inyectisoma bacteriano que se ha generado en los últimos años no sólo ha permitido entender los mecanismos de patogénesis de numerosos agentes infecciosos, sino que también ha posibilitado el manipular a merced este dispositivo, abriendo así las puertas para aplicaciones en el campo de la industria y la medicina.

Las proteínas destinadas a ser secretadas a través del SST3 poseen una señal discreta en la región amino terminal que las dirige hacia el complejo ATPasa de la maquinaria de secreción. Cuando esta secuencia se fusiona en el amino terminal de proteínas heterólogas, la secuencia de señalización puede dirigir a la proteína de fusión al inyectisoma para ser secretada [45]. Esta particularidad se ha aprovechado para reprogramar un dispositivo molecular existente, como lo es el inyectisoma, para secretar biomateriales de interés comercial como se describe a continuación.

Exportando seda de araña a través del inyectisoma de *Salmonella*

La sobreproducción de ciertas proteínas recombinantes en bacterias puede llevar a la formación de cuerpos de inclusión dentro de la célula, comprometiendo de ese modo el rendimiento en la purificación de la proteína recombinante. La exportación de proteínas al medio extracelular es una herramienta importante en bioingeniería, que evita que se formen cuerpos de inclusión. La secreción también es sumamente deseable cuando la función de la proteína recombinante de interés

requiere estar en el ambiente extracelular (celulasas, enzimas que degradan polímeros, etc.) [45].

De esta forma, empleando a *Salmonella* como chasis y a la isla de patogenicidad 1 (SPI-1) de este patógeno como herramienta biológica, Voigt *et al.* construyeron un sistema que contiene todos los componentes genéticos necesarios para la secreción de proteínas heterólogas al exterior de la bacteria [45]. Como prueba de concepto, usaron el sistema diseñado con el fin de exportar al medio una mezcla de tres monómeros (ADF-1, ADF-2 y ADF-3) que componen a un tipo sintético de fibra de seda de araña, a los que se les fusionó la secuencia de secreción del efector SptP de *Salmonella* en el N-terminal. Debido a que es sumamente fuerte y elástica, la seda de araña es un biomaterial con aplicaciones tecno-industriales. Sin embargo, la producción recombinante de proteínas de seda de araña se ha visto limitada a causa de la tendencia a formar agregados y fibras si se les confina dentro de la célula productora [45,46].

Las proteínas heterólogas se secretaron específicamente por el SST3 de *Salmonella*. Se consiguieron tasas de secreción de hasta $1.8 \text{ mg l}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y se demostró la secreción de hasta el 14% de la proteína recombinante producida.

Optimizando la purificación de neuropéptidos con el SST3

En la industria médica hay un interés creciente en la obtención de polipéptidos farmacológicamente activos debido a su utilidad como ligandos en aplicaciones terapéuticas. Una de estas biomoléculas son las conotoxinas, péptidos neurotóxicos aislados del caracol del género *Conus* que actúan sobre canales iónicos inhibiendo así vías asociadas al dolor. Por esta razón han mostrado ser un potente agente analgésico con mínimos efectos secundarios [47].

Este tipo de neuropéptidos tiende a formar agregados intermoleculares en el citoplasma cuando su nivel de expresión es alto, complicando la recuperación de los mismos en su forma activa [48]. Por esta razón, Hughes *et al.* explotaron el sistema de secreción tipo 3 flagelar para exportar selectivamente conotoxinas producidas de manera heteróloga en *Salmonella* entérica al medio extracelular, con el fin de evitar la acumulación intracelular del péptido producido y la subsecuente formación de cuerpos de inclusión [48].

Al igual que los efectores de virulencia, la especificidad para la secreción de sustratos flagelares está determinada principalmente por una señal peptídica de

estructura desordenada en el N-terminal y se requiere también la presencia de chaperonas específicas para facilitar la secreción [49]. En el trabajo mencionado, se fusionó la μ -conotoxina SIIIA (neuropéptido de 22 aminoácidos) con polihistidinas al carboxilo terminal del sustrato de secreción flagelar FlgM (proteína que actúa como regulador de la transcripción de genes flagelares al unirse e inhibir específicamente al factor sigma σ^{28} [50]. Para escindir al neuropéptido de la proteína FlgM se insertó un sitio de reconocimiento de la proteasa TEV.

