

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 754 508**

(51) Int. Cl.:

**C07K 14/195** (2006.01)  
**C12N 15/70** (2006.01)  
**C12N 15/74** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2015 PCT/EP2015/061086**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **26.11.2015 WO15177197**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2015 E 15725282 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.08.2019 EP 3145946**

---

(54) Título: **Transporte de proteínas basado en bacterias**

(30) Prioridad:

**21.05.2014 EP 14169335**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**17.04.2020**

(73) Titular/es:

**UNIVERSITÄT BASEL (100.0%)  
Petersgraben 35  
4003 Basel, CH**

(72) Inventor/es:

**ARRIEUMERLOU, CÉCILE y  
ITTIG, SIMON**

(74) Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 754 508 T3**

---

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Transporte de proteínas basado en bacterias

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere a cepas bacterianas Gram-negativas recombinantes y a su uso para el transporte de proteínas heterólogas hacia el interior de células eucariotas.

**Antecedentes de la invención**

Se han aplicado técnicas de transfección transitoria en investigaciones biológicas de células durante muchos años para estudiar las funciones de proteínas. Estos métodos, en general, provocan una sobrerepresentación enorme de la proteína que se está estudiando, lo cual puede conducir a modelos de señalización simplificados en exceso [1].

Para las proteínas que controlan procesos de señalización de vida corta, la proteína de interés está presente durante mucho más tiempo que el acontecimiento de señalización que controla [2]. Aún más, la sobreexpresión transitoria basada en la transfección de ADN conduce a una población celular heterogénea y no sincronizada que complica los estudios funcionales y obstaculiza las estrategias de ómicas. Además de esto, el aumento de escala de estos ensayos a una escala mayor es muy caro. Algunos de los puntos mencionados anteriormente son contemplados por las técnicas existentes, tales como la microinyección o la proteofeción de proteínas purificadas, la estrategia de translocación inducible para dirigir rápidamente GTPasas pequeñas surgidas de plásmidos hacia la membrana celular [2] o la adición de proteínas purificadas condensadas a toxinas bacterianas que pueden permear células [3]. Pero estas técnicas requieren de mucho tiempo y son difíciles de practicar y, por lo que saben los inventores, ninguna cumple todos los criterios mencionados.

Las bacterias han desarrollado diferentes mecanismos para inyectar directamente proteínas en células diana [4]. El sistema de secreción de tipo III ("type III secretion system", T3SS) usado por bacterias tales como *Yersinia*, *Shigella* y *Salmonella* [5] actúa como una nanojeringa que inyecta las llamadas proteínas efectoras en células hospedantes. Las proteínas bacterianas que se segregan a través del T3SS, denominadas efectores, portan una señal de secreción N-terminal corta [6]. Dentro de la bacteria, algunos efectores son unidos por chaperonas. Las chaperonas pueden ocultar dominios tóxicos [7], contribuyen a la exposición de la señal de secreción [8, 9] y mantienen los sustratos en una conformación competente para la secreción [10], facilitando con ello la secreción. Tras la inducción de la secreción, una ATPasa adyacente al T3SS retira las chaperonas [11] y los efectores viajan sin plegar o solo parcialmente plegados a través de la aguja [10], y se repliegan cuando llegan en el citoplasma del hospedante.

El T3S se ha utilizado para transportar proteínas y péptidos híbridos al interior de células diana. Se han transportado efectores de T3SS bacterianos heterólogos en casos en que la bacteria que se está estudiando es prácticamente inaccesible usando medios genéticos (tal como *Chlamydia trachomatis* [12]). A menudo, las proteínas indicadoras se condensan con posibles señales de secreción de T3SS para estudiar los requisitos para el transporte de proteínas dependiente de T3SS, tal como la adenilato ciclase de *Bordetella pertussis* [13], la DHFR murina o un marcador fosforilable [14]. El transporte de péptidos se ha realizado principalmente con el objetivo de la vacunación. Esto incluye epitopos víricos [15,16], epitopos bacterianos (listeriolisina O [17]), así como péptidos que representan epitopos de células de cáncer humano [18]. En algunos casos se han transportado proteínas eucariotas funcionales para modular la célula hospedante, tal como se ha realizado con nanocuerpos [19], proteínas nucleares (recombinasa Cre, MyoD) [20, 21] o IL10 e IL1ra [22]. Ninguno de los sistemas mencionados anteriormente permite el transporte de una única proteína, puesto que, en todos los casos, siguen codificándose una o múltiples proteínas efectoras endógenas. Además, los vectores usados no se han diseñado de modo que permitan la simple clonación de otros fragmentos de ADN que codifican proteínas seleccionadas, lo cual dificulta la aplicación amplia del sistema. El documento WO2008/019183 A2 describe el uso de *Salmonella typhimurium* SL1344 y SptP como señal de transporte para la expresión de proteínas de la seda. Las proteínas de la seda que se van a expresar han sido optimizadas para la expresión en bacterias. El documento US2008/0187520 A1 describe el uso de *Pseudomonas aeruginosa* y ExoS como señal de transporte para la expresión y la secreción de proteínas. El nivel de proteínas inyectadas obtenido es comparable al nivel endógeno de estas proteínas.

