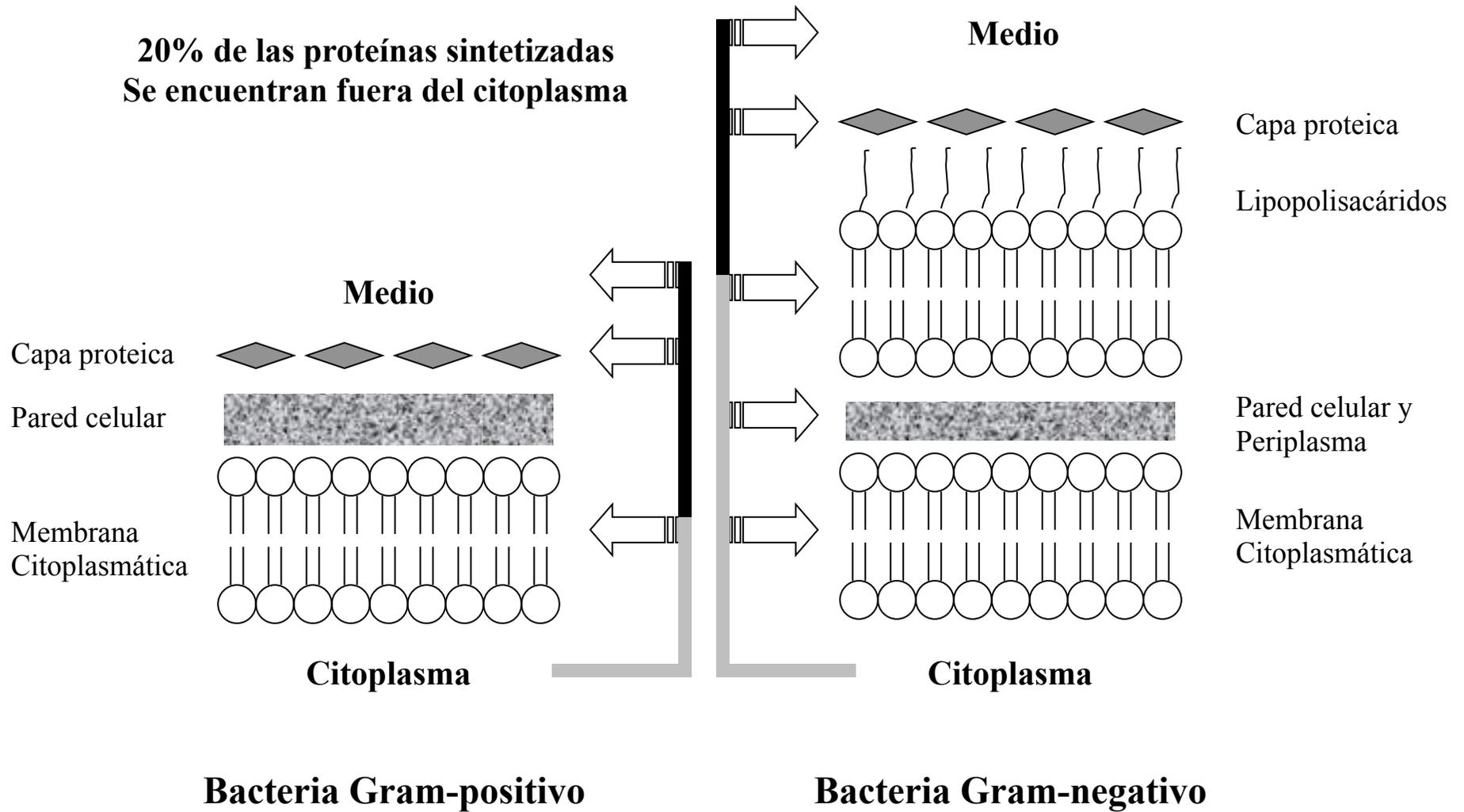


SECRECIÓN DE PROTEÍNAS EN BACTERIAS



DEFINICIONES

➤ Translocación

La proteína es transportada a través una membrana.

➤ Exportación

La proteína es transportada de su lugar de síntesis, el citoplasma, hacia una otra localización celular.
Envoltura celular (“cell envelope”)

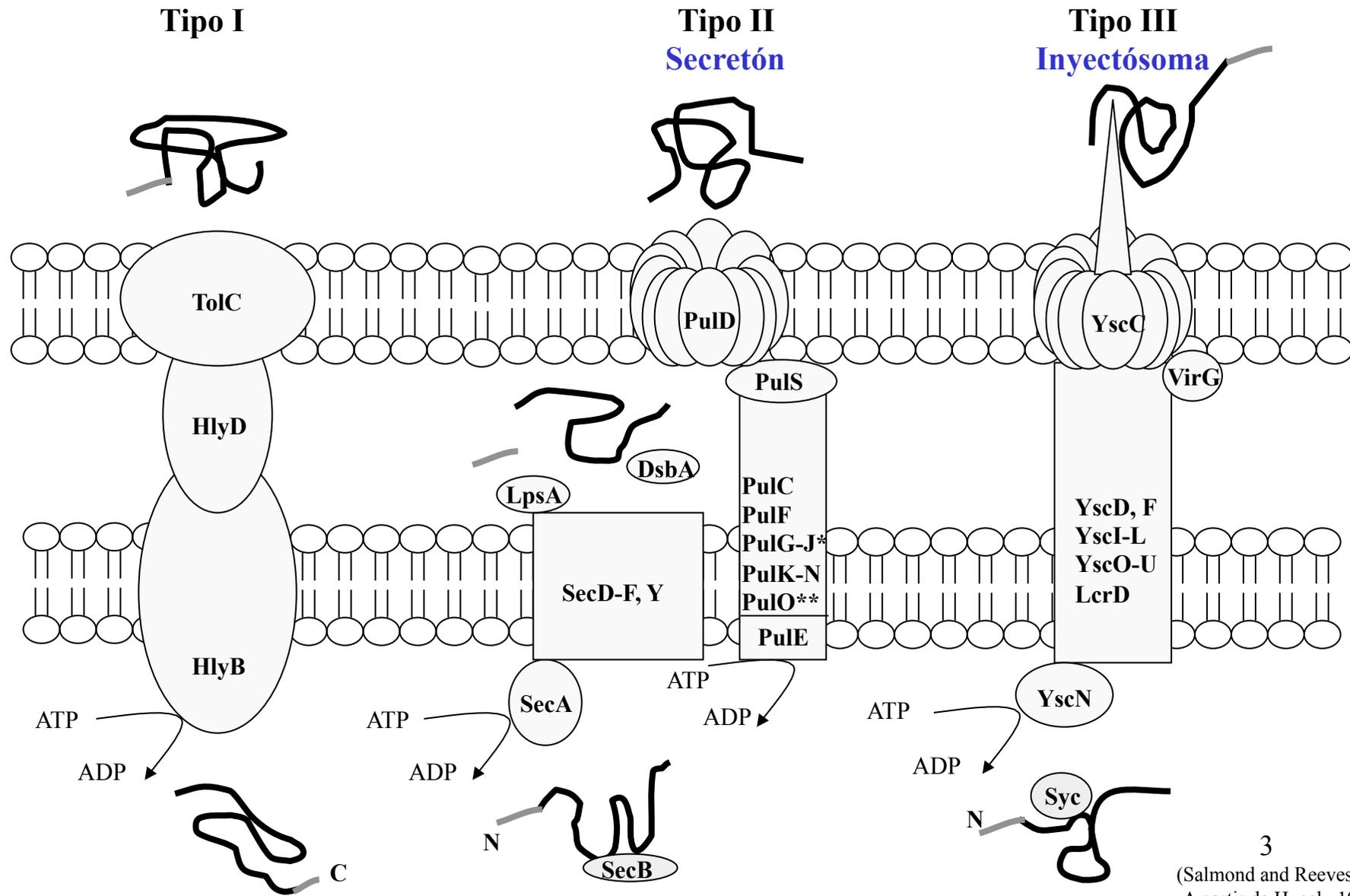
➤ Secreción (“selective, active and non-destructive process”)

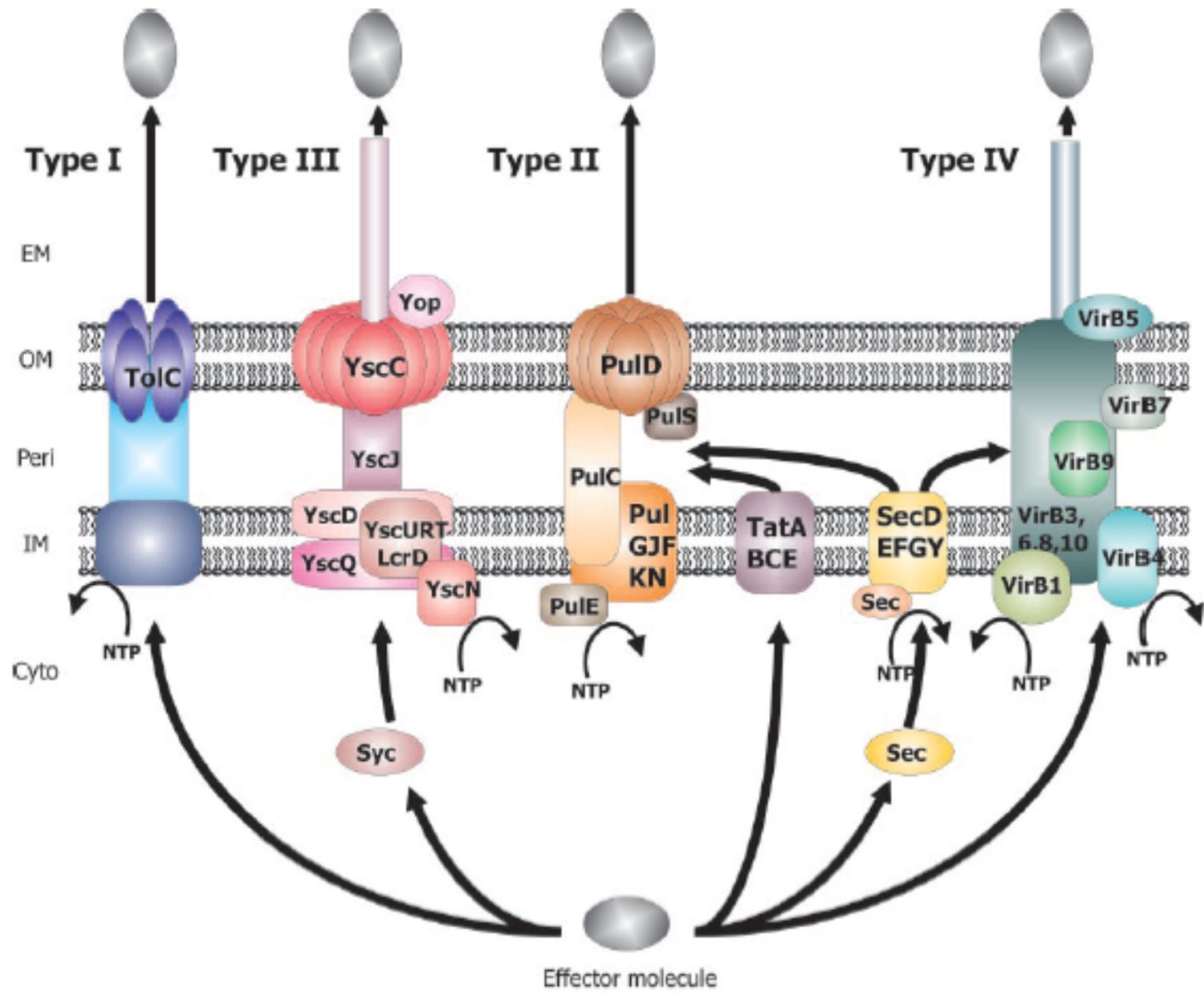
La proteína es exportada afuera de la bicapa lipídica mas externa (soluble/asociada a membrana/apéndice).

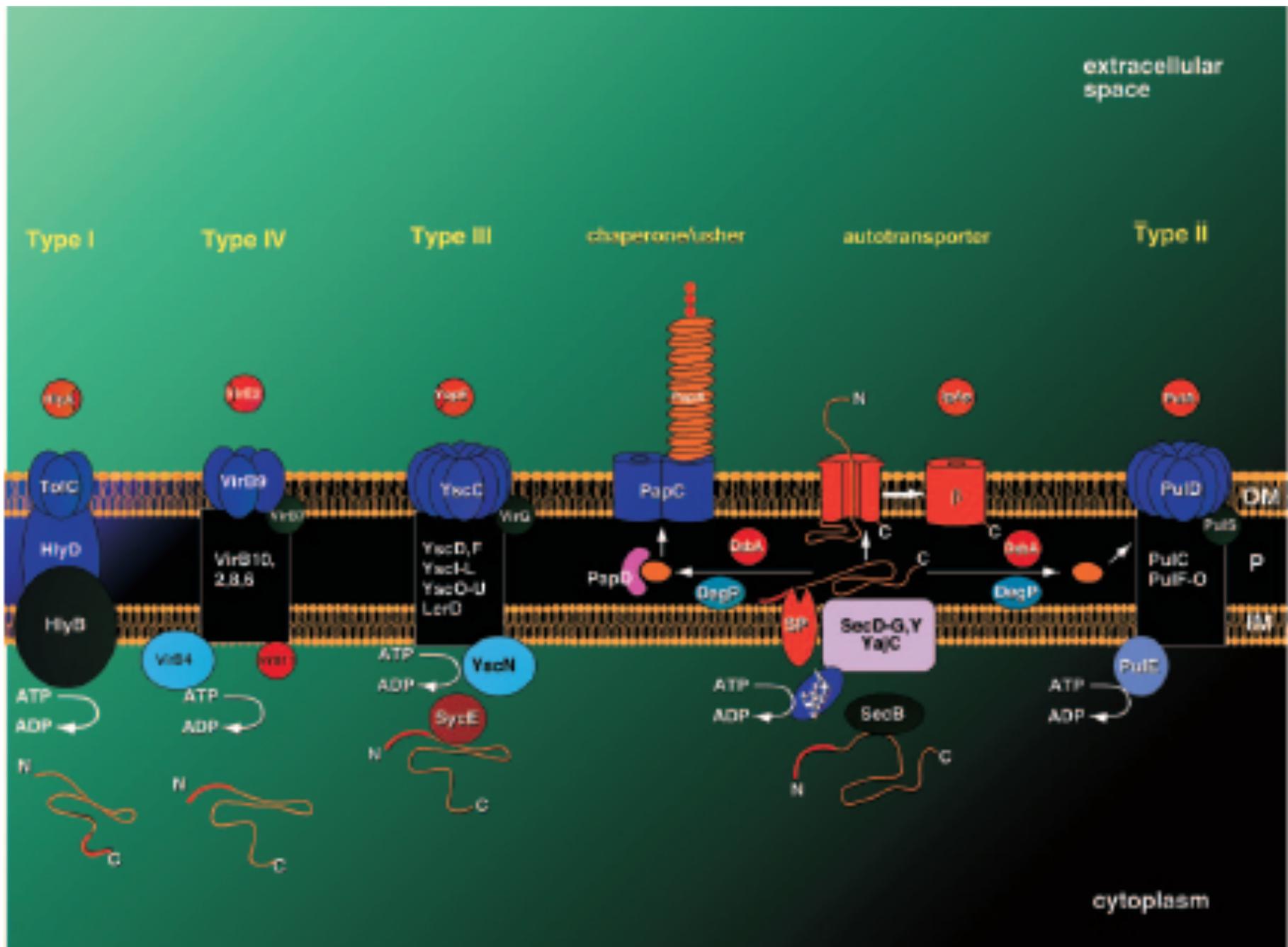
➤ Excreción

Transporte de componentes no proteicos, como los antibióticos, los aminoácidos, o los polisacáridos.

REPRESENTACION ESQUÉMÁTICA DE TRES VIAS DE SECRECION







LAS DIFERENTES VIAS CONOCIDAS DE SECRECION BACTERIANAS

➤ La vía de secreción de tipo I (T1SS)

- Los exportadores ABC.

➤ Translocación del citoplasma hacia la membrana citoplasmática.

- La Vía Sec (GEP); La Vía YidC (Oxa1); La Vía Tat (Mtt); La Vía SRP.

➤ La vía de secreción de tipo II (T2SS) o Vía General de Secreción (GSP)

- La maquinaria proteica tipo Pili IV (Out, Pul, Eps, Gsp,...).

➤ La vía de secreción de tipo III (T3SS) o vía de secreción por contacto

- La maquinaria tipo Yop (*Yersinia spp.*) y el Pili Hrp

➤ La vía de secreción de tipo IV (T4SS)

- Transporte de complejos macromoleculares (Protéina y/o DNA) .

➤ La vía de secreción de tipo V (T5SS)

- Va, sin maquinaria proteica, los autotransportadores (AT/AT2) (IgA, *N. gonorrhoeae*).
- Vb, la maquinaria TPS (hemolisina, *S. marcescens*).

➤ La vía de secreción de tipo VI (T6SS). Pukatzki *et al.*, 2006 and Mougous *et al.*, 2006.