Los resultados obtenidos mostraron que la conotoxina se secreta eficientemente al medio. Adicionalmente, la fusión recombinante se purificó mediante cromatografía de afinidad a níquel y se digirió con la proteasa TEV. Se probó la actividad biológica de la conotoxina recombinante secretada por *Salmonella* sobre ovocitos de *Xenopus* que expresan al canal de sodio de rata $Na_v1.2$, obteniendo que ésta resultó prácticamente igual a la del polipéptido sintetizado químicamente [48].

A diferencia de los métodos tradicionales de purificación de neuropéptidos, este sistema tiene la ventaja de que, al ser secretado el péptido recombinante al medio extracelular, no es necesario lisar a las células, es suficiente centrifugar el cultivo y filtrar el sobrenadante para purificar al neuropéptido acumulado en el medio.

El uso del inyectisoma como una nueva estrategia para la vacunación

Algunos patógenos intracelulares con inyectisoma como *Salmonella* tienen capacidad invasiva para acceder al citosol de células hospederas. Explotando esta característica, cepas atenuadas de este patógeno se han empleado como vectores para expresar y presentar antígenos heterólogos derivados de virus, bacterias u hongos parasíticos, a células presentadoras de antígenos (CPA) con el fin de provocar la producción de anticuerpos específicos [51].

La secreción de antígenos heterólogos a través del inyectisoma de cepas atenuadas de *Salmonella* ha mostrado ser una estrategia más eficaz que la sola expresión y presentación del antígeno heterólogo en la membrana bacteriana ya que, siendo secretado al citoplasma de las CPAs, el antígeno es capaz de estimular la respuesta de los linfocitos T citotóxicos de manera más efectiva [52,53]. Sin embargo, una desventaja importante de esta estrategia de vacunación es que el empleo de bacterias atenuadas restringe su uso en niños y en individuos

inmunocomprometidos debido al riesgo de virulencia residual en las cepas patógenas [54].

Para disponer de un vehículo seguro para la entrega de antígenos a CPAs, Galán *et al.* modificaron genéticamente a *Salmonella entérica* para producir minicélulas no replicativas que fungieran como chasis biológico para un inyectisoma activo [54]. Las minicélulas bacterianas son vesículas acromosomales, resultado de un mecanismo de división celular aberrante [55]. Las minicélulas contienen todos los componentes moleculares de la célula parental (RNA, complejos proteicos, plásmidos, etc.), por lo que pueden sintetizar proteínas y sostener un gradiente electroquímico (requisitos necesarios para el funcionamiento del inyectisoma), sin embargo no son agentes infecciosos.

En ese trabajo, las minicélulas se aislaron generando una mutante nula de *S. enterica* en el gen *minD* (cuyo producto se requiere para la adecuada división celular). Posteriormente se verificó mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, la presencia de componentes del SST3 de la SPI-1 en las preparaciones de mini-células purificadas. Asimismo mediante microscopía electrónica se corroboró la presencia de inyectisomas ensamblados en la superficie de las mini-células. Por último, para determinar si estos inyectisomas eran capaces de entregar antígenos heterólogos como lo hacen las cepas de *Salmonella* atenuadas, los primeros 104 aminoácidos del efector SopE, que contienen la señal para ser secretado vía SST3, se fusionaron al N-terminal del antígeno OVA. Las mini-células transformadas con una construcción que expresa al antígeno quimérico se incubaron con células murinas de la línea RMA. Los inyectisomas de estas mini-células fueron totalmente funcionales ya que lograron translocar el antígeno quimérico al interior de las células murinas [54].

Conclusión

El sistema de secreción tipo III bacteriano ha sido objeto de intenso estudio en los últimos años. Esto nos ha permitido entender la relación huésped bacteriano – hospedero eucarionte a nivel molecular.