Por tanto, un método barato y simple que permita el transporte escalable, rápido, sincronizado, homogéneo y adaptado de una proteína de interés a concentraciones fisiológicas sería muy beneficioso para muchos biólogos celulares.

**Sumario de la invención**

La presente invención se refiere en general a cepas bacterianas Gram-negativas recombinantes y a su uso para el transporte de proteínas heterólogas hacia el interior de células eucariotas. La presente invención proporciona cepas bacterianas Gram-negativas y su uso, que permiten la translocación de diversos efectores de tipo III, pero también efectores de tipo IV, de proteínas víricas y, de modo más importante, de proteínas eucariotas funcionales. Se proporcionan medios para el seguimiento fluorescente del transporte, para la relocalización al núcleo y, de modo notable, para la retirada del apéndice bacteriano después del transporte hasta la célula hospedante. Esto permite, por primera vez, el transporte de proteínas casi nativas al interior de células eucariotas usando solo un T3SS. El sistema basado en T3SS presentado permite lograr el transporte escalable, rápido, sincronizado, homogéneo y

adaptado de una proteína de interés. El sistema de transporte de la presente invención es adecuado para inyectar proteínas eucariotas en animales vivos y puede usarse para fines terapéuticos.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una cepa bacteriana Gram-negativa recombinante transformada con un vector, que comprende, en la dirección 5' a 3':

- 5 un promotor;
- una primera secuencia de ADN que codifica una secuencia de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana, unida operablemente a dicho promotor, en la que la proteína efectora de T3SS bacteriana se selecciona del grupo que consiste en SopE, SteA y YopE;
- 10 una segunda secuencia de ADN que codifica una proteína heteróloga condensada dentro de marco al extremo 3' de dicha primera secuencia de ADN, en la que la proteína heteróloga se selecciona del grupo que consiste en proteínas implicadas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis, reguladores del ciclo celular, proteínas de repetición de anquirina, proteínas indicadoras, GTPasas pequeñas, proteínas relacionadas con GPCR, construcciones de fusión de nanocuerpos, efectores de T3SS bacterianos, efectores de T4SS bacterianos y proteínas víricas; y opcionalmente, una tercera secuencia de ADN que codifica un sitio de ruptura de proteasa, en la que la tercera secuencia de ADN está localizada entre el extremo 3' de dicha primera secuencia de ADN y el extremo 5' de dicha segunda secuencia de ADN, en la que en la que la cepa bacteriana Gram-negativa es una cepa de *Yersinia*, y la señal de transporte procedente de la proteína efectora de T3SS bacteriana codificada por la primera secuencia de ADN comprende la proteína efectora Yop3, o un fragmento N-terminal de esta, en la que el fragmento N-terminal incluye al menos los primeros 20 aminoácidos de la proteína efectora YopE, o en la que la cepa bacteriana Gram-negativa es una cepa de *Salmonella*, y la señal de transporte procedente de la proteína efectora de T3SS bacteriana codificada por la primera secuencia de ADN comprende la proteína efectora SopE o SteA, o un fragmento N-terminal de estas, en la que el fragmento N-terminal incluye al menos los primeros 20 aminoácidos de la proteína efectora SopE o SteA.
- 15 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una cepa bacteriana Gram-negativa recombinante, en la que la cepa bacteriana Gram-negativa es una cepa de *Yersinia*, y en la que dicha cepa de *Yersinia* es de tipo salvaje o es deficiente en la producción de al menos una proteína efectora de T3SS, y está transformada con un vector que comprende, en la dirección 5' a 3':
- 20 un promotor;
- una primera secuencia de ADN que codifica una señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS, en la que la señal de transporte procedente de la proteína efectora de T3SS comprende los 138 aminoácidos N-terminales de la proteína efectora YopE de *Y. enterocolitica*, unidos operablemente a dicho promotor; y
- 25 una segunda secuencia de ADN que codifica una proteína heteróloga condensada dentro de marco al extremo 3' de dicha primera secuencia de ADN, en la que la proteína heteróloga se selecciona del grupo que consiste en proteínas implicadas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis, reguladores del ciclo celular, proteínas de repetición de anquirina, proteínas indicadoras, GTPasas pequeñas, proteínas relacionadas con GPCR, construcciones de fusión de nanocuerpos, efectores de T3SS bacterianos, efectores de T4SS bacterianos y proteínas víricas.
- 30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a una cepa bacteriana Gram-negativa recombinante, en la que la cepa bacteriana Gram-negativa es una cepa de *Salmonella*, y en la que dicha cepa de *Salmonella* es de tipo salvaje o es deficiente en la producción de al menos una proteína efectora de T3SS, y está transformada con un vector que comprende, en la dirección 5' a 3':
- 35 un promotor;
- una primera secuencia de ADN que codifica una señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS, en la que la señal de transporte procedente de la proteína efectora de T3SS comprende la proteína efectora SteA de *S. enterica* o los 81 o 105 aminoácidos N-terminales de la proteína efectora SopE de *S. enterica*, unidos operablemente a dicho promotor; y
- 40 una segunda secuencia de ADN que codifica una proteína heteróloga condensada dentro de marco al extremo 3' de dicha primera secuencia de ADN, en la que la proteína heteróloga se selecciona del grupo que consiste en proteínas implicadas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis, reguladores del ciclo celular, proteínas de repetición de anquirina, proteínas indicadoras, GTPasas pequeñas, proteínas relacionadas con GPCR, construcciones de fusión de nanocuerpos, efectores de T3SS bacterianos, efectores de T4SS bacterianos y proteínas víricas.
- 45 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un vector que comprende, en la dirección 5' a 3':
- un promotor;
- una primera secuencia de ADN que codifica una señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana, unida operablemente a dicho promotor, en la que la proteína efectora de T3SS bacteriana se selecciona