➤ La vía de secreción de tipo VII (ESX-1/RD1/ ESAT-6) *Mycobacterium sp.* 6

LA SUPERFAMILIA DE LOS TRANSPORTADORES ABC (GXGKST)

➤ Procariontes

Escherichia coli; Bacillus subtilis.

➤ Archaea

Methanococcus jannaschii

➤ Eucariontes

Homo sapiens; Plasmodium falciparum; Saccharomyces cerevisiae.

➤ Exportadores de Proteínas

PtrA, 50 kDa; Ciclolisina, 216 kDa.

➤ Exportadores de Peptidos

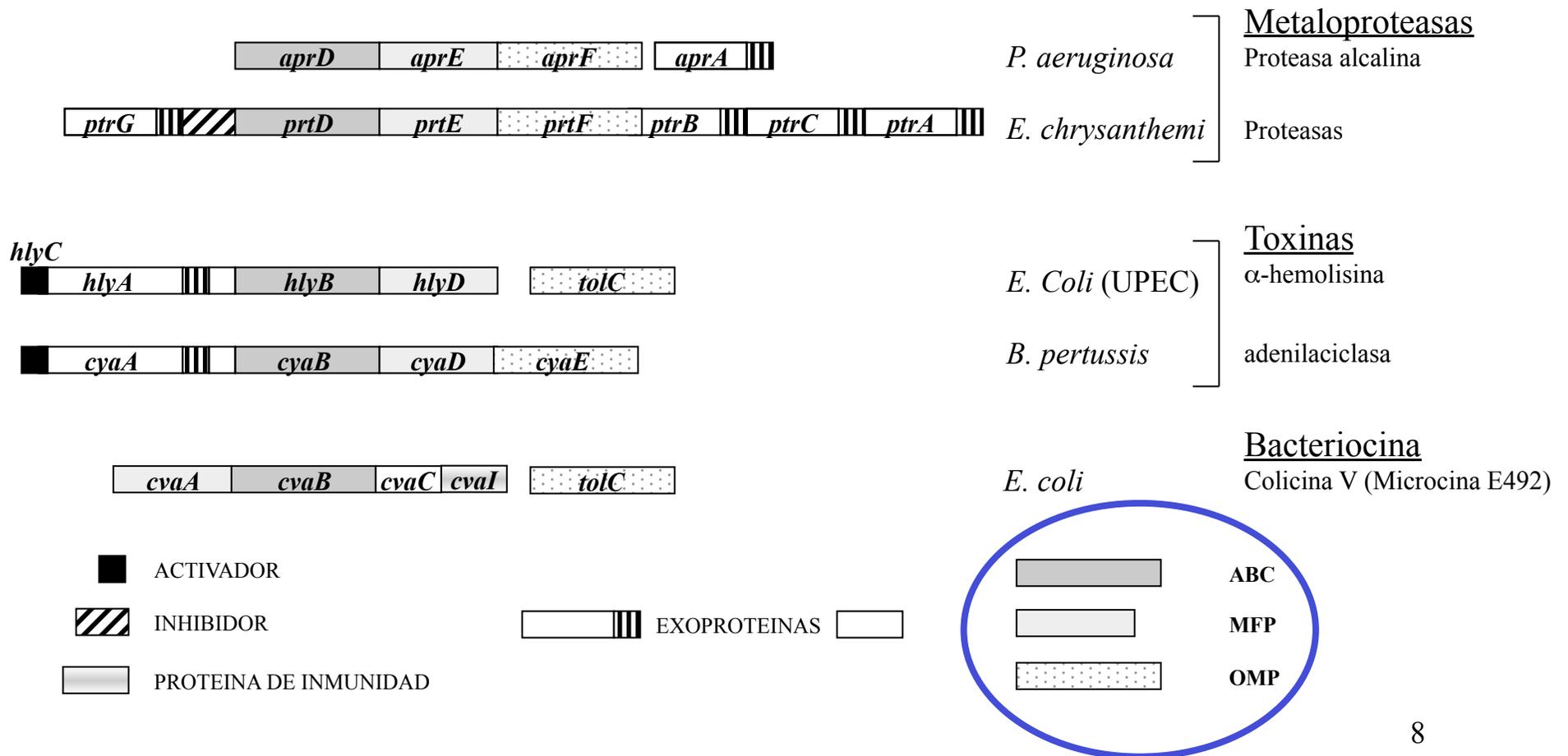
PM < 11kDa; Colicina V, 88 AA; Subtilina (Lantibióticos) 32 AA.

➤ Exportadores de componentes no proteicos

drogas lipofílicas, antibióticas, polisacáridos.

B

ORGANIZACIÓN GÉNICA DE LOS EXPORTADORES ABC BACTERIANOS



¿CUAL ES LA SEÑAL DE SECRECION RECONOCIDA POR LOS TRANSPORTADORES ABC?

➤ **La señal de secreción ha sido localizada en el extremo carboxilo-terminal.**

No es una secuencia primaria conservada sino mas bien un motivo estructural.

➤ **Dos grupos diferentes y específicos de motivos estructurales.**

Proteasas y Lipasas: entre 29 AA y 15 AA - α -hélice (PtrG) río arriba de los 7 o 8 últimos AA

Toxinas: 60 AA (α -hemolisina)

➤ **Estas señales carboxilo-terminal son suficientes.**

Vacuna con bacteria atenuada

Permiten la secreción de cualquier polipeptido “pasajero” (quimérico).

➤ **Motivo repetido (4-36 veces) rico en glicina XXGGXGDX.**

Une el Ca^{2+} ; Su papel es controvertido.

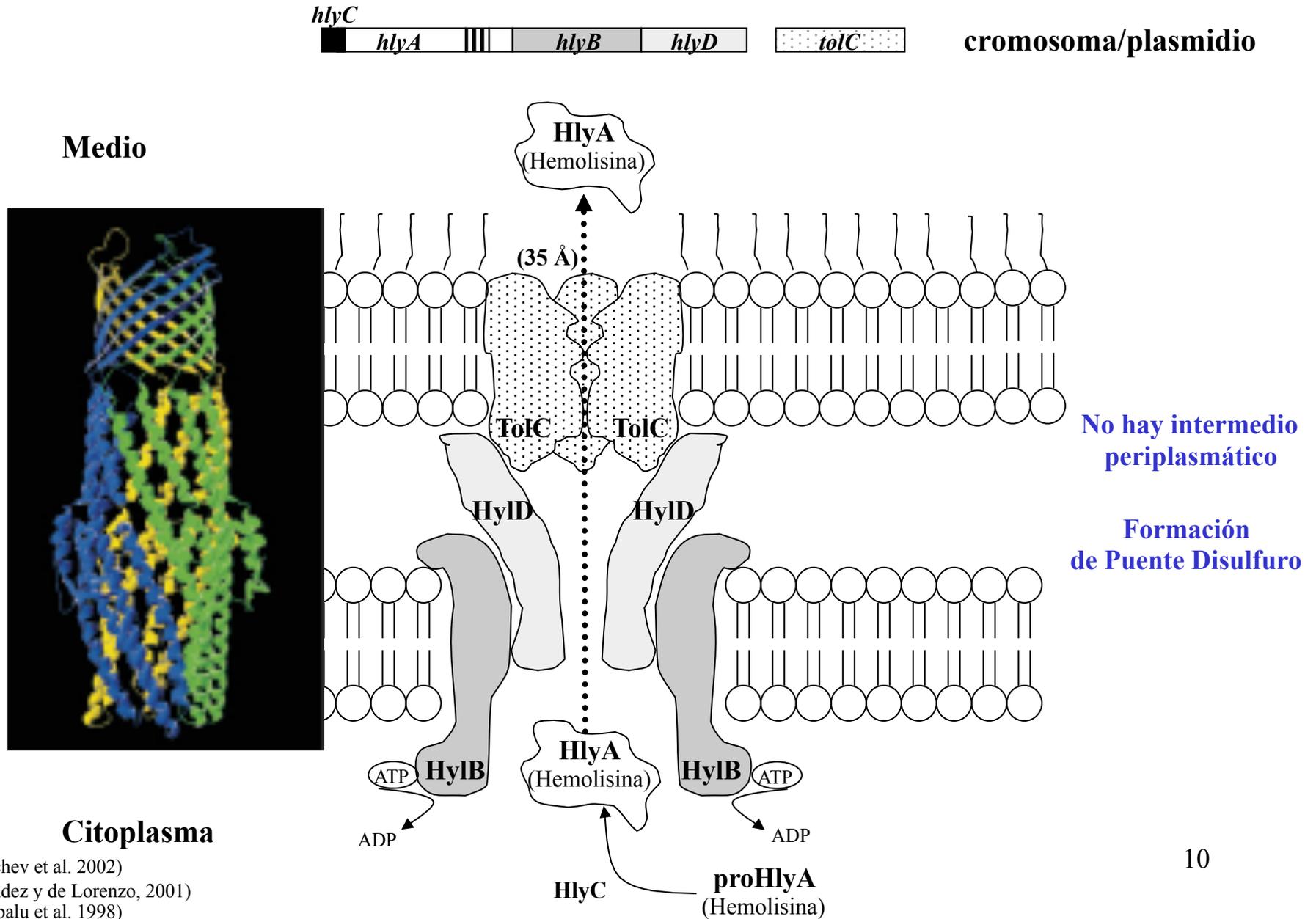
Podría ser un “frontera estructural” entre la señal de secreción y el resto de la proteína.

➤ **El caso particular de los peptidos.**

La colicina V tiene una señal en la región amino-terminal.

Son blancos de varias modificaciones postraduccionales (Dehidroalanina; lantionina).

SECRECION DE LA HEMOLISINA EN *E. coli* (UPEC)



TRANSLOCACION A NIVEL DE LA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA

➤ La maquinaria Sec (“SecB-dependent Targeting”)

[y **YidC** (**Oxa1**):(integración en la membrana)]

SecA, SecB.

Sec D, SecE, SecF,SecG y **SecY**.

➔ “El” peptido señal

La maquinaria Srp (“SRP-dependent Targeting”)

La GTPasa Ffh de 48 kDa (**SRP54**) y su 4.5S RNA (**7S RNA**).

Se une cuando el polipeptido naciente está aun asociado al ribosoma (**L23**).

Receptor FtsY en *E. coli* (**Sr α** y **SR β**)

➔ Sah, Señal de anclaje hidrofóbico (70-150 AA)

➤ La maquinaria Tat (“¿DmsD-dependent “targeting?” ”)

TatA, TatB, TatC, (TatD), TatE

➔ El “Twin-arginine leader”

LA MAQUINARIA SEC

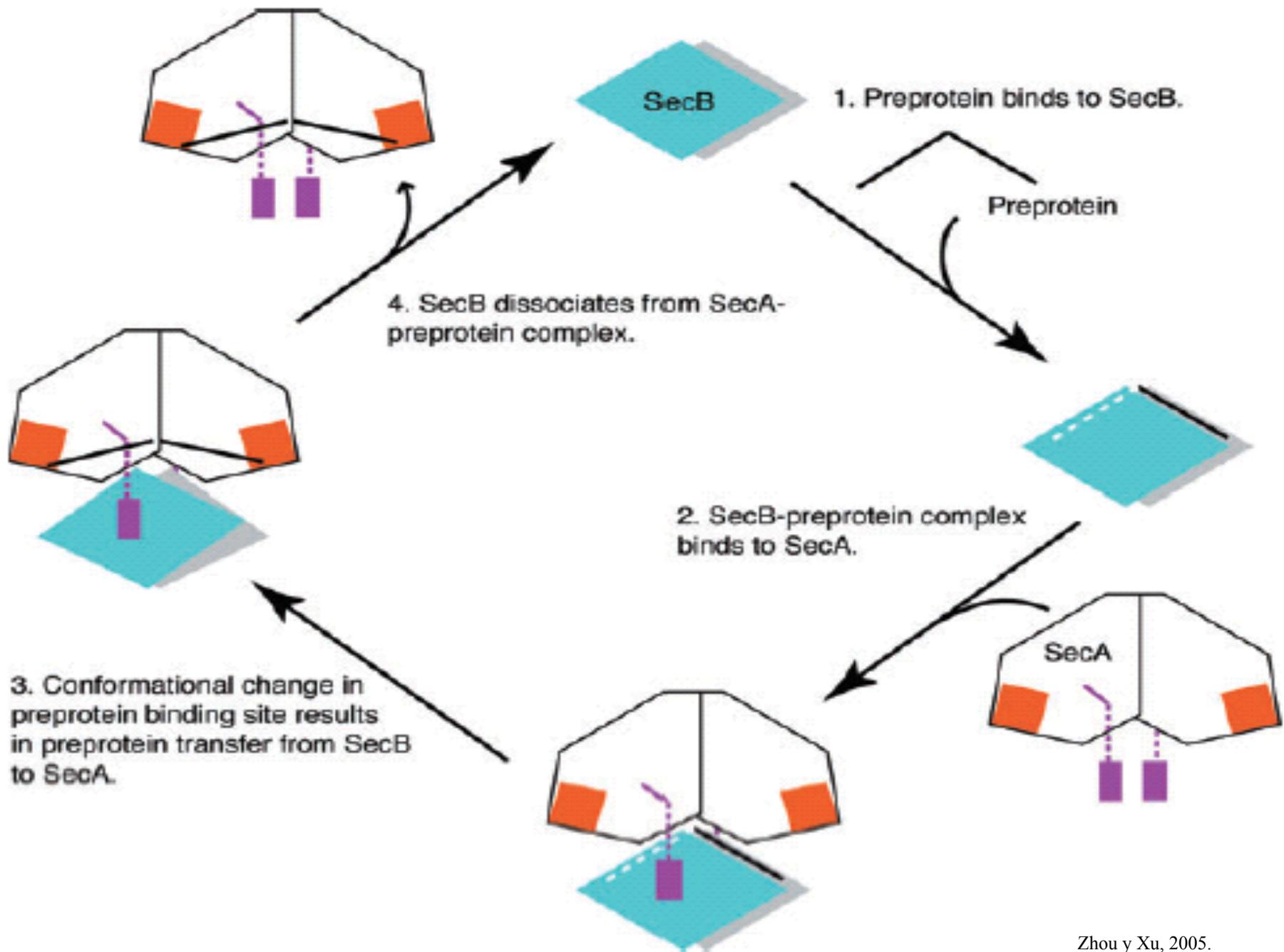
➤ Las proteínas citoplasmáticas de la maquinaria Sec

- SecA:
- Es esencial .
 - ATPasa **dimérica**; **NBD1 y NBD2**: inserción y liberación preP.
 - Alta afinidad FL (Zn^{2+})/SecYEG.
 - “Recibe” al complejo SecB/preproteína.
 - Integra membrana de manera repetida (ATP/ADP) en el poro SecYEG.
 - **Multifuncional: Parte del Translocon (Chen *et al.*, 2007).**

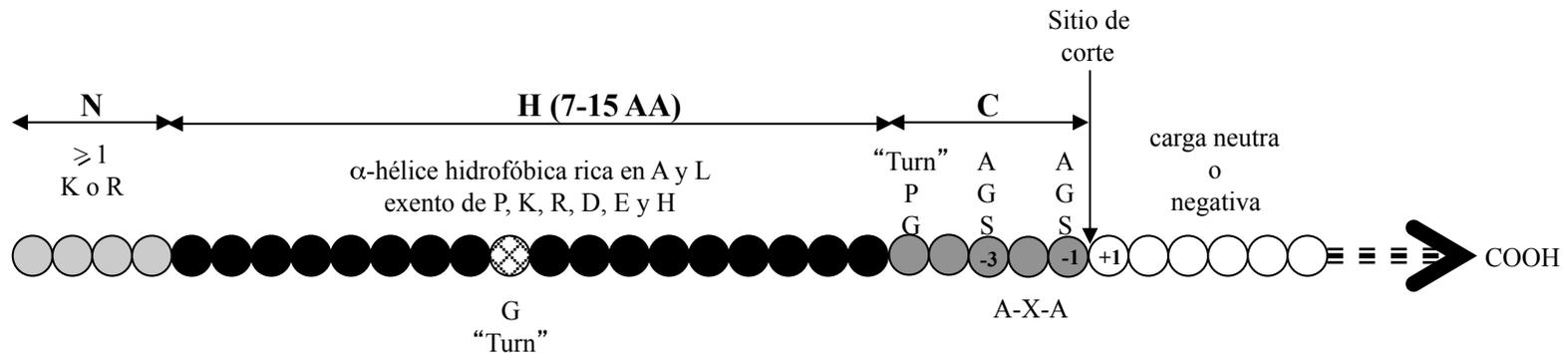
- SecB:
- Altamente ácida. 17kDa. **Tetramérica**. No es una ATPasa.
 - Chaperonina unida al nivel de... ¿estructura β ? ¿secuencia primaria?
 - Mantiene preP en un estado “no-estructurado” y “no-agregado”
 - En asociación con GroEL/ES y DnaK/J-GrpE.
 - Se une al dominio maduro de la preP y a SecA (Zn^{2+}).
 - Esencial para crecimiento en temperaturas bajas (“Cs phenotype”).