El conocer los procesos generales de especificidad, reconocimiento y translocación de sustratos vía SST3 nos permite manipular dicha maquinaria molecular para la secreción y/o translocación a células eucariontes de diversas proteínas. También, el entendimiento de este sistema ha sido empleado para desarrollar nuevos compuestos que inhiben el SST3 desarmando específicamente

a las bacterias que hacen uso de esta maquinaria [56-60]. Los factores de virulencia -como el SST3- son blancos terapéuticos atractivos, ya que los inhibidores de estos podrían abatir la patogenicidad sin causar la muerte de la bacteria, evitando así ejercer una presión selectiva para el desarrollo de resistencias a estos nuevos compuestos. De esta forma, la inhibición del SST3 puede constituir una importante estrategia alternativa al uso de antibióticos convencionales.

A la fecha, sin embargo, hay aún componentes estructurales en los inyectisomas bacterianos cuya función precisa se desconoce. Caracterizar estas piezas de función desconocida daría pauta a una mejor y más completa comprensión de la estructura y del funcionamiento de esta máquina molecular. Otra de las grandes incógnitas acerca del funcionamiento del inyectisoma es cómo esta maquinaria regula la jerarquía de secreción para su autoensamblado con tal precisión.

Actualmente en el laboratorio, empleando el inyectisoma de *Escherichia coli* enteropatógena como modelo, estamos trabajando para descifrar los mecanismos de jerarquización en la secreción de sustratos así como en la dilucidación del papel de marcos de lectura abiertos sin función asignada en la biogénesis del inyectisoma de este patógeno de humanos.

Referencias

1. World Health Organisation (2004) The global burden of disease 2004. *Update* **1**, 160
2. Cornelis, G. R. (2006). *Nat. Rev. Microbiol.* **4**, 811–825
3. Chatterjee, S., Chaudhury, S., McShan, A. C., Kaur, K., and De Guzman, R. N. (2013). *Biochemistry* **52**, 2508–17
4. Stephens, R. S. (1998). *Science (80-)*. **282**, 754–759
5. Gophna, U., Ron, E. Z., and Graur, D. (2003). *Gene* **312**, 151–163
6. Hacker, J., Blum-Oehler, G., Mühldorfer, I., and Tschäpe, H. (1997). *Mol. Microbiol.* **23**, 1089–97
7. Nguyen, L., Paulsen, I. T., Tchieu, J., Hueck, C. J., and Saier, M. H. (2000). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**, 125–44
8. Kawamoto, A., Morimoto, Y. V., Miyata, T., Minamino, T., Hughes, K. T., Kato, T., and Namba, K. (2013). *Sci. Rep.* **3**, 3369
9. Abby, S. S., and Rocha, E. P. C. (2012). *PLoS Genet.* **8**, e1002983
10. Haensch, S., Bianucci, R., Signoli, M., Rajerison, M., Schultz, M., Kacki, S., Vermunt, M., Weston, D. A., Hurst, D., Achtman, M., Carniel, E., and Bramanti, B. (2010). *PLoS Pathog.* **6**, e1001134