del grupo que consiste en SopE, SteA y YopE;

una segunda secuencia de ADN que codifica una proteína heteróloga condensada dentro de marco al extremo 3' de dicha primera secuencia de ADN, en la que la proteína heteróloga se selecciona del grupo que consiste en proteínas implicadas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis, reguladores del ciclo celular, proteínas de repetición de

5 anquirina, proteínas indicadoras, GTPasas pequeñas, proteínas relacionadas con GPCR, construcciones de fusión de nanocuerpos, efectores de T3SS bacterianos, efectores de T4SS bacterianos y proteínas víricas;

y una tercera secuencia de ADN que codifica un sitio de ruptura de proteasa, en la que la tercera secuencia de ADN está localizada entre el extremo 3' de dicha primera secuencia de ADN y el extremo 5' de dicha segunda secuencia de ADN.

10 La presente invención se refiere además a un método para transportar una proteína heteróloga hacia el interior de una célula eucariota, que comprende las siguientes etapas:

i) cultivar una cepa bacteriana Gram-negativa; y

15 ii) poner en contacto una célula eucariota con la cepa bacteriana Gram-negativa de i), en el que una proteína de fusión que comprende una señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana y la proteína heteróloga es expresada por la cepa bacteriana Gram-negativa y se transloca hacia el interior de la célula eucariota.

La presente invención se refiere además a un método para transportar una proteína heteróloga hacia el interior de una célula eucariota, que comprende las siguientes etapas:

i) cultivar una cepa bacteriana Gram-negativa;

20 ii) poner en contacto una célula eucariota con la cepa bacteriana Gram-negativa de i) en la que una proteína de fusión que comprende una señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana y la proteína heteróloga es expresada por la cepa bacteriana Gram-negativa y se transloca hacia el interior de la célula eucariota; y

25 iii) romper la proteína de fusión, de modo que la proteína heteróloga se escinde de la señal de transporte procedente de la proteína efectora de T3SS bacteriana.

La presente invención se refiere además a un método para purificar una proteína heteróloga, que comprende cultivar una cepa bacteriana Gram-negativa, de modo que una proteína de fusión que comprende una señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana y la proteína heteróloga se expresa y se segregá hacia el sobrenadante del cultivo.