➤ La Translocasa (SecYEGDF; “unfoldasa”; membrana citoplasmática)

- 20-30 Å
- SecY: - 10 Dominios transmembranas (DtMs).
- vía entrada (“periplasmic plug”).
 - SecE: - 3 DtMs.
 - SecG: - 2 DtMs.
 - SecD y SecF: - secuencias muy similares (6DtM); estabilizarían SecA integrada.



CARACTERÍSTICAS DEL PEPTIDO SEÑAL



- **Esta constituido de tres zonas** (una sola entidad).

El dominio N: 2 a 3 aminoácidos (¿indispensables?) cargados en la zona amino-terminal. "Targeting"

El dominio H: El más importante; larga zona **hidrofóbica** central.

El dominio C: Polar; contiene el sitio de corte de las petidasas señal (LepB; LspA).

- **Permite la iniciación de la translocación en la membrana citoplasmática**

El número de sitios de translocación es limitado.

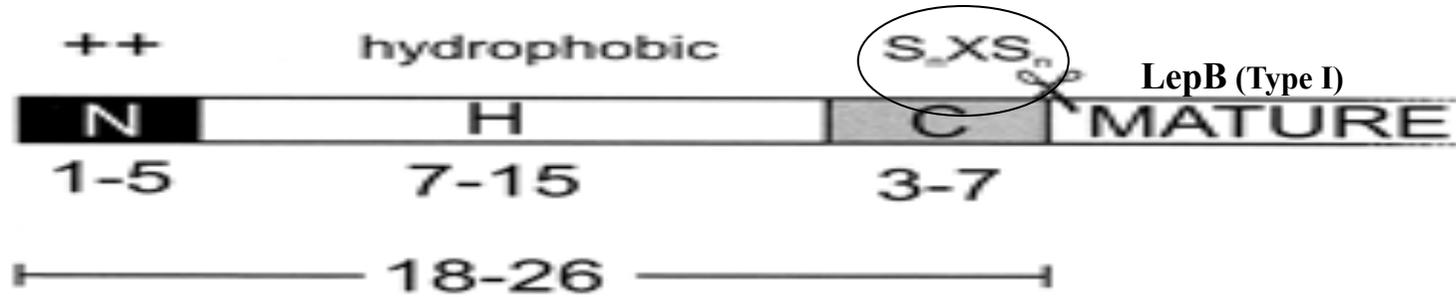
Dirigido por SecB y SecA hacia la translocasa SecY.

- **Interactuaría con todos los componentes de la Translocasa**

- **Interactúa con la membrana vía la carga negativa de los FL** ("targeting" y/o translocación)

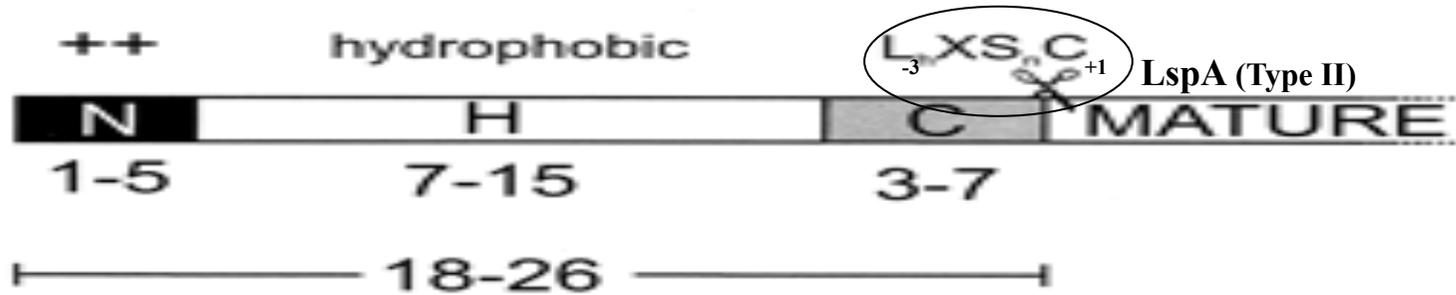
A

Proteina "común"



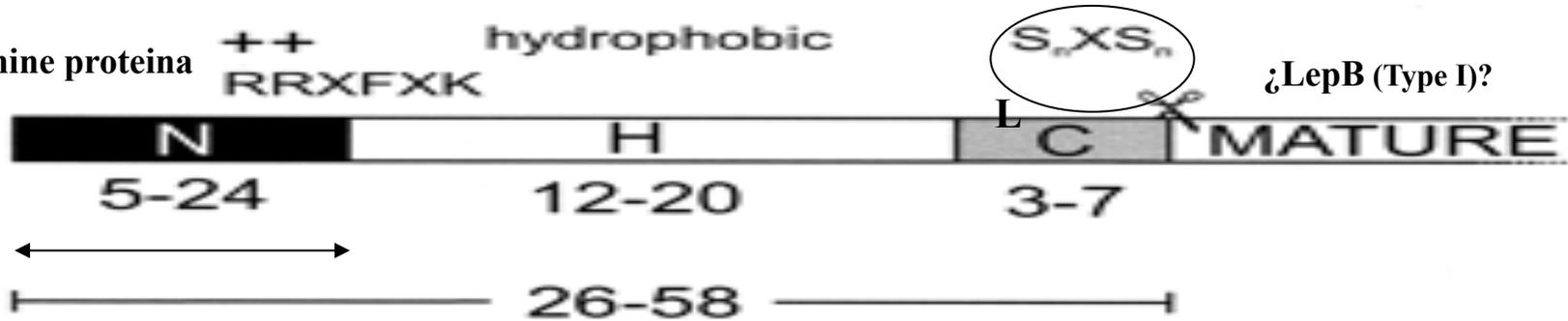
B

Lipoproteína



C

Twin-arginine proteína



TRANSLOCACIÓN VIA EL SISTEMA TAT

(Berck, 1996)

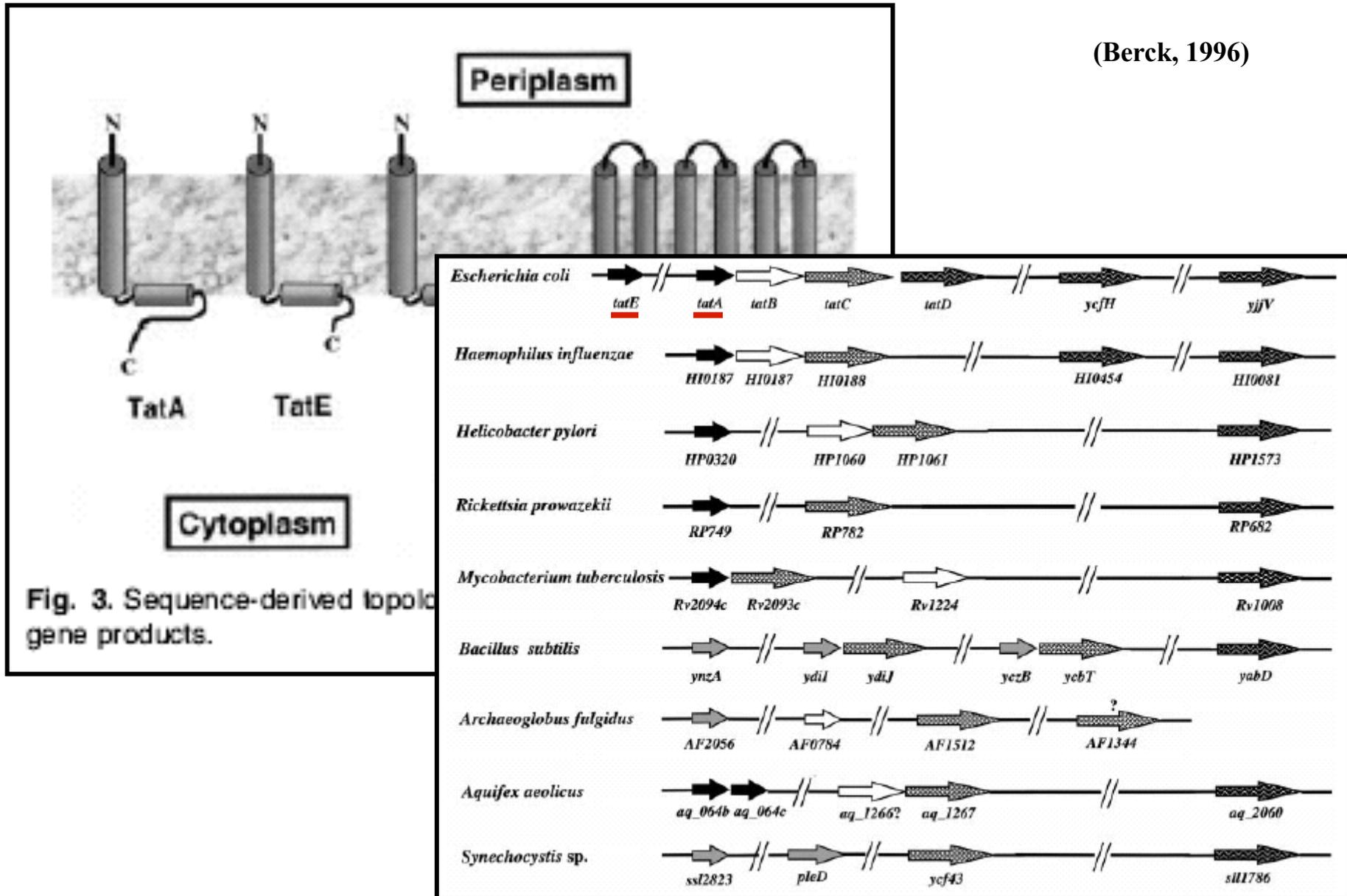


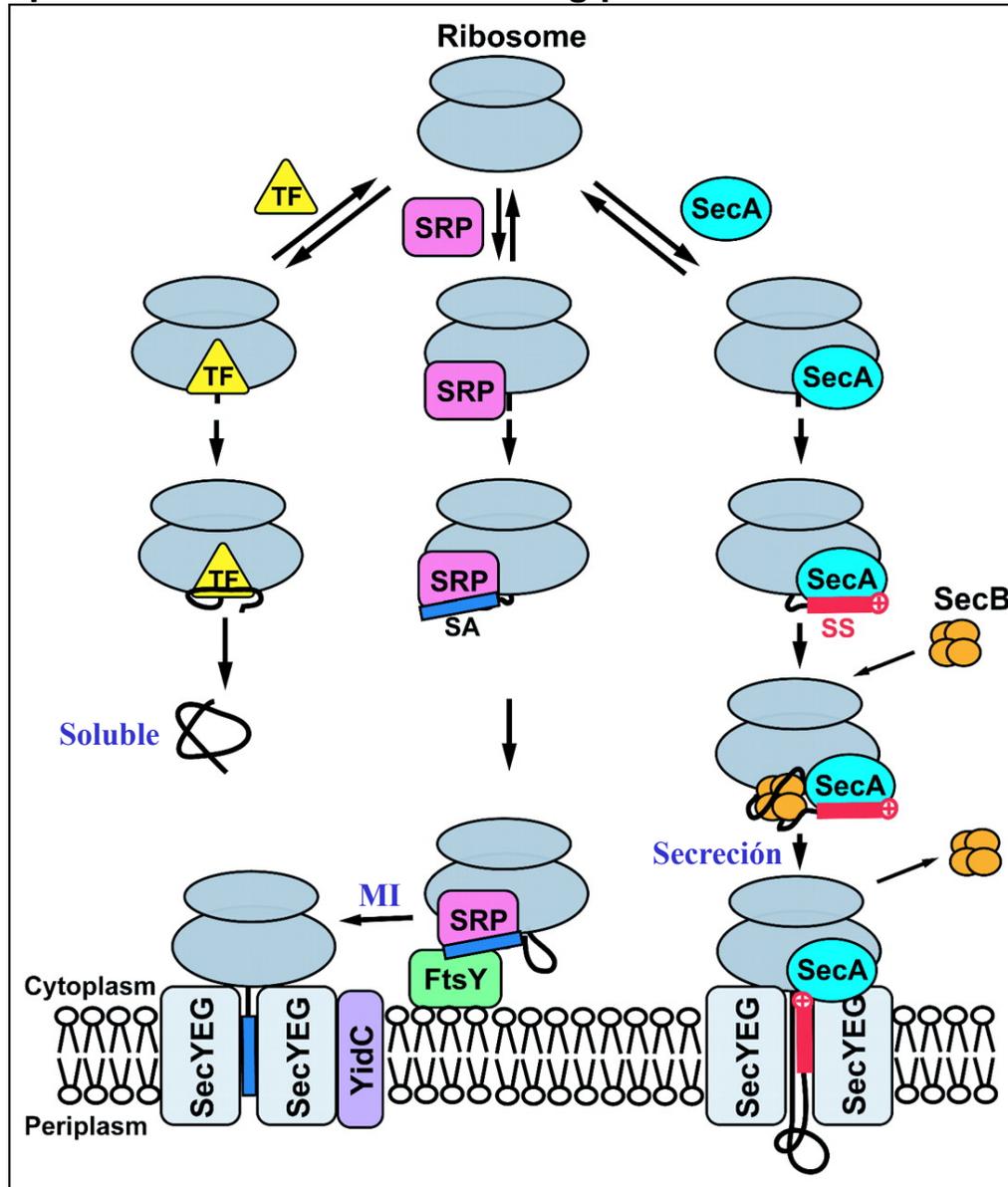
Fig. 3. Sequence-derived topology of gene products.

TRANSLOCACIÓN VIA EL SISTEMA TAT

- Permite la translocación de proteínas **estructuradas** (ej. DMSO, TMAO).
- Proteínas involucradas en las cadenas de transporte de electrones (**co-factor**).
- Similar al sistema de translocación dependiente del ΔpH en cloroplastas
- **La señal de translocación**
es doble cargas en dominios amino S/TRRXFLK y carboxilo K
al parecer es una señal anti-Sec
- **DsmD** chaperonina específica
- **Expresión constitutiva? Aeróbico versus Anaeróbico**
- **Proteínas que hacen “dedo”** (grande subunidad de la Hidrogenasa NiFe de *E. coli*)

Convergencia de las distintas vías "Careras de chaperoninas"

A possible mechanism for sorting proteins in bacterial cells

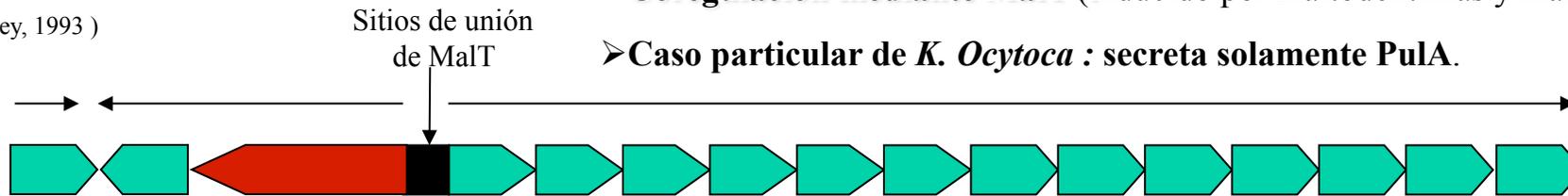


DISTINTOS SISTEMAS DE SECRECIÓN DE TIPO II

LOS TRES OPERONES

OPERON PUL

(Pugsley, 1993)



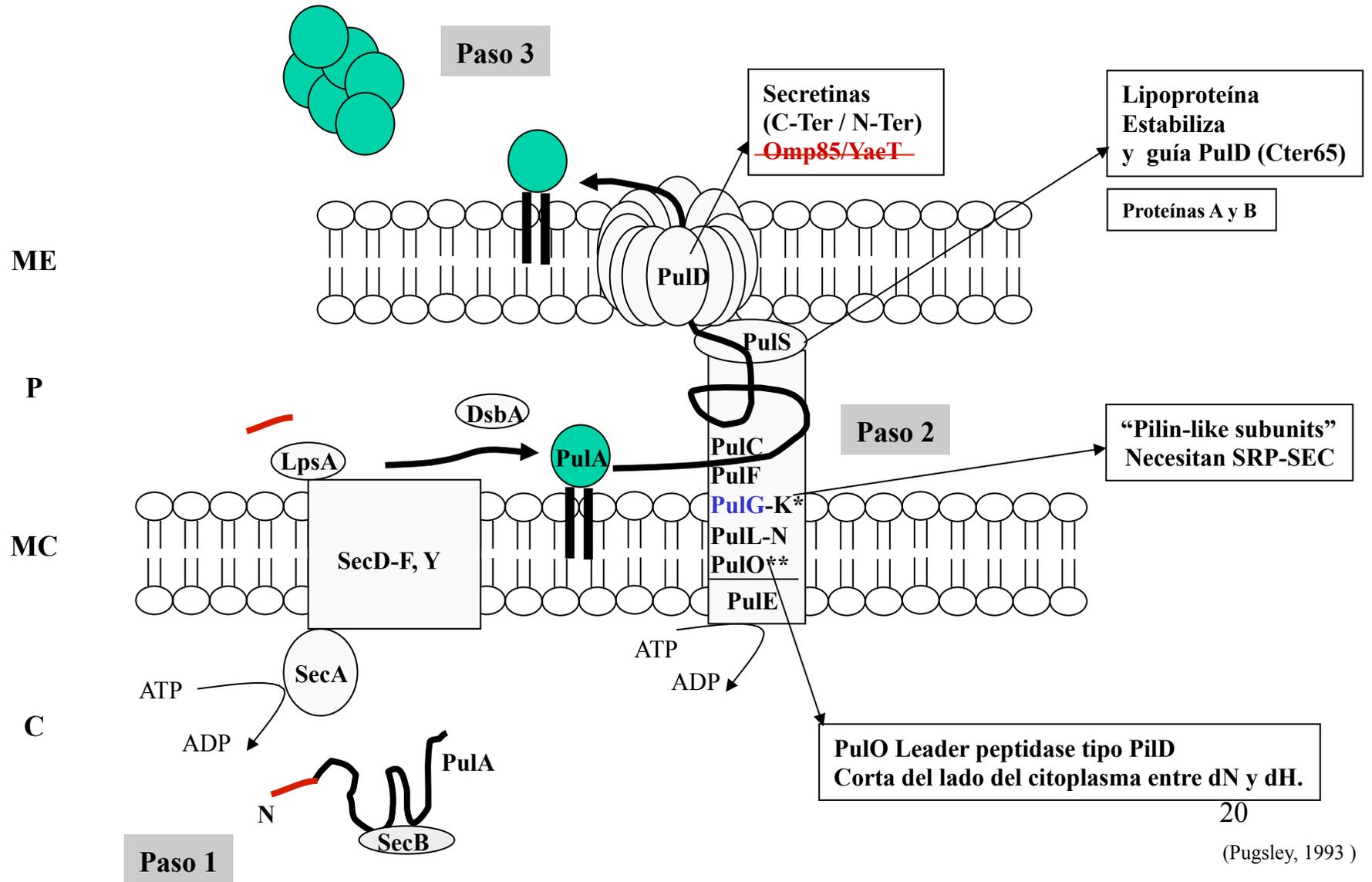
➤ Coregulación mediante MalT (inducido por maltodextrinas y maltotriosas).