11. Bos, K. I., Schuenemann, V. J., Golding, G. B., Burbano, H. A., Waglechner, N., Coombes, B. K., McPhee, J. B., DeWitte, S. N., Meyer, M., Schmedes, S., Wood, J., Earn, D. J. D., Herring, D. A., Bauer, P., Poinar, H. N., and Krause, J. (2011). *Nature* **478**, 506–10
12. Alesina, A. (2013). *Science* **342**, 427–8
13. Cornelis, G. R. (2002). *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 742–52
14. Shannon, J. G., Hasenkrug, A. M., Dorward, D. W., Nair, V., Carmody, A. B., and Hinnebusch, B. J. (2013). *MBio* **4**, e00170–13
15. Büttner, D. (2012). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **76**, 262–310
16. Kosarewicz, A., Königsmaier, L., and Marlovits, T. C. (2012). *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **367**, 1140–54
17. Hueck, C. J. (1998). *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 379–433
18. Nataro, J. P., and Kaper, J. B. (1998). *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 142–201
19. Daniell, S. J., Takahashi, N., Wilson, R., Friedberg, D., Rosenshine, I., Booy, F. P., Shaw, R. K., Knutton, S., Frankel, G., and Aizawa, S. (2001). *Cell. Microbiol.* **3**, 865–871
20. Wilson, R. K., Shaw, R. K., Daniell, S., Knutton, S., and Frankel, G. (2001). *Cell. Microbiol.* **3**, 753–762
21. Daniell, S. J., Kocsis, E., Morris, E., Knutton, S., Booy, F. P., and Frankel, G. (2003). *Mol. Microbiol.* **49**, 301–8
22. Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, M. J., Nisan, I., Neves, B. C., Bain, C., Wolff, C., Dougan, G., and Frankel, G. (1998). *EMBO J.* **17**, 2166–76
23. Yip, C. K., and Strynadka, N. C. J. (2006) New structural insights into the bacterial type III secretion system. *Trends Biochem. Sci.* **31**, 223–30
24. Gauthier, A., Puente, J. L., and Finlay, B. B. (2003) *Infection and Immunity* **71**, 3310–3319.
25. Spreter, T., Yip, C. K., Sanowar, S., André, I., Kimbrough, T. G., Vuckovic, M., Pfuetzner, R. A., Deng, W., Yu, A. C., Finlay, B. B., Baker, D., Miller, S. I., and Strynadka, N. C. J. (2009). *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 468–76
26. 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., and Strynadka, N. C. J. (2005). *Nature* **435**, 702–7
27. Sal-Man, N., Deng, W., and Finlay, B. B. (2012). *Biochem. J.* **442**, 119–25
28. Worrall, L. J., Lameignere, E., and Strynadka, N. C. J. (2011) Structural overview of the bacterial injectisome. *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 3–8
29. Monjarás Feria, J., García-Gómez, E., Espinosa, N., Minamino, T., Namba, K., and González-Pedrajo, B. (2012). *J. Bacteriol.* **194**, 6029–45
30. Diepold, A., Wiesand, U., and Cornelis, G. R. (2011). *Mol. Microbiol.* **82**, 502–14
31. Wagner, S., Königsmaier, L., Lara-Tejero, M., Lefebvre, M., Marlovits, T. C., and Galán, J. E. (2010). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 17745–17750
32. Zarivach, R., Vuckovic, M., Deng, W., Finlay, B. B., and Strynadka, N. C. J. (2007). *Nat. Struct. Mol. Biol.* **14**, 131–7
33. Stebbins, C. E., and Galán, J. E. (2001). *Nature* **414**, 77–81
34. Birtalan, S. C., Phillips, R. M., and Ghosh, P. (2002). *Mol. Cell* **9**, 971–980