30 En otro aspecto, la presente invención se refiere a un banco de cepas bacterianas Gram-negativas, en el que la proteína heteróloga codificada por la segunda secuencia de ADN del vector de expresión de las cepas bacterianas Gram-negativas es una proteína humana o murina, en el que cada proteína humana o murina expresada por las cepas bacterianas Gram-negativas tiene una secuencia de aminoácidos diferente.

#### Breve descripción de la figuras

35 Figura 1: Caracterización del transporte de proteínas de T3SS. (A) Representación esquemática de la secreción de proteínas dependiente de T3SS hacia el medio circundante (secreción *in vitro*) (lado izquierdo) o hacia el interior de células eucariotas (lado derecho). I muestra el sistema de secreción de tipo 3. II indica las proteínas segregadas hacia el medio circundante, y III indica las proteínas translúcidas a través de la membrana hacia el citosol de células eucariotas (VII). VI muestra un tramo de las dos membranas bacterianas en las que se inserta el T3SS y el citosol bacteriano subyacente. IV es una proteína de fusión unida al fragmento N-terminal YopE<sub>1-138</sub> (V). (B) Secrección *in vitro* de I: *Y. enterocolitica* E40 de tipo salvaje, II: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd*, o III: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* + pBadSi\_2, según se revela mediante transferencia Western de lisados bacterianos totales (IV) y sobrenadantes del cultivo precipitados (V) usando un anticuerpo anti-YopE.

45 Figura 2: Caracterización del transporte de proteínas de T3SS hacia el interior de células epiteliales. (A) Tinción de inmunofluorescencia anti-Myc de células HeLa infectadas con una MOI ("multiplicity of infection", multiplicidad de infección) de 100 durante 1 h con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd*, o II: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* + pBad\_Si2. (B) Cuantificación de la intensidad de tinción de inmunofluorescencia anti-Myc procedente de (A) dentro de células HeLa. Los datos se combinaron de n = 20 sitios, las barras de error indicadas son el error estándar del promedio. I: no infectadas, II: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd*, o III: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* + pBad\_Si2. El eje de ordenadas indica la intensidad de tinción anti-Myc [unidades arbitrarias], y el eje de abscisas indica el tiempo de infección en minutos. (C) Cuantificación de la intensidad de tinción de inmunofluorescencia anti-Myc dentro de las células. Las células HeLa fueron infectadas durante 1 h con *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* + pBad\_Si2 a una MOI indicada en el eje de abscisas. Los datos se combinaron de n = 20 sitios, las barras de error indicadas son el error estándar del promedio. El eje de ordenadas indica la intensidad de tinción anti-Myc [u.a.].

Figura 3: Las modificaciones del transporte de proteínas basado en T3SS permiten la localización nuclear de una proteína de fusión de YopE<sub>1-138</sub> (EGFP). Señal de EGFP en células HeLa infectadas con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd*, o II: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* ΔyopB que porta los plásmidos. III: +YopE<sub>1-138</sub>-EGFP o IV: +YopE<sub>1-138</sub>-EGFP-NLS a una MOI de 100. La señal de EGFP se muestra en "a", y para la comparación de la localización, los núcleos se tiñeron en "b".