➤ Caso particular de *K. Oxytoca* : secreta solamente PulA.

PulS	PulB	PulA	PulC	PulD	PulE	PulF	PulG	PulH	PulI	PulJ	PulK	PulL	PulM	PulN	PulO
12kDa	19 kDa	117kDa	31kDa	69kDa	55kDa	44kDa	15kDa	18kDa	13kDa	22kDa	36kDa	44kDa	18kDa	28kDa	25kDa
OM			CM	OM	C	CM					CM	CM	CM	CM	CM

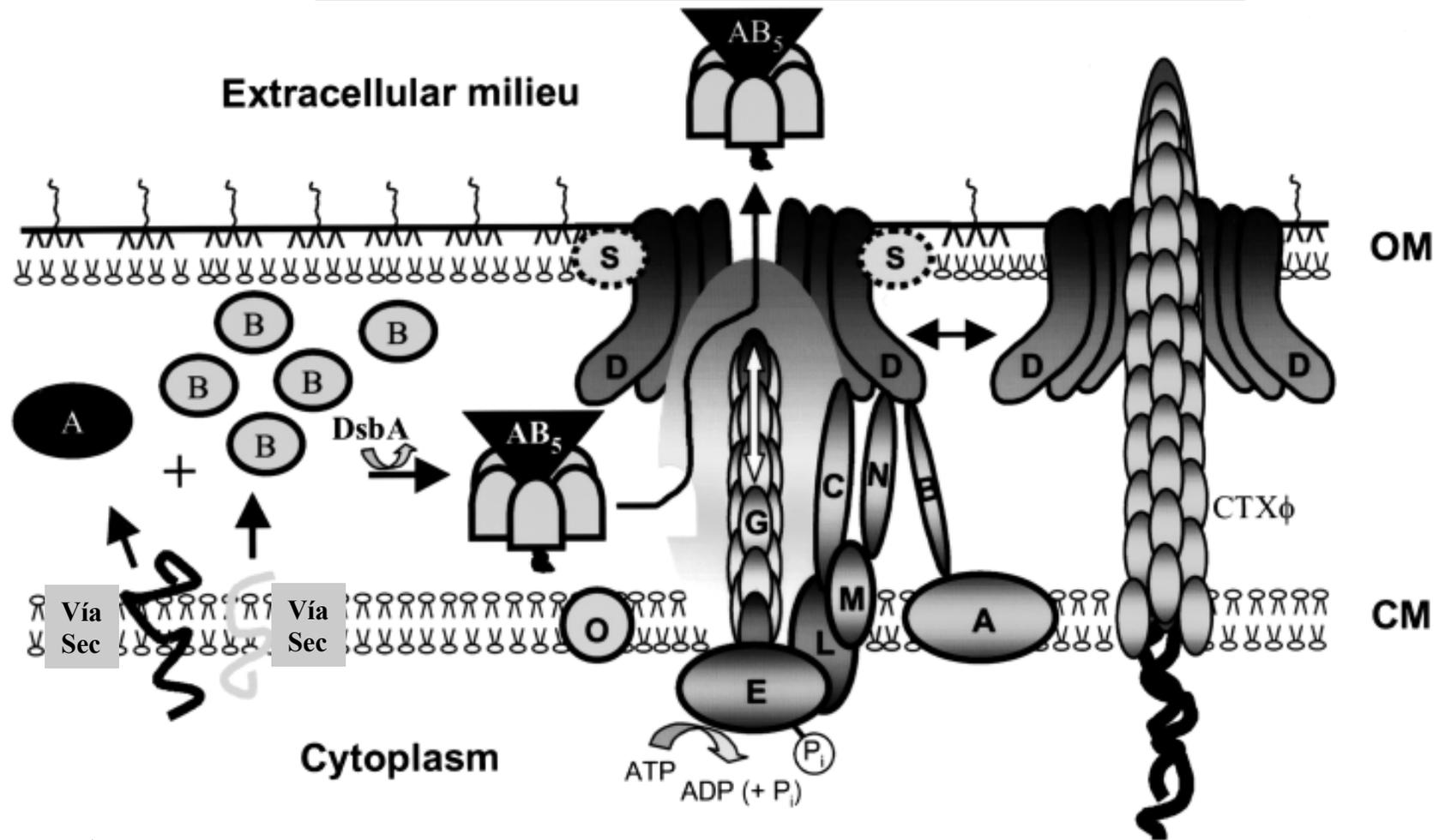
Species ^a	Type II secretion gene products and their subcellular location															
<i>V. cholerae eps</i>		A ^b	B ^b	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	VcpD _O ^c
<i>A. hydrophila exe</i>		A ^b	B ^b	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	TapD _O ^c
<i>E. coli gsp</i>		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M		O
<i>K. oxytoca pul</i>	S		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
<i>E. chrysanthemi out</i>	S		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M		O
<i>E. carotovora out</i>	S		B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
<i>P. aeruginosa xcp</i>				P _C	Q _D	R _E	S _F	T _G	U _H	V _I	W _J	X _K	Y _L	Z _M		A _O /PilD _O ^c
<i>X. campestris xps</i>				D ^d	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N		PilD _O ^c
Localization ^e	om	im	im	im/om	om	c ^f	im	im/om ^g	im/om	im/om	im/om	im/om	im	im	im	im

SECRECION DE LA PULLULANASA (*Klebsciella oxytoca*)



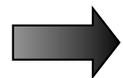
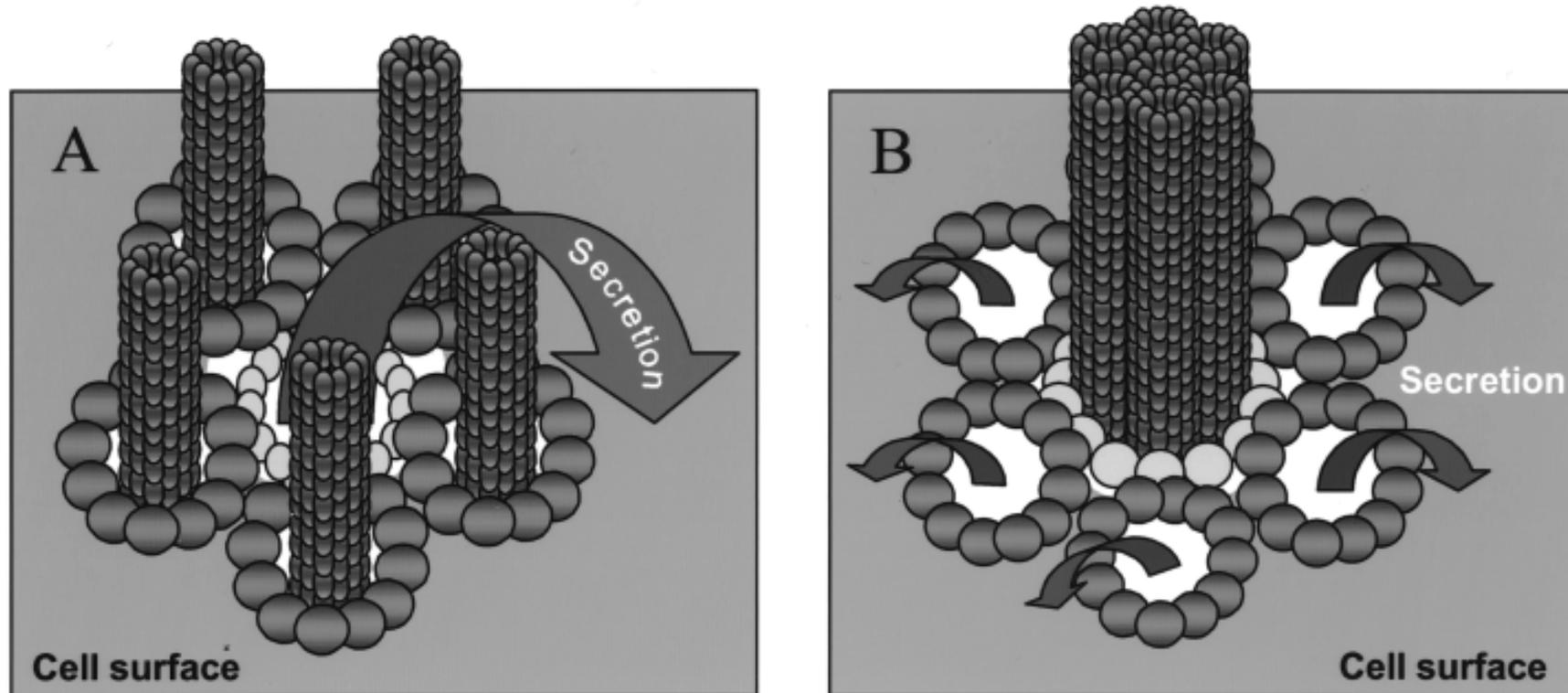
SECRECION DE LA TOXINA DE COLERA

(*Vibrio cholerae*)



➔ Los distintos componentes interactúan para formar un complejo multiprotéico
 Naturaleza y estequiometría de las interacciones?
 Algunas Transitorias; No están todos en el mismo tiempo.

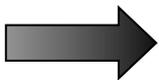
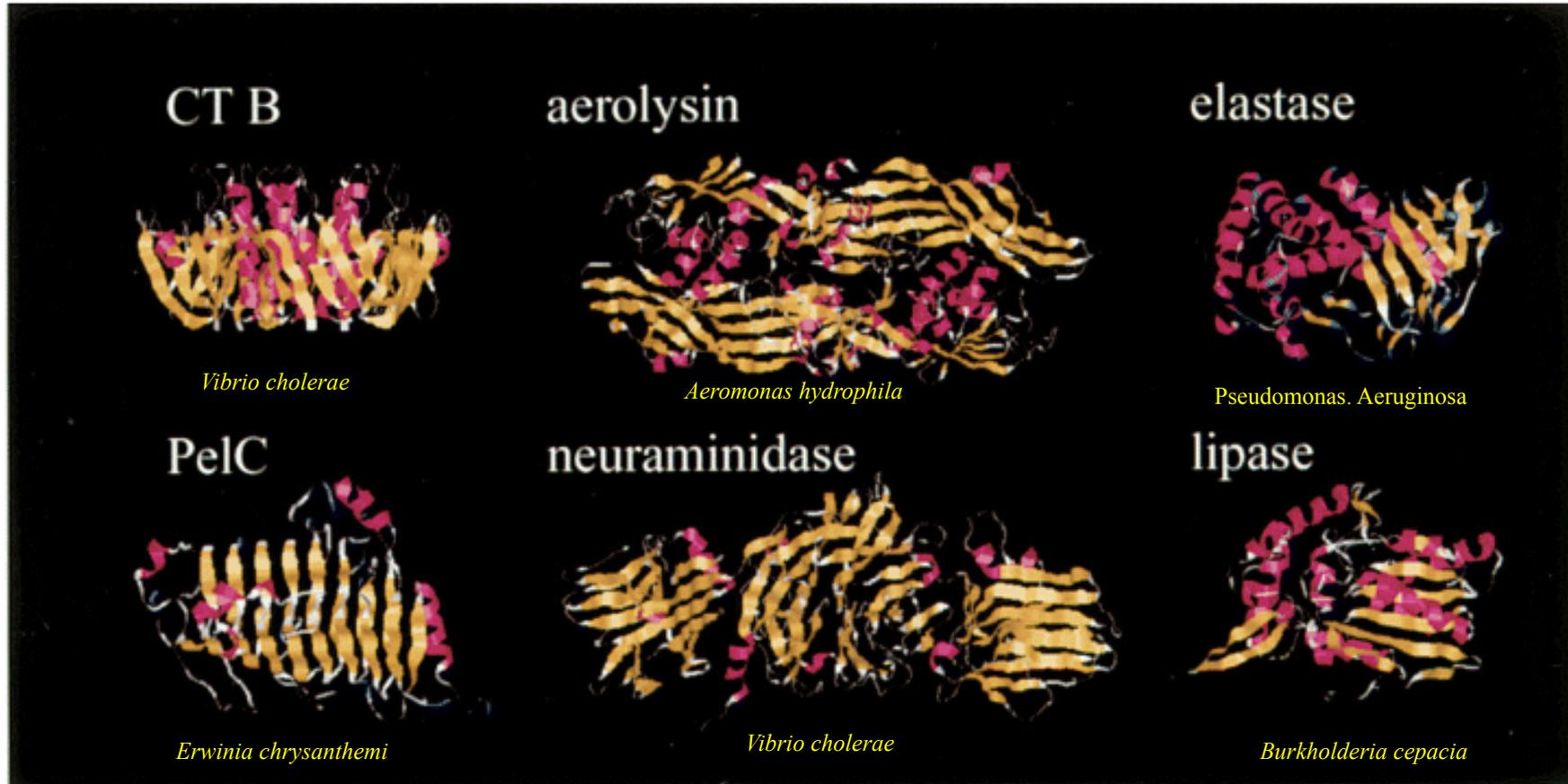
Modelos explicativos para la participación de la estructura tipo Pili



Sistema de Extensión (PilF/Proteína E) y Retracción (PilT/¿?) en Pili tipo IV de *Neisseria gonorrhoeae*.

El Pili actuaría como un émbolo.

Estructuras de proteínas secretadas vía MTB



¿La estructura como señal de reconocimiento?