35. Akeda, Y., and Galán, J. E. (2005). *Nature* **437**, 911–5
36. Biemans-Oldehinkel, E., Sal-Man, N., Deng, W., Foster, L. J., and Finlay, B. B. (2011). *J. Bacteriol.* **193**, 5514–9
37. Minamino, T., and MacNab, R. M. (2000). *Mol. Microbiol.* **37**, 1494–503
38. Lara-Tejero, M., Kato, J., Wagner, S., Liu, X., and Galán, J. E. (2011). *Science* (80-.). **331**, 1188–1191
39. Diepold, A., Amstutz, M., Abel, S., Sorg, I., Jenal, U., and Cornelis, G. R. (2010). *Eur. Mol. Biol. Organ. J.* **29**, 1928–1940
40. Diepold, A., Wiesand, U., Amstutz, M., and Cornelis, G. R. (2012). *Mol. Microbiol.* **85**, 878–92
41. Gauthier, A., Puente, J. L., and Finlay, B. B. (2003). *Infect. Immun.* **71**, 3310–3319
42. Deane, J. E., Abrusci, P., Johnson, S., and Lea, S. M. (2010). *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 1065–75
43. Zarivach, R., Deng, W., Vuckovic, M., Felise, H. B., Nguyen, H. V., Miller, S. I., Finlay, B. B., and Strynadka, N. C. J. (2008). *Nature* **453**, 124–7
44. Day, J. B., and Plano, G. V. (1998) A complex composed of SycN and YscB functions as a specific chaperone for YopN in *Yersinia pestis*. *Mol. Microbiol.* **30**, 777–788
45. Widmaier, D. M., Tullman-Ercek, D., Mirsky, E. A., Hill, R., Govindarajan, S., Minshull, J., and Voigt, C. A. (2009). *Mol. Syst. Biol.* **5**, 309
46. Huemmerich, D., Helsen, C. W., Quedzuweit, S., Oschmann, J., Rudolph, R., and Scheibel, T. (2004). *Biochemistry* **43**, 13604–12
47. Vetter, I., and Lewis, R. J. (2012). *Curr. Top. Med. Chem.* **12**, 1546–52
48. Singer, H. M., Erhardt, M., Steiner, A. M., Zhang, M.-M., Yoshikami, D., Bulaj, G., Olivera, B. M., and Hughes, K. T. (2012). *MBio* **3** e00115-12
49. Hirano, T., Minamino, T., Namba, K., and Macnab, R. M. (2003). *J. Bacteriol.* **185**, 2485–92
50. Chilcott, G. S., and Hughes, K. T. (1998). *Mol. Microbiol.* **30**, 1029–1040
51. Garmory, H. S., Brown, K. A., and Titball, R. W. (2002). *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 339–53
52. Rüssmann, H. (2004). *Int. J. Med. Microbiol.* **293**, 565–9
53. Hegazy, W. A. H., and Hensel, M. (2012). *Future Microbiol.* **7**, 111–27
54. Carleton, H. a, Lara-Tejero, M., Liu, X., and Galán, J. E. (2013). *Nat. Commun.* **4**, 1590
55. Khachatourians, G. G., Clark, D. J., Adler, H. I., and Hardigree, A. A. (1973). *J. Bacteriol.* **116**, 226–9
56. Keyser, P., Elofsson, M., Rosell, S., and Wolf-Watz, H. (2008). *J. Intern. Med.* **264**, 17–29
57. Veenendaal, A. K. J., Sundin, C., and Blocker, A. J. (2009). *J. Bacteriol.* **191**, 563–70
58. Aiello, D., Williams, J. D., Majgier-Baranowska, H., Patel, I., Peet, N. P., Huang, J., Lory, S., Bowlin, T. L., and Moir, D. T. (2010). *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 1988–99

59. Kimura, K., Iwatsuki, M., Nagai, T., Matsumoto, A., Takahashi, Y., Shiomi, K., Omura, S., and Abe, A. (2011). *J. Antibiot. (Tokyo)*. **64**, 197–203
60. Duncan, M. C., Linington, R. G., and Auerbuch, V. (2012). *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**, 5433–41
61. Pallen, M. J., Beatson, S. A., and Bailey, C. M. (2005). *BMC Microbiol.* **21**, 9–12

Semblanza de la Dra. Bertha González Pedrajo.



Bertha González Pedrajo es Bióloga (Facultad de Ciencias) así como Maestra y Doctora en Investigación Biomédica Básica (UACPyP del CCH) por la Universidad Nacional Autónoma de México. Realizó una estancia posdoctoral en la Universidad de Yale E.U., estudiando el sistema de exportación de proteínas flagelares en *Salmonella enterica*. Actualmente es Investigadora Titular B en el Departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y su principal interés en investigación se centra en conocer los mecanismos moleculares mediante los que ocurre la secreción de efectores de virulencia en *Escherichia coli* enteropatógena. Ha publicado más de una veintena de artículos de investigación original con más de 500 citas a su trabajo. Pertenece al Sistema Nacional de Investigadores desde 1998. Ha dirigido 5 tesis de licenciatura, 5 de maestría y 3 de doctorado. Su trabajo de investigación ha sido financiado por el CONACYT, la DGAPA (UNAM) y por la Fundación Miguel Alemán.