Figura 4: Las modificaciones del transporte de proteínas basado en T3SS permiten la retirada del apéndice YopE<sub>1-138</sub>. Las células HeLa se infectaron con dos cepas diferentes de *Y. enterocolitica* al mismo tiempo, lo cual se logra simplemente mezclando las dos suspensiones bacterianas. Una cepa transporta la proteasa de TEV condensada con YopE<sub>1-138</sub>, mientras que la otra cepa transporta una proteína interés condensada con YopE<sub>1-138</sub> con un conector que contiene un sitio de ruptura de proteasa de TEV doble. Después del transporte de la proteína al interior de la célula eucariota, la proteasa de TEV escindirá el apéndice YopE<sub>1-138</sub> de la proteína de interés. (A) Células HeLa lisadas con digitonina no infectadas (II) o después de la infección (MOI de 100) durante 2 h con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd*, y III: +pBadSi\_2, IV: +YopE<sub>1-138</sub>-2×sitio de ruptura de TEV-Flag-INK4C, V: +YopE<sub>1-138</sub>-2×sitio de ruptura de TEV-Flag-INK4C y también un tratamiento durante la noche con proteasa de TEV purificada, y VI: +YopE<sub>1-138</sub>-2×sitio de ruptura de TEV-Flag-INK4C y una segunda cepa + YopE<sub>1-138</sub>-TEV se analizaron mediante transferencia Western anti-INK4C (mostrado en "a") para detectar la presencia de YopE<sub>1-138</sub>-2×sitio de ruptura de TEV-Flag-INK4C o su forma rota Flag-INK4C. Como control de carga se realizó una transferencia Western antiactina (mostrado en "b"). En un caso (V), las células lisadas se incubaron durante la noche con proteasa de TEV purificada. (B) Cuantificación normalizada a la actina de la intensidad de tinción anti-INK4C (mostrado en [u.a.] en el eje de ordenadas) de (A) el tamaño de YopE<sub>1-138</sub>-2×sitio de ruptura de TEV-Flag-INK4C de longitud completa, en el que la muestra IV se considera 100%. I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd*, y IV: +YopE<sub>1-138</sub>-2×sitio de ruptura de TEV-Flag-INK4C, V: +YopE<sub>1-138</sub>-2×sitio de ruptura de TEV-Flag-INK4C y también un tratamiento durante la noche con proteasa de TEV purificada, y VI: +YopE<sub>1-138</sub>-2×sitio de ruptura de TEV-Flag-INK4C y una segunda cepa + YopE<sub>1-138</sub>-TEV. Se reunieron los datos de n = 2 experimentos independientes, las barras de error indicadas son el error estándar del promedio. (C) Células HeLa lisadas con digitonina no infectadas (II) o después de la infección (MOI de 100) durante 2 h con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd*, y III: +pBadSi\_2, IV: +YopE<sub>1-138</sub>-2×sitio de ruptura de TEV-ET1-Myc, V: +YopE<sub>1-138</sub>-2×sitio de ruptura de TEV-ET1-Myc y también un tratamiento durante la noche con proteasa de TEV purificada, y VI: +YopE<sub>1-138</sub>-2×sitio de ruptura de TEV-ET1-Myc y una segunda cepa + YopE<sub>1-138</sub>-TEV se analizaron mediante transferencia Western anti-Myc (mostrado en "a") para detectar la presencia de YopE<sub>1-138</sub>-2×sitio de ruptura de TEV-ET1-Myc o su forma rota ET1-Myc. Como control de carga se realizó una transferencia Western antiactina (mostrado en "b"). En un caso (V), las células lisadas se incubaron durante la noche con proteasa de TEV purificada.

Figura 5: Transporte de proteínas efectoras bacterianas hacia el interior de células eucariotas. (A) Se infectaron células HeLa con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* que porta II: pBad\_Si2 o III: YopE<sub>1-138</sub>-SopE a una MOI de 100 durante el tiempo indicado encima de las imágenes (2, 10 o 60 minutos). Después de la fijación, las células de tiñeron para el citoesqueleto de actina. (B) Células HeLa no se infectaron (II) o se infectaron con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* que porta III: YopE<sub>1-138</sub>-SopE-Myc, y en algunos casos se coinfectaron con IV: YopE<sub>1-138</sub>-SptP a la MOI indicada bajo de la cepa (MOI 50; MOI50:MOI50 o MOI50:MOI100) durante 1 h. Después de la fijación, las células de tiñeron para el citoesqueleto de actina (mostrado en "a"), y se siguió la presencia de la proteína de fusión YopE<sub>1-138</sub>-SopE-Myc mediante tinción anti-Myc (mostrado en "b").