LA VIA DE SECRECION DE TIPO III TTSS (G-)

- **Asociada a la virulencia bacteriana tanto en planta como en animales.**
- **Presente en varias especies bacterianas; “Targeting” de proteínas en células eucaryotes.**

Patógenos de animales

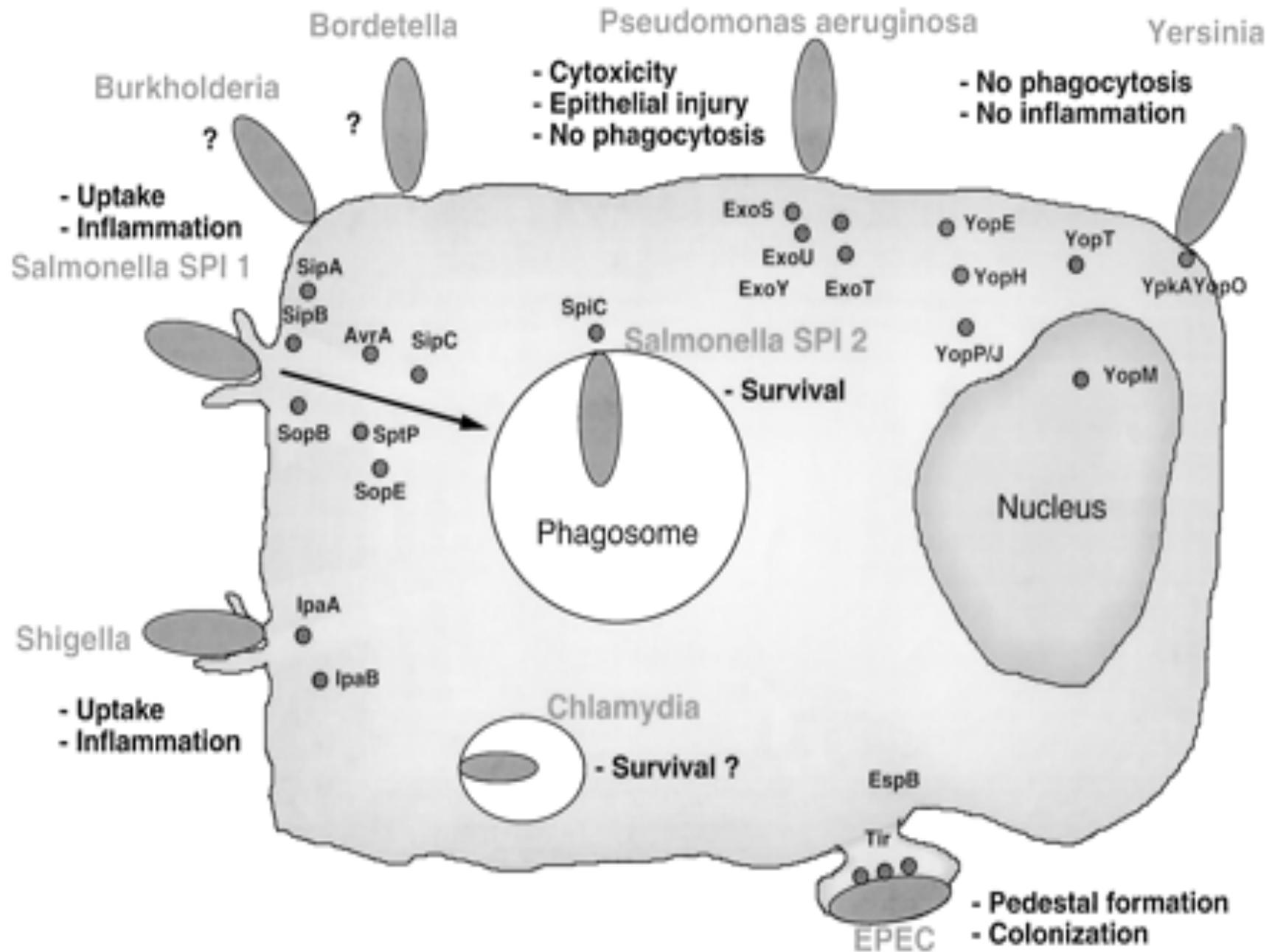
Yersinia spp. (**Yop; 1990**); *Shigella flexneri*; *Salmonella tiphimurium* (SPI; SP2);
las cepas EPEC y EHEC; *Pseudomonas aeruginosa*; *Chlamydia* spp.

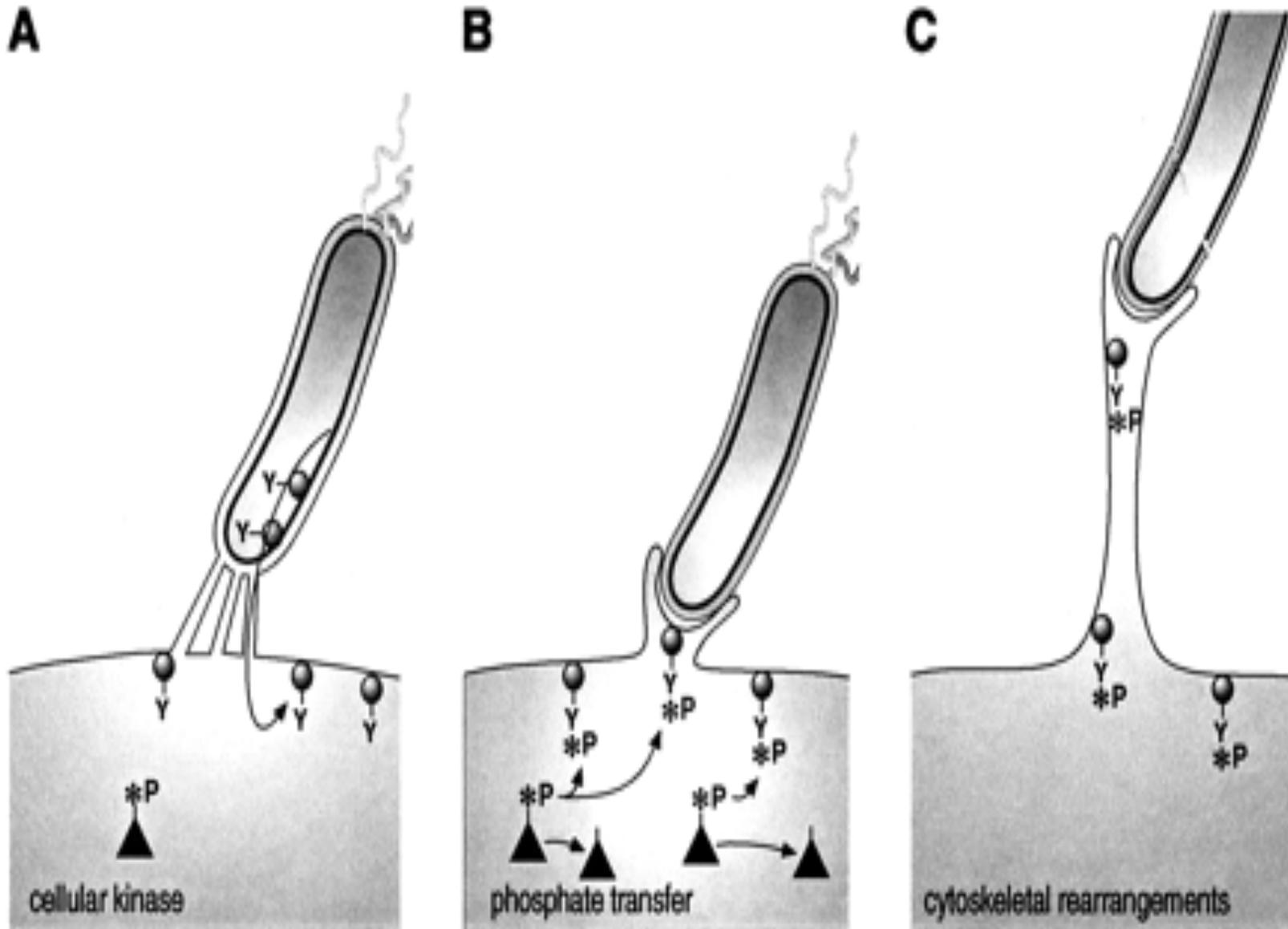
Patógenos de vegetales

los géneros *Erwinia*, *Pseudomonas* (Pili **Hrp**), *Ralstonia* y *Xanthomonas*.

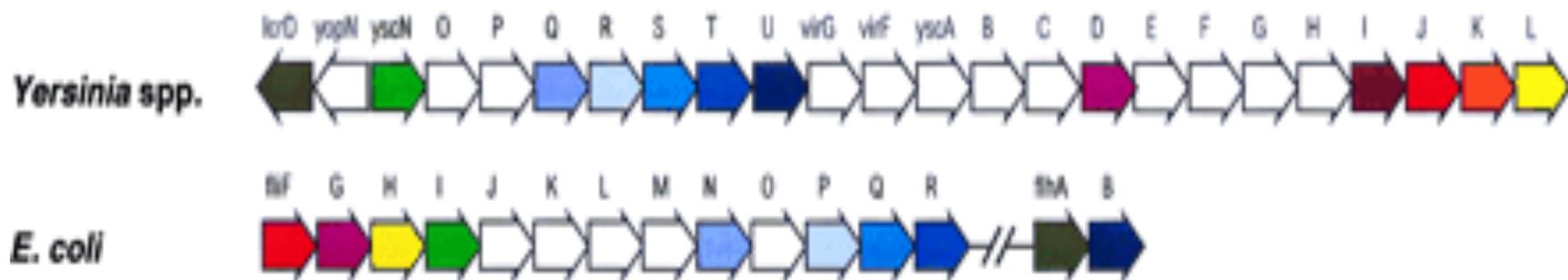
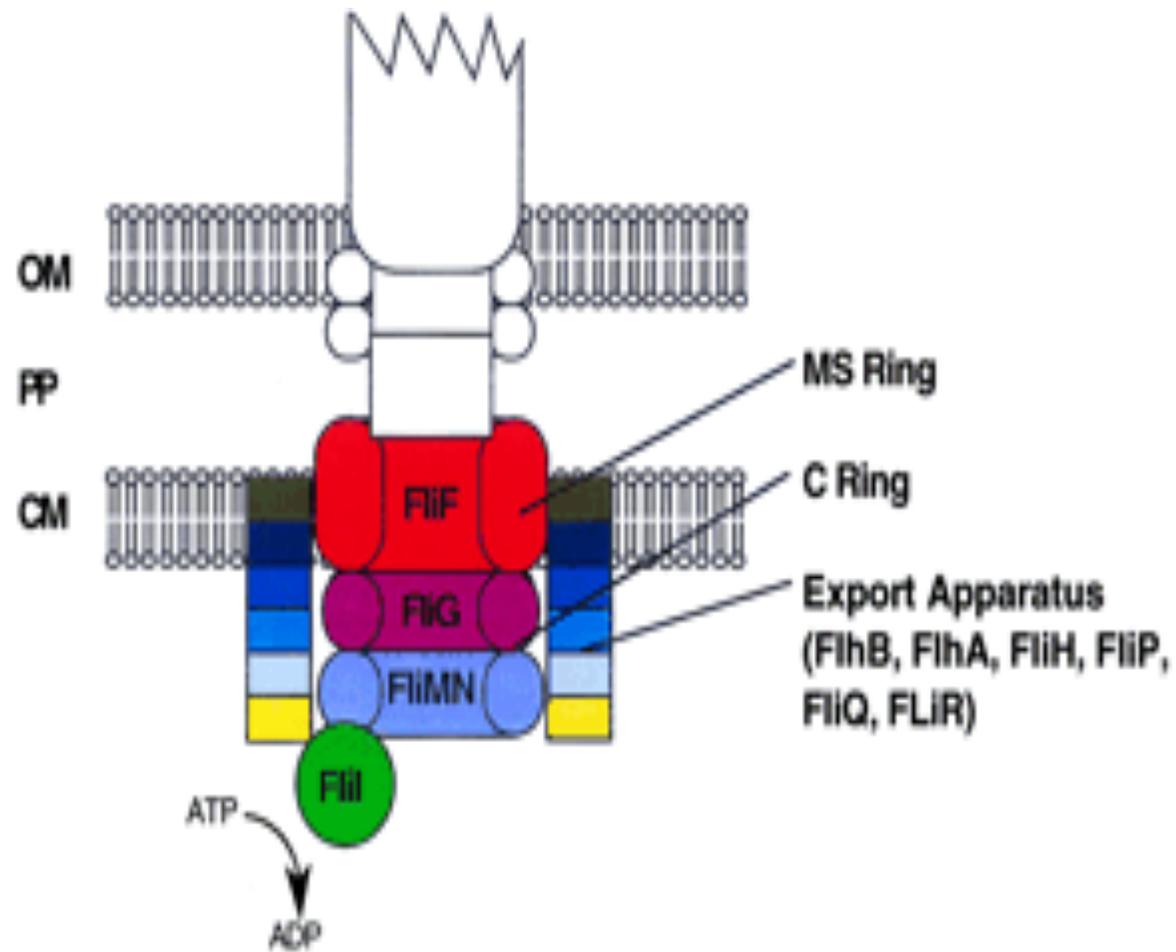
- **Es indispensable el contacto bacteria/célula huésped (gatillo de la secreción)**

Proteínas Intimina y Tir de las cepas EPEC y EHEC

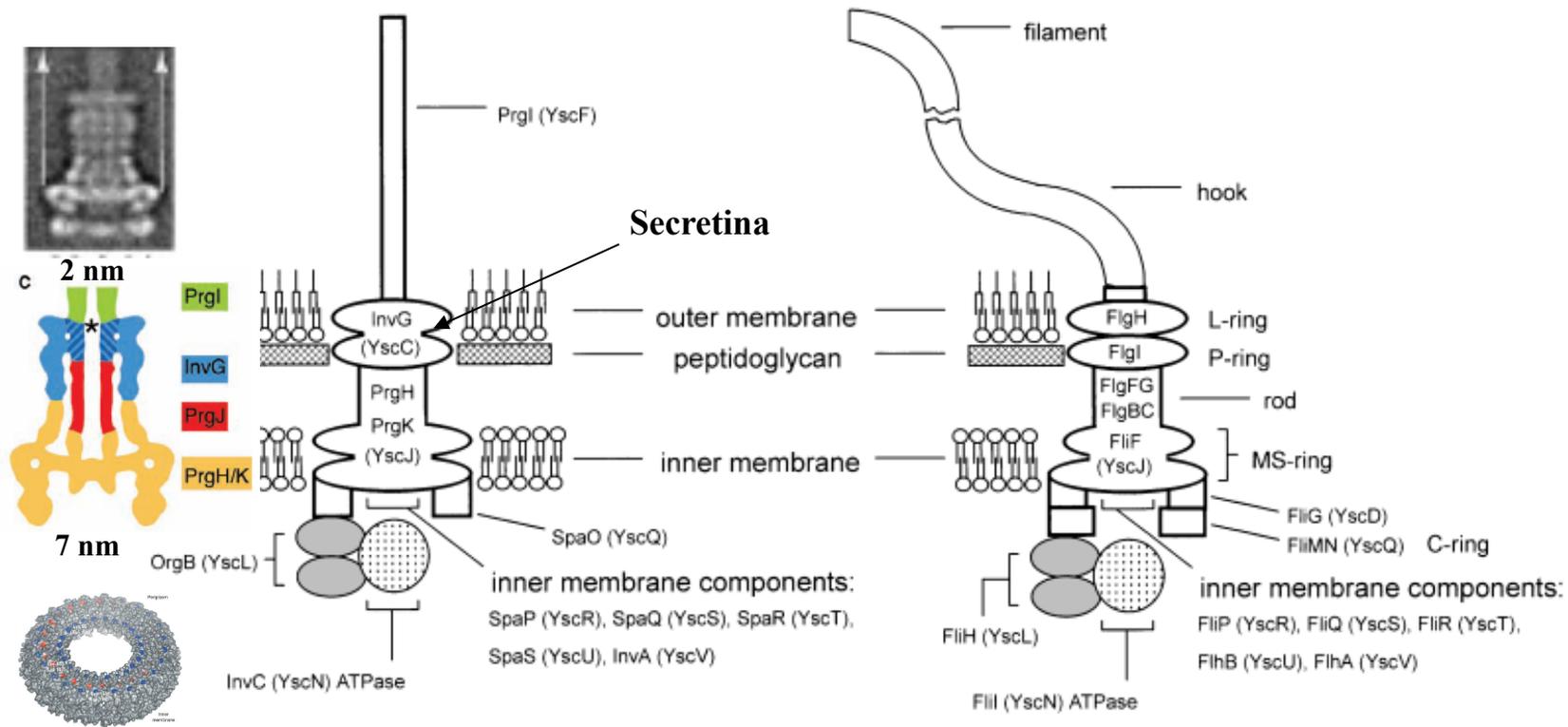




➔ **Modulación de las funciones celulares del huésped para sacar ventajas**



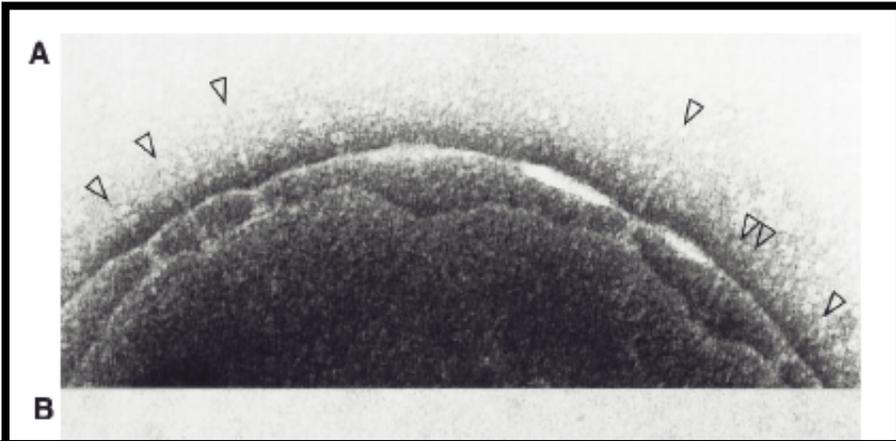
Similitud entre el T3SS de virulencia y el aparato flagelar (Fla) (*Salmonella typhimurium*)



T3SS primero?

Fla primero?