Figura 6: Transporte de proteínas efectoras bacterianas hacia el interior de células eucariotas. (A) Análisis de la transferencia Western de fosfo-p38 ("a"), p38 total ("b") y actina ("c") de células HeLa no tratadas (II) o infectadas durante 75 min con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* que porta III: pBad\_Si2 o IV: YopE<sub>1-138</sub>-OspF a una MOI de 100. Las células se estimularon con TNFα durante los últimos 30 de la infección como se indica (+ significa la adición de TNFα, - representa que no se ha tratado con TNFα). (B) Análisis de la transferencia Western de fosfo-Akt T308 ("a") y S473 ("b") y actina ("c") de células HeLa no tratadas (II) o infectadas durante 22,5 o 45 min (indicado bajo las transferencias) con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* que porta III: pBad\_Si2, IV: YopE<sub>1-138</sub>-SopE o V: YopE<sub>1-138</sub>-SopB a una MOI de 100. (C) Niveles de AMPc (en fmol/pocillo mostrados en el eje de ordenadas) en células HeLa no tratadas (I) o infectadas durante 2,5 h con V: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* + YopE<sub>1-138</sub>-BepA, VI: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* + YopE<sub>1-138</sub>-BepA<sub>E305-end</sub>, VII: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* + YopE<sub>1-138</sub>-BepG<sub>Bid</sub> o VIII: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* + pBad\_Si2 a una MOI de 100. Se añadió la toxina del cólera ("cholera toxin", CT) durante 1 h como control positivo a las muestras II (1 µg/ml), III (25 µg/ml) o IV (50 µg/ml). Los datos se combinaron de n = 3 experimentos independientes, las barras de error indicadas son el error estándar del promedio. Se realizaron análisis estadísticos usando un ensayo de la t de dos colas desapareado (ns indica un cambio no significativo, \*\* indica un valor de p <0,01, \*\*\* indica un valor de p <0,001).

Figura 7: El transporte de tBid humana hacia el interior de células eucariotas induce una apoptosis masiva. (A) Análisis de la transferencia Western de caspasa 3 p17 rota ("a") y actina ("b") de células HeLa no tratadas (II) o infectadas durante 60 min con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* que porta III: pBad\_Si2, IV: YopE<sub>1-138</sub>-Bid o V: YopE<sub>1-138</sub>-t-Bid a una MOI de 100. En algunos casos, las células se trataron con VI: estaurosporina 0,5 µM, o VII: estaurosporina 1 µM. (B) Células HeLa lisadas con digitonina no tratadas (II) o después de una infección durante 1 h con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* que porta III: pBad\_Si2, IV: YopE<sub>1-138</sub>-Bid o V: YopE<sub>1-138</sub>-t-Bid a una MOI de 100 se analizaron mediante transferencia Western anti-Bid ("a"), lo cual permite comparar los niveles endógenos de Bid (marcado como Z) con los niveles de YopE<sub>1-138</sub>-Bid translocado (marcado como X) o YopE<sub>1-138</sub>-tBid (marcado

como Y). Como control de carga se realizó una transferencia Western antiactina (mostrado en "b"). En algunos casos, las células se trataron con VI: estaurosorina 0,5  $\mu$ M, o VII: estaurosorina 1  $\mu$ M. (C) Células HeLa no tratadas (I) o infectadas a una MOI de 100 durante 1 h con II: *Y. enterocolitica*  $\Delta$ HOPEMT *asd* + pBad\_Si2, III: *Y. enterocolitica*  $\Delta$ HOPEMT *asd* + YopE<sub>1-138</sub>-Bid, IV: *Y. enterocolitica*  $\Delta$ HOPEMT *asd* + YopE<sub>1-138</sub>-tBid. En algunos 5 casos, las células se trataron con V: VI: estaurosorina 0,5  $\mu$ M, o VI: estaurosorina 1  $\mu$ M. Después de la fijación, las células se tiñeron para el citoesqueleto de actina (en gris).

Figura 8: El transporte dependiente de T3SS de BIM de pez cebra induce la apoptosis en embriones de pez cebra. (A) Se infectaron embriones de pez cebra de 2 dpf con la cepa control *Y. enterocolitica*  $\Delta$ HOPEMT *asd* + pBad\_Si1 que expresa EGFP (I) o la cepa que transloca zBIM (II: *Y. enterocolitica*  $\Delta$ HOPEMT *asd* + YopE<sub>1-138</sub>-zBIM) mediante la inyección de aproximadamente 400 bacterias en la región del rombencéfalo. Después de 5,5 h los embriones se 10 fijaron, se tiñeron para la caspasa 3 activada (caspasa 3 rota, p17; mostrado en "c") y se analizaron para la presencia de bacterias (señal de EGFP, mostrado en "b"). Se muestran proyecciones z de intensidad máxima para las imágenes fluorescentes. Se muestran la proyección z de campo brillante en "a". (B) Análisis de imágenes automático de las proyecciones z de intensidad máxima de imágenes apiladas-z registradas de (A). Brevemente, se 15 detectaron bacterias a través del canal de GFP. Alrededor de cada área de una mancha bacteriana se creó un círculo con un radio de 10 píxeles. Las regiones solapantes se separaron por igual entre los miembros que se conectaban. En las áreas más cercanas que rodean a las bacterias se midió la intensidad de la tinción de caspasa 3 p17 y se representa gráficamente en el eje de ordenadas (como [u.a.]). Se realizó un análisis estadístico usando un 20 ensayo de Mann-Whitney (\*\* indica un valor de  $p < 0,001$ ). Se combinaron los datos de  $n = 14$  para los animales infectados con la cepa control *Y. enterocolitica*  $\Delta$ HOPEMT *asd* + pBad\_Si1 (I), o  $n = 19$  para II: *Y. enterocolitica*  $\Delta$ HOPEMT *asd* + YopE<sub>1-138</sub>-zBIM, y las barras de error indicadas son el error estándar del promedio.