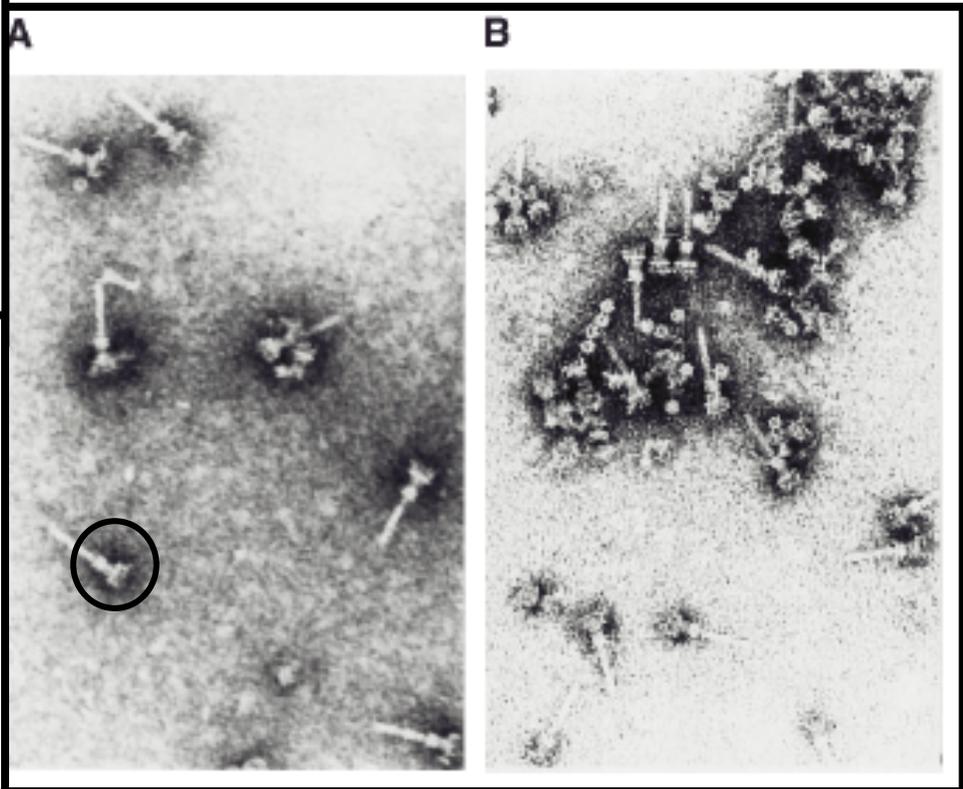
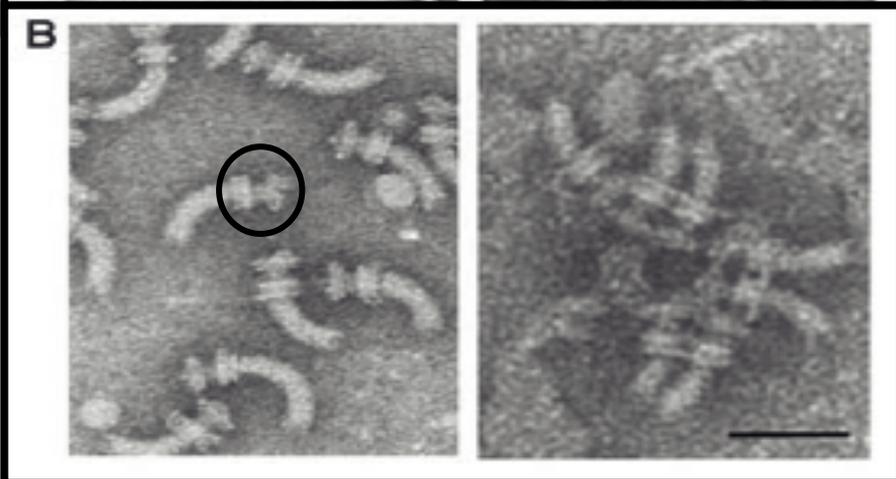
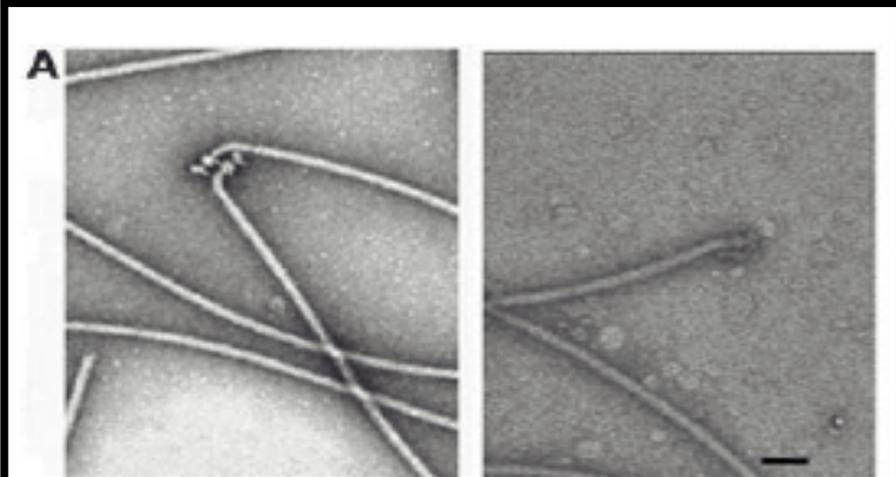
Un mecanismo ancestral común para reconocer el sustrato y exportarlo?

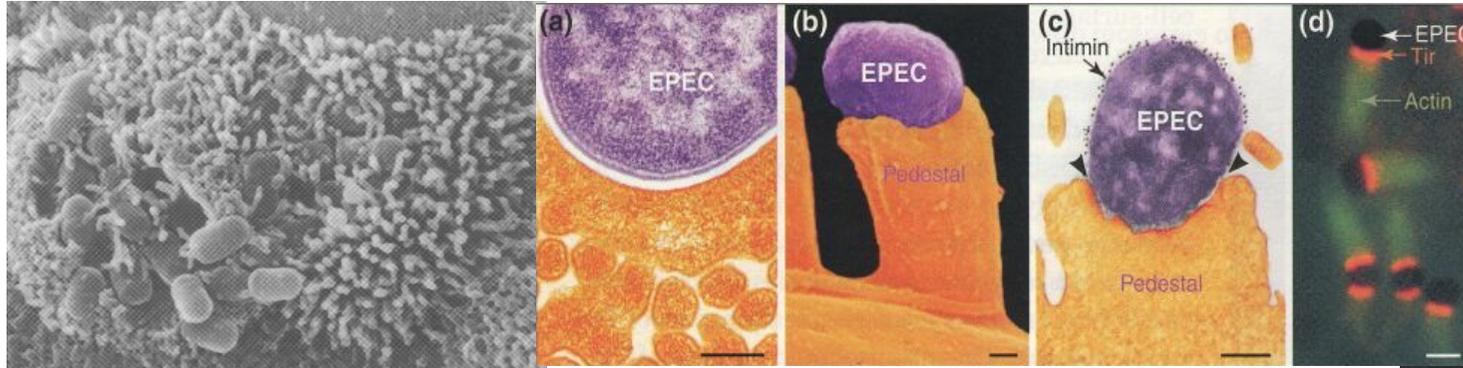


“The needle”

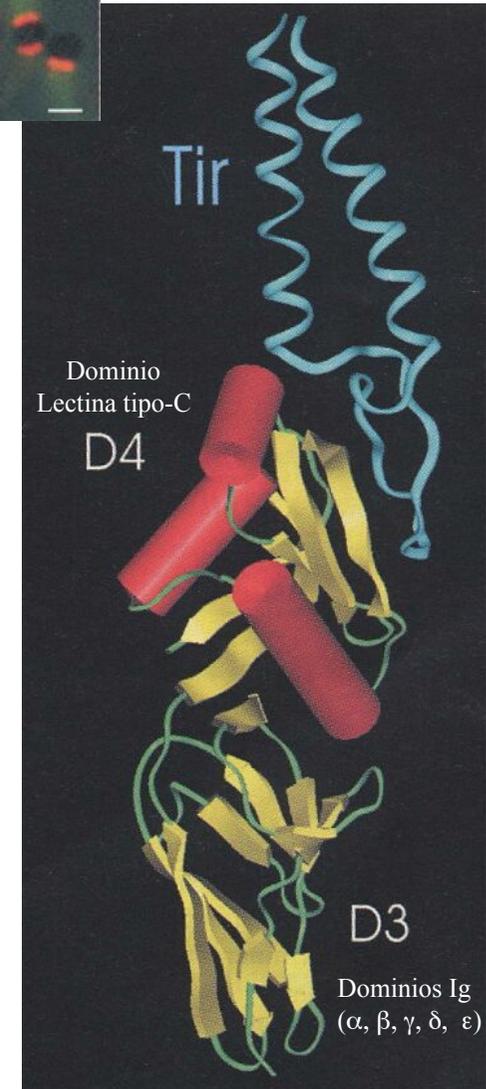
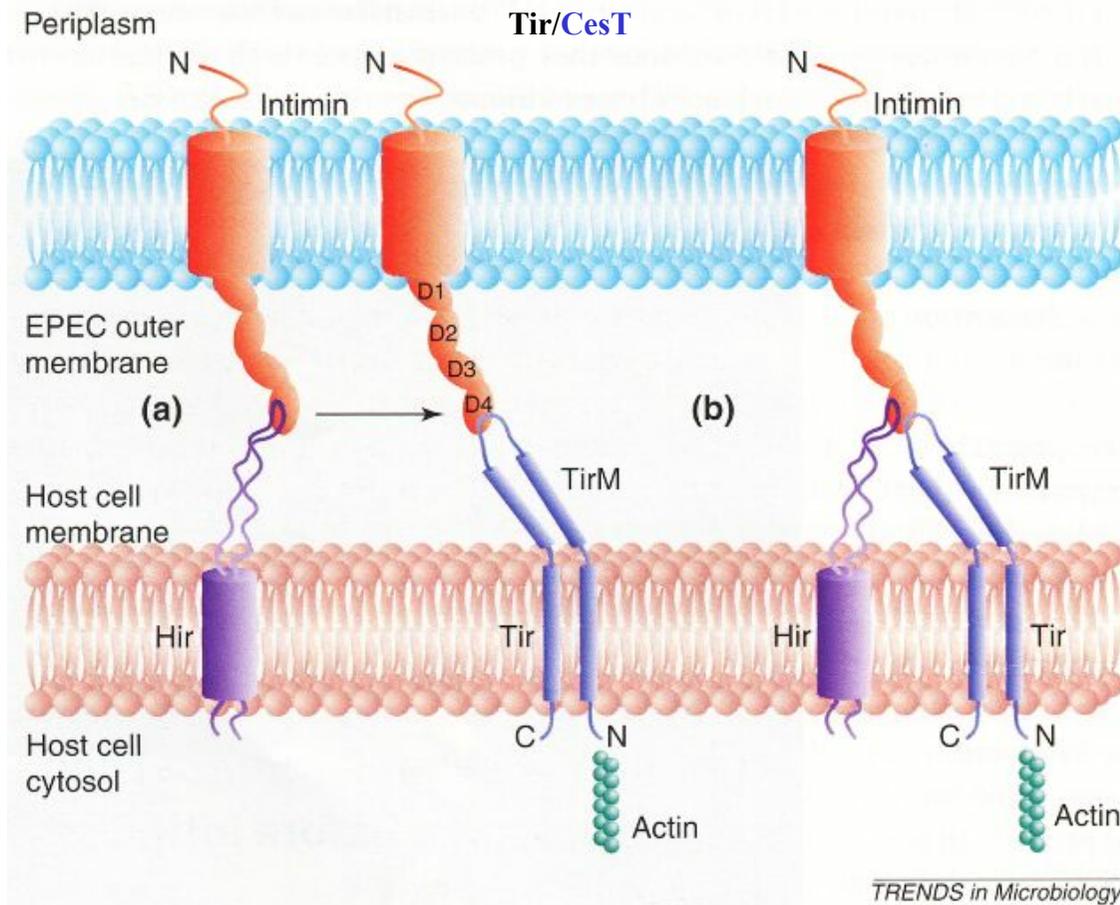
1998. Science, 280, pp602-605

Salmonella typhimurium $\Delta FhlC$

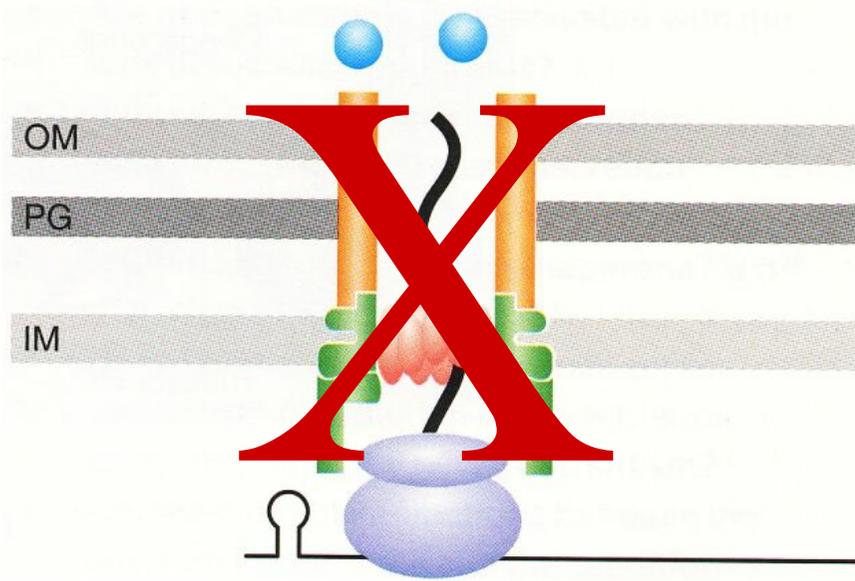




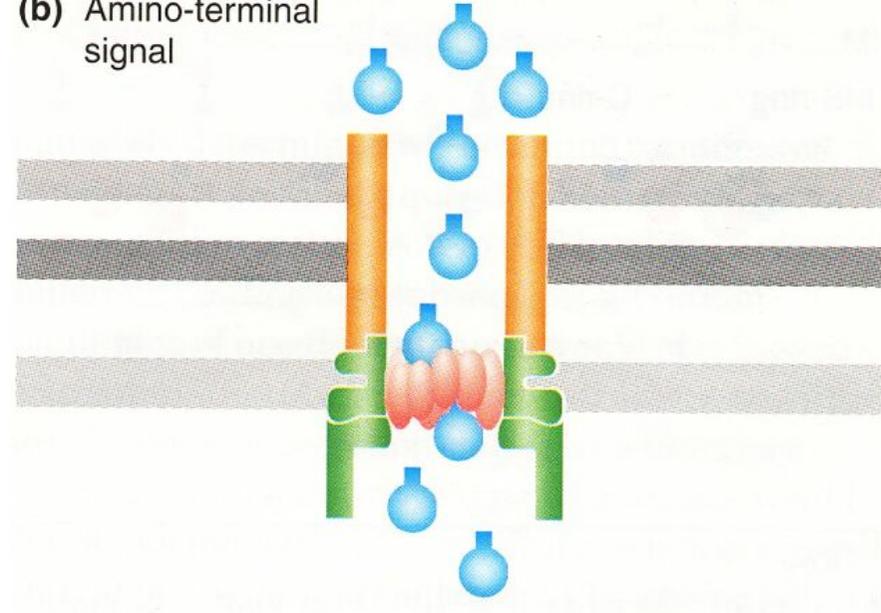
**Intima (90 kDa)
y
sus receptores**



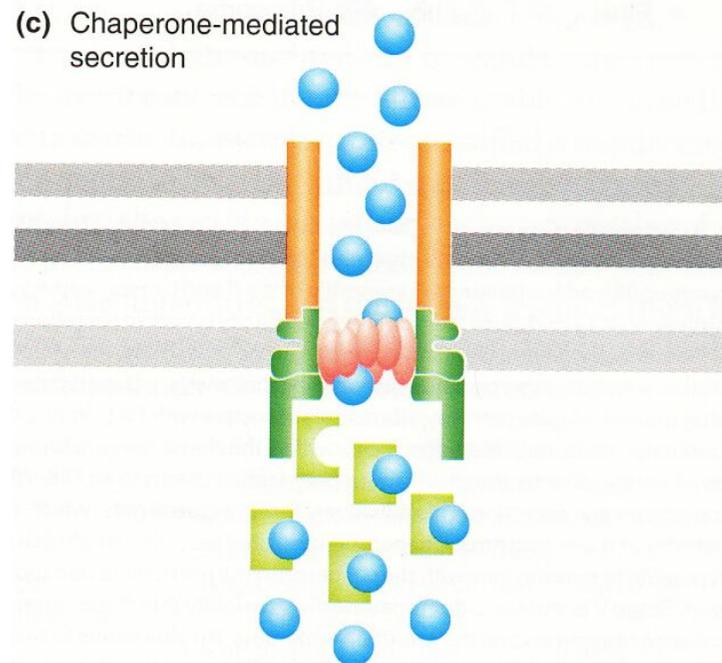
(a) mRNA signal



(b) Amino-terminal signal



(c) Chaperone-mediated secretion



señales

LA VIA DE SECRECION DE TIPO IV

➤ **Inicialmente caracterizada en el fitopatógeno *Agrobacterium tumefaciens***

Transferencia por parte del plasmidio Ti en la célula vegetal.

El operón *virB* (9.5 Kb) codifica los componentes de la maquinaria de secreción.