Figura 9: Fosfoproteoma dependiente de tBid. Se infectaron células HeLa durante 30 min con *Y. enterocolitica*  $\Delta$ HOPEMT *asd* + YopE<sub>1-138</sub>-t-Bid a una MOI de 100, y como control con *Y. enterocolitica*  $\Delta$ HOPEMT *asd* + pBad\_Si2. (A) Representación gráfica del fosfoproteoma de tBid. Las proteínas que contienen fosfopeptidos que fueron significativamente reguladas de una manera dependiente de tBid (en gris) (valor de  $q < 0,01$ ), así como las proteínas relacionadas con la apoptosis conocida (en gris oscuro) se representan en una red STRING de interacciones entre proteínas conocidas y previstas (confianza alta, puntuación 0,7). Solo se representan las proteínas con al menos una conexión en STRING. (B) Las imágenes confocales de células HeLa infectadas con *Y. enterocolitica*  $\Delta$ HOPEMT *asd* + pBad\_Si2 (I) o con *Y. enterocolitica*  $\Delta$ HOPEMT *asd* + YopE<sub>1-138</sub>-t-Bid (II) revelan la 25 inducción de un fenotipo apoptótico tras el transporte de tBid. Las células se tiñeron para los núcleos con Hoechst ("a"), para la F-actina con faloidina ("b"), para la tubulina con un anticuerpo antitubulina ("c") y para las mitocondrias con mitodetector ("d"). La barra de escala representa 40  $\mu$ m.

Figura 10: Descripción de la caja de herramientas basada en la secreción de tipo III. (A) Mapas de vectores de los plásmidos de clonación pBad\_Si1 y pBad\_Si2 usados para generar construcciones de fusión con YopE<sub>1-138</sub>. La chaperona SycE y la fusión YopE<sub>1-138</sub> están bajo el promotor nativo *Y. enterocolitica*. Los dos plásmidos solo se 30 diferencian por la presencia de un EGFP inducible por arabinosa presente en pBad\_Si1. (B) Sitio de clonación múltiple directamente detrás del fragmento YopE<sub>1-138</sub> en los plásmidos pBad\_Si1 y pBad\_Si2.

Figura 11: Caracterización del transporte de proteínas de T3SS hacia el interior de diversas líneas celulares. Tinción de inmunofluorescencia anti-Myc de fibroblastos Swiss 3T3 ("a"), células Jurkat ("b") y células HUVEC ("c") sin tratar 40 (II) o infectados con *Y. enterocolitica*  $\Delta$ HOPEMT *asd* + pBad\_Si2 (I) a la MOI indicada sobre las imágenes (MOI 25, 50, 100, 200 y 400 para HUVEC) durante 1 h.

Figura 12: Dependencia de T3SS del transporte de proteínas efectoras bacterianas hacia el interior de una célula eucariota. Células HeLa lisadas con digitonina a una MOI de 100 durante el tiempo indicado sobre las transferencias (0, 5, 15, 10, 60 y 120 minutos) con *Y. enterocolitica*  $\Delta$ YopB+YopE<sub>1-138</sub>-SopE-Myc (I) o *Y. enterocolitica*  $\Delta$ HOPEMT *asd* + YopE<sub>1-138</sub>-SopE-Myc (II) fueron analizadas mediante transferencia Western anti-Myc. El tamaño que se corresponde con YopE<sub>1-138</sub>-SopE-Myc está marcado por "a", mientras que el tamaño de la proteína c-Myc endógena está marcado por "b".

Figuras 13 y 14: Secreción dependiente de T3SS de diversas otras proteínas hacia el sobrenadante del cultivo. Experimento de secreción *in vitro* de I: *Y. enterocolitica*  $\Delta$ HOPEMT *asd* + YopE<sub>1-138</sub> condensado