➤ **Similitudes con las proteínas Tra involucradas en la conjugación bacteriana**

Transferencia de los plasmidios con grande especificidad de huésped:

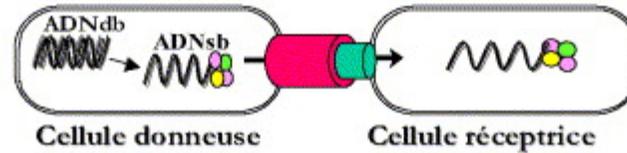
grupos de incompatibilidad IncN, IncP, IncQ, IncW.

➤ **Estructura oligomérica (un poro) que cruza ambas membranas**

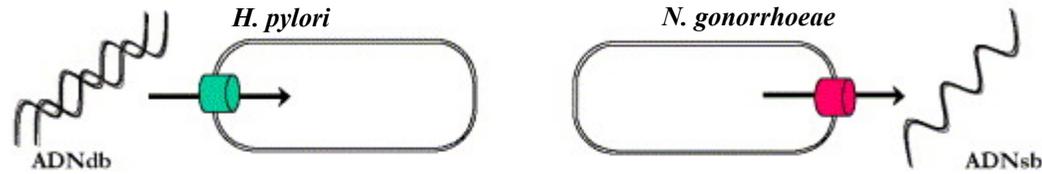
Salida de un complejo nucleoproteico simple hebra (5').

La señal de la salida del DNA se debe a la(s) proteína(s) asociada(s).

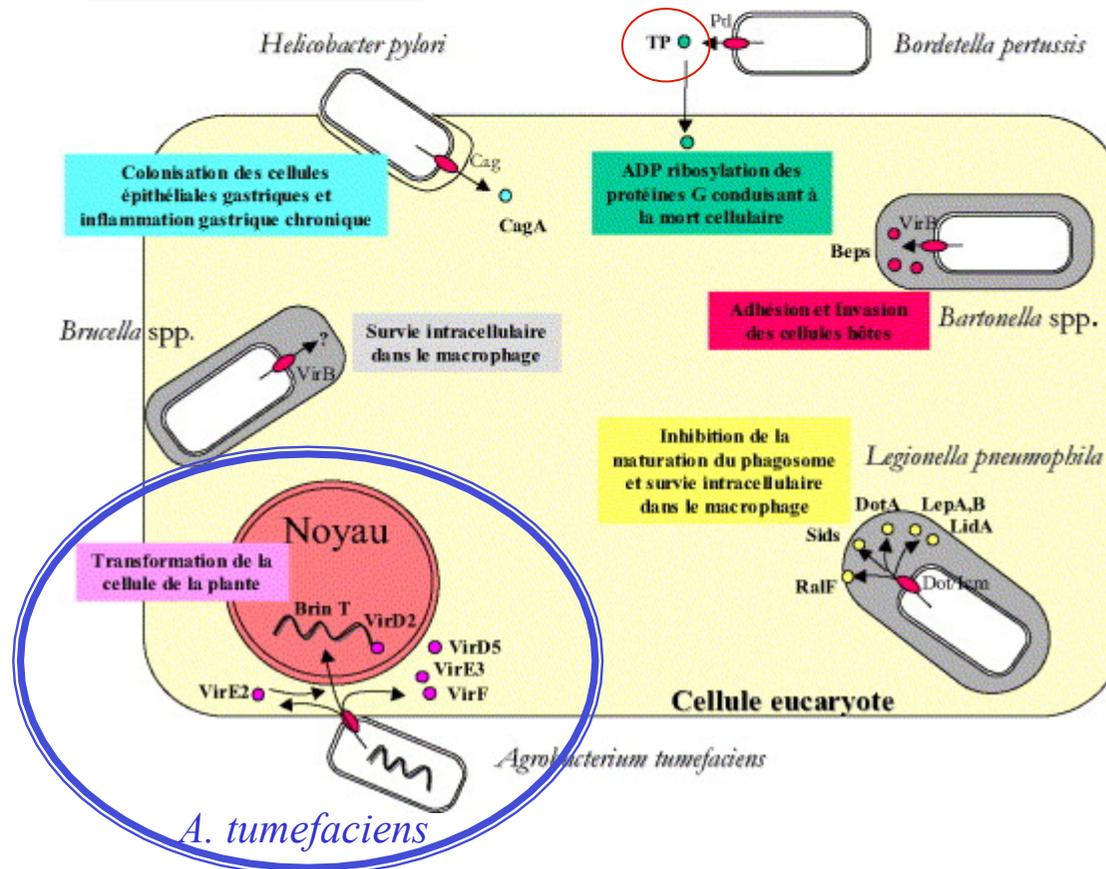
A. Conjugation bactérienne

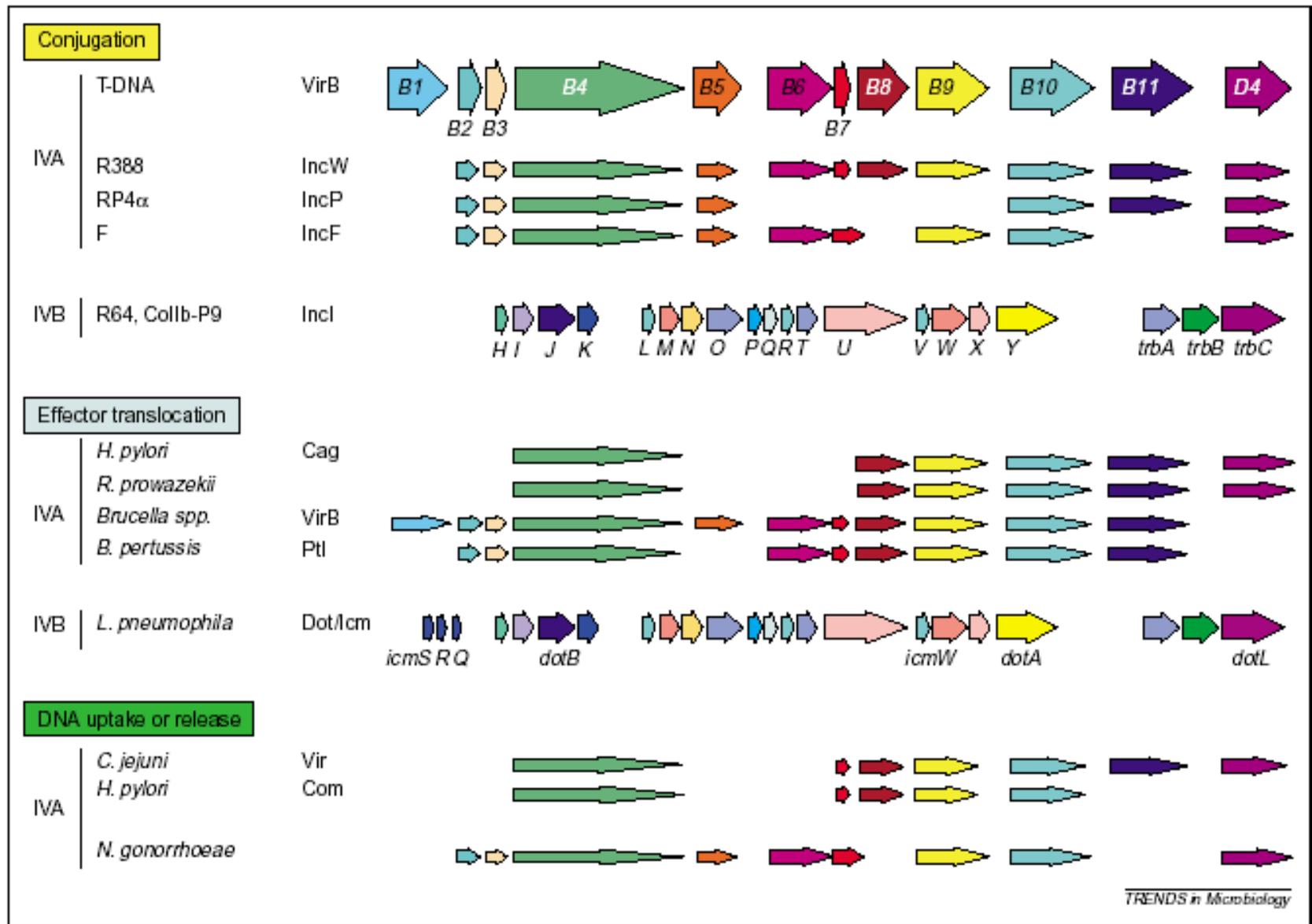


B. Compétence et libération de ADN



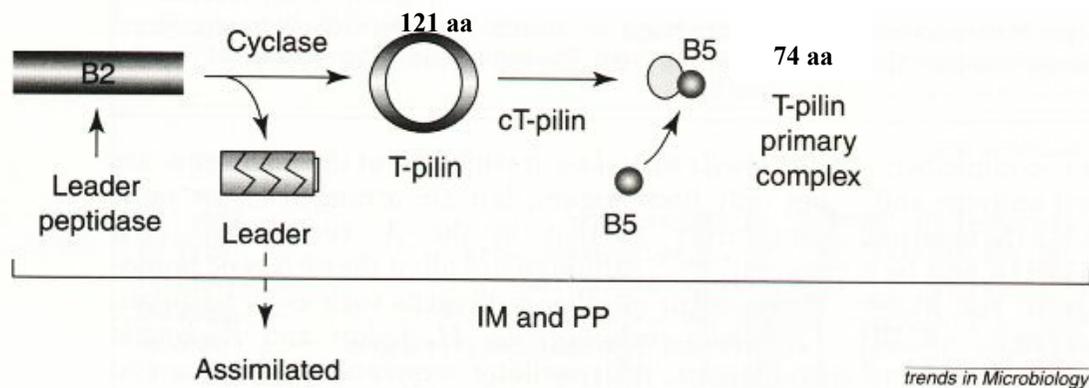
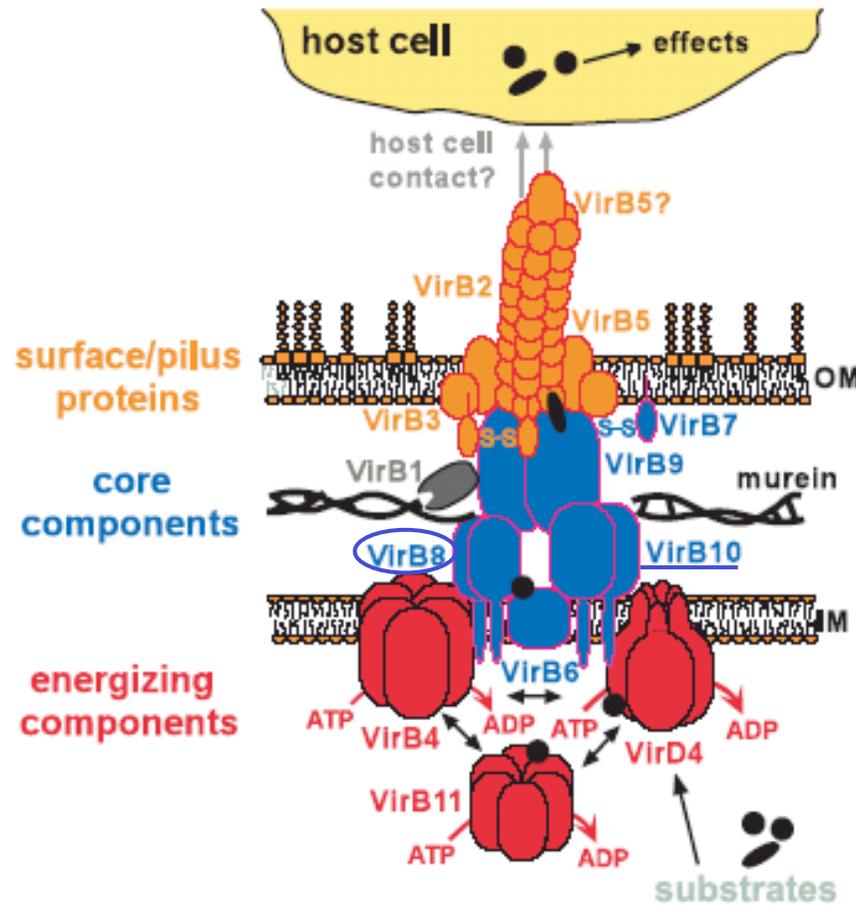
C. Secréation de effectores

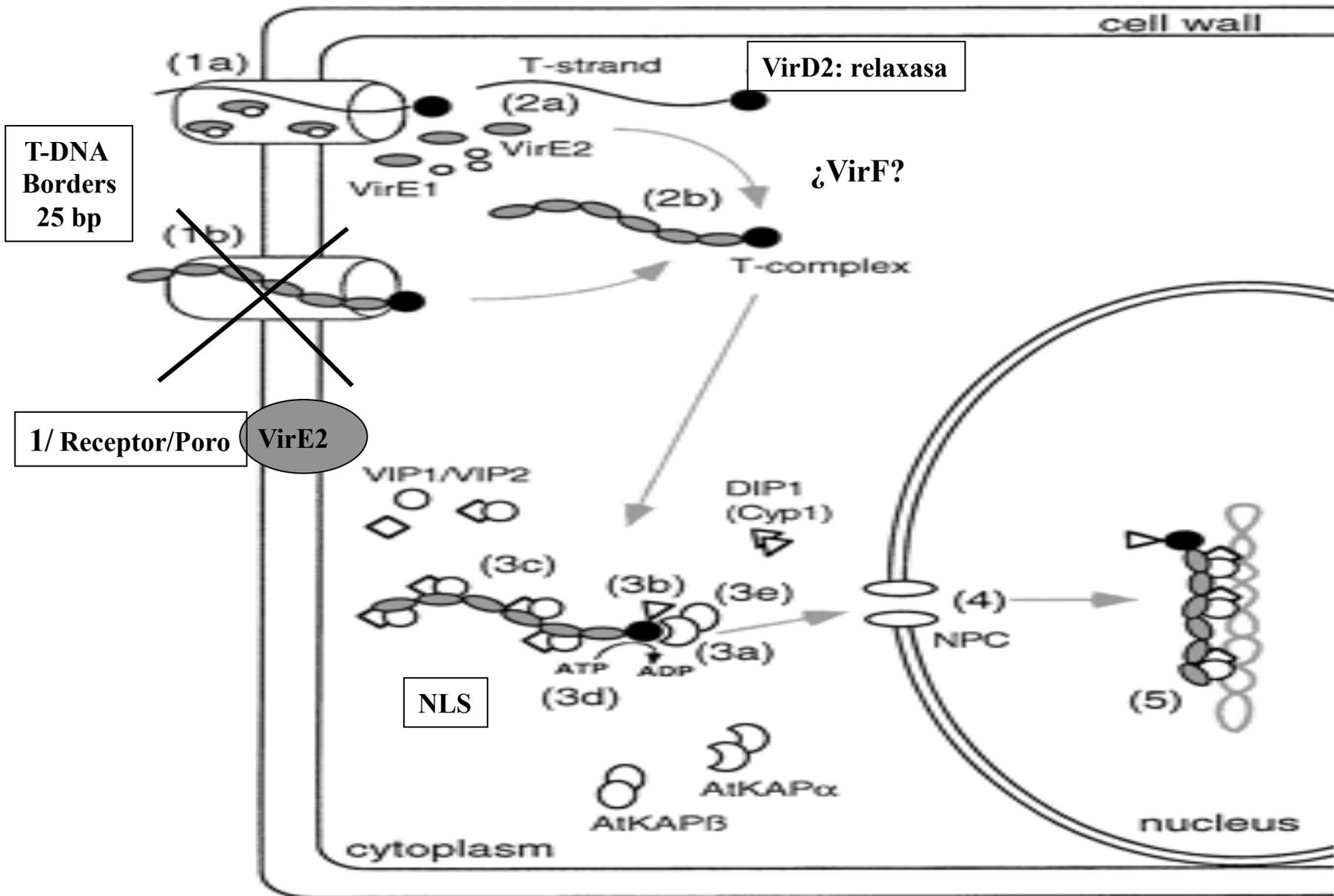




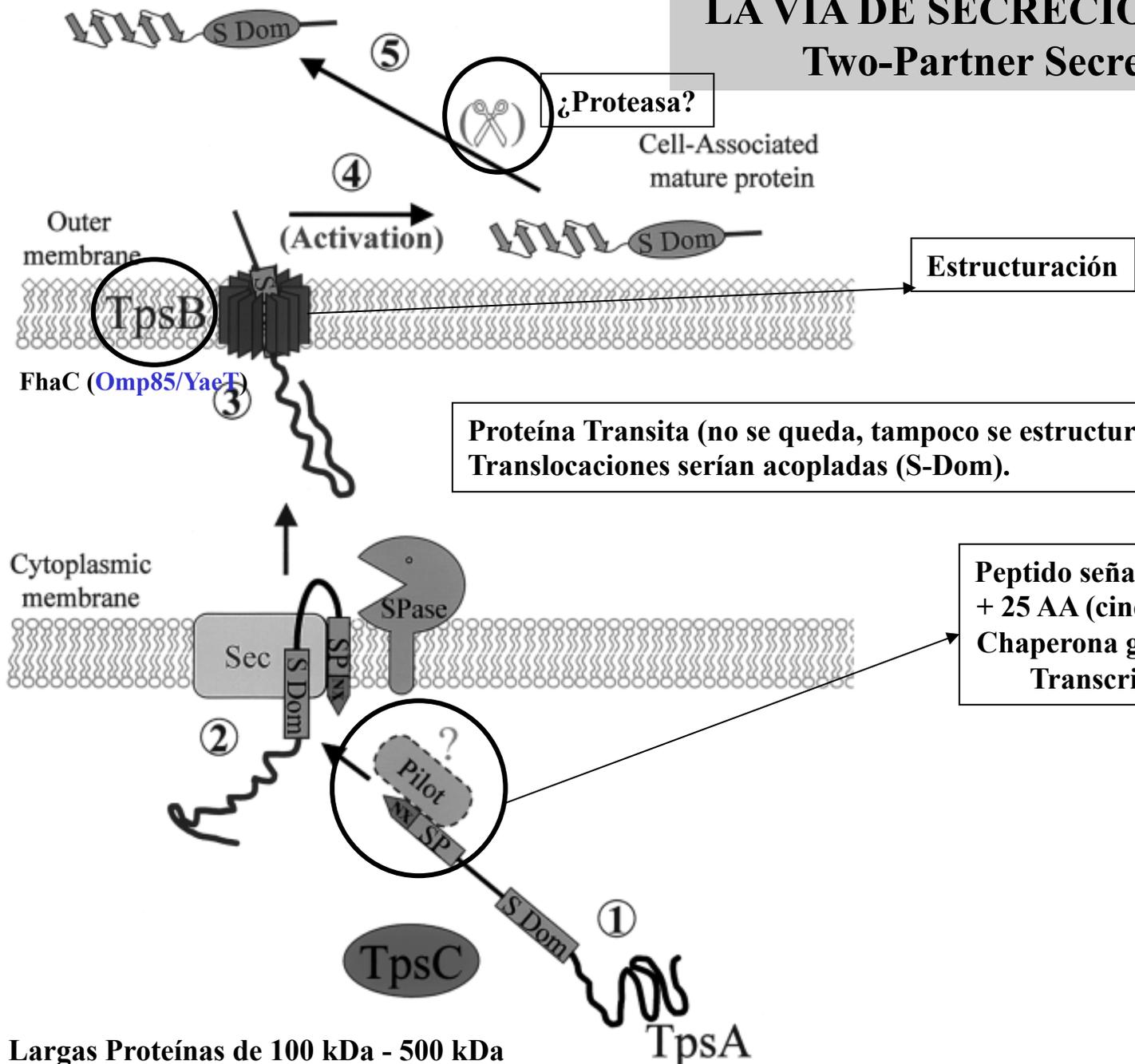
Proposed functions	Location	Properties/interactions	Related proteins
Substrate presentation VirC4 coupling protein	Integral IM	Putative ATPase; required for T-strand/VirD2 and VirE2 export, not for T-pilus assembly; relaxosome specificity	RP4 TraG R388 TrwB F TraD H. pyl. Orf10
VirE1 chaperone	Cytoplasmic	Required for VirE2 export, stabilizes VirE2, interacts with internal domain of VirE2	
VirC1/VirC2	IM	Required for VirD2-T-strand export, VirC1 related to ParA proteins	
Translocation Energetics VirB4	Integral IM	ATPase; self-assembles, role in substrate export	F TraC
VirB11	Peripheral IM	ATPase; self-assembles via N- and C-terminal domains; interacts with other VirB proteins; possible chaperone/morphogenetic function	H. pyl. CagE RP4 TrbB, H. pylori HP0525, and R388TrwD RP4
Mating channel VirB1	IM, PP, OM	Putative transglycosylase, contributes to channel assembly	F orf169
VirB6	Polytopic IM	Evidence for stabilization of VirB3, VirB5 and other VirB proteins; possible IM pore component	
VirB7	OM	Lipoprotein, VirB7-VirB7, VirB7-VirB9 interactions	B. pert. PtlI
VirB8	IM	VirB7-VirB9 heterodimer stabilizes other VirB proteins	
VirB9	OM	Assembly factor important for positioning of VirB9 and VirB10; VirB8-VirB9, VirB8-VirB10 interactions	B. pert. PtlF
VirB10	Bitopic IM	VirB7-VirB9 stabilizing activity, VirB9-VirB8, VirB9-VirB9, VirB9-VirB10 interactions	
		Links IM to OM VirB7-VirB9 complex, VirB10-VirB10, VirB10-VirB9, VirB10-VirB9 interactions	RP4 F
Attachment VirB1*	Exocellular	C-terminal 73-residue processed form of VirB1, VirB1*-VirB9, adhesion. Contributes to T-pilus formation	
VirB2	IM, OM, Exocellular	Pilin, processed by SP1 (?) from 12 to 7 kDa, cyclizes via N-C peptide bond	RP4 TrbC F TraA F TraN
VirB3 VirB5	OM IM, PP, OM, Exocellular	Stabilized by VirB4, VirB6 Stabilized by VirB6; possible chaperone Minor pilin subunit	

T4S Apparatus





LA VIA DE SECRECION DE TIPO Vb Two-Partner Secretors (TPS)

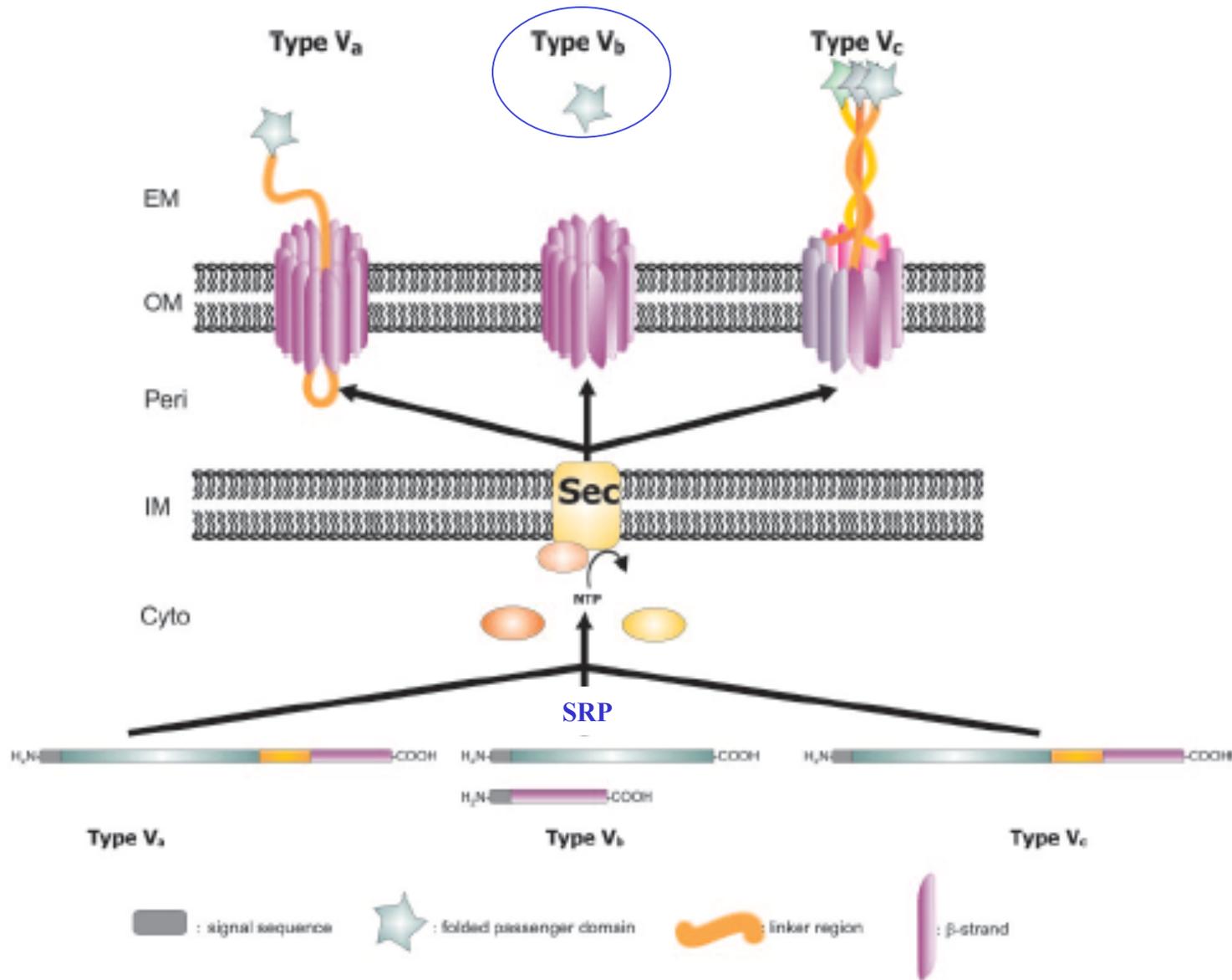


Largas Proteínas de 100 kDa - 500 kDa
ej. Hemolisina/Citolisina/Adesina

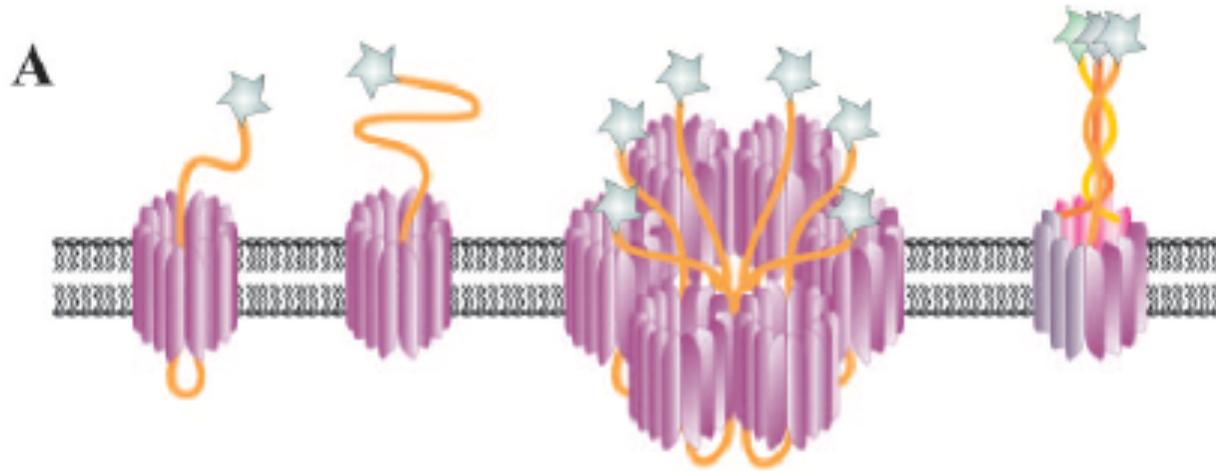
FHA (Haemaglutina filamentosa)

Francoise Jacob-Dubuisson, 2001

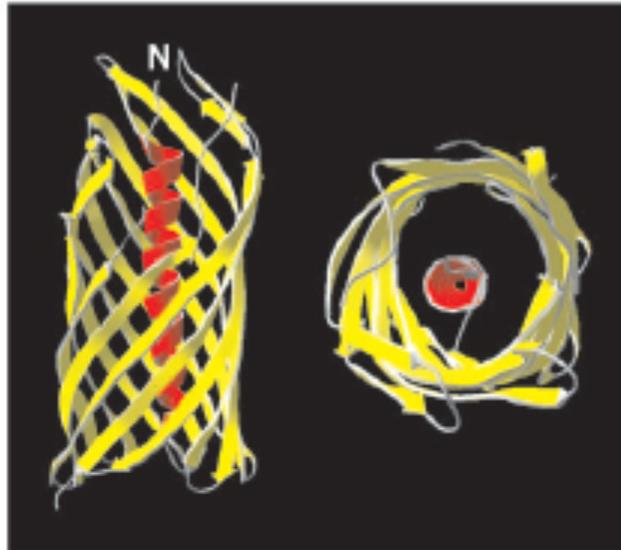
LA VIA DE SECRECION DE TIPO V



T5SS y translocación de la ME

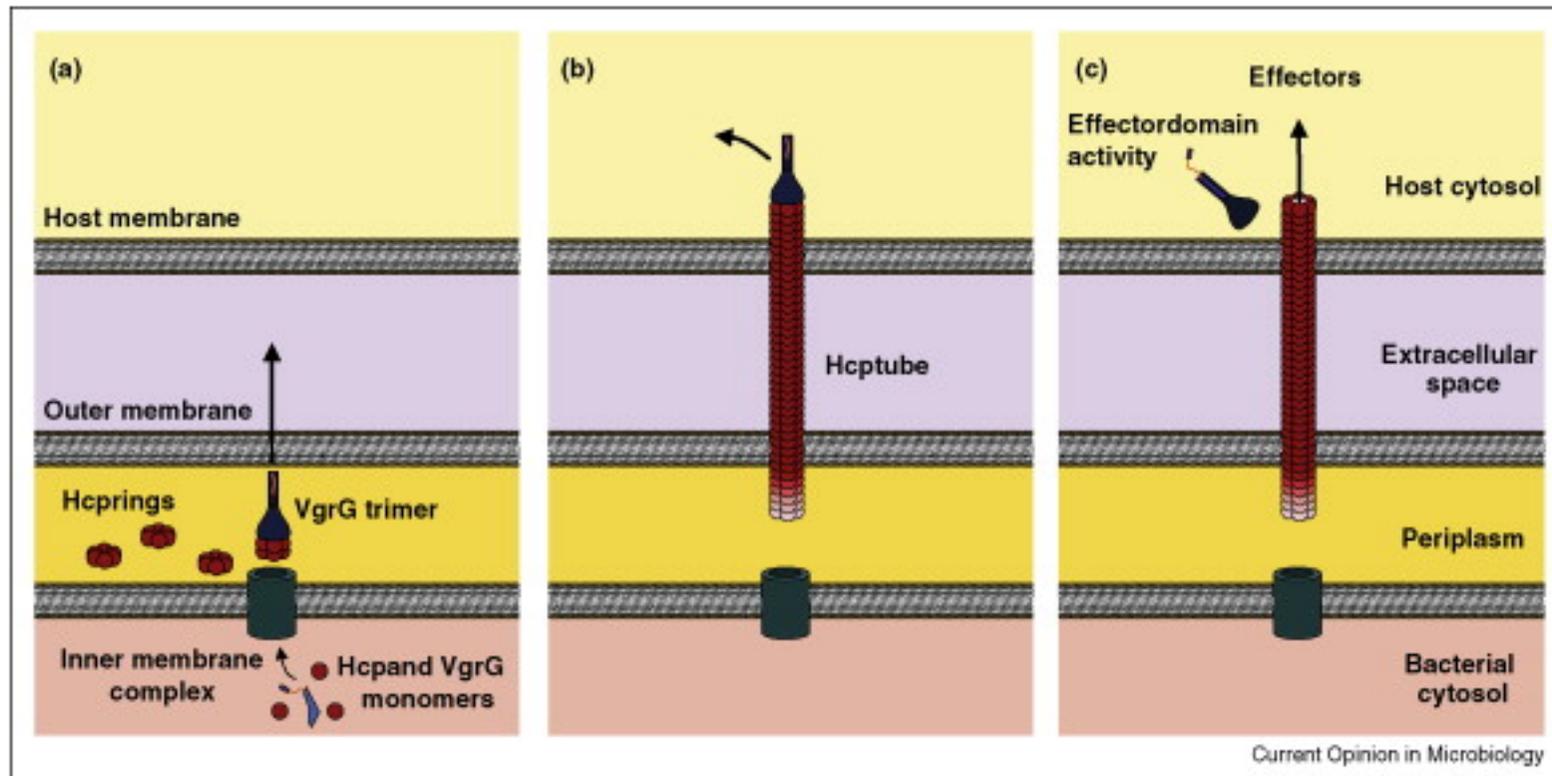


B



**C-ter del dominio pasajero (“junctions”)
Involucrado en “folding” y secreción.**

MODELO FUNCIONAL DE LA VIA DE SECRECION DE TIPO VI



“The next great task will be to identify new effector molecules, characterize those presented here, and determine if these molecules indeed pass through a T6SS conduit to reach the host cytosol.” Stephan Pukatzki et al., 2009

SOMICH 2011. Dr. Carlos Blondel. “Impacto de los Sistemas de Secreción de Tipo VI en la evolución y adaptación de *Salmonella*”. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.

Blondel CJ, Yang HJ, Castro B, Chiang S, Toro CS, Zaldívar M, Contreras I, Andrews-Polymenis HL, Santiviago CA. Contribution of the type VI secretion system encoded in SPI-19 to chicken colonization by *Salmonella enterica* serotypes Gallinarum and Enteritidis. PLoS One.

LA VIA DE SECRECIÓN DE TIPO VII

EN CONSTRUCCIÓN

¿Debe o no debe llamarse así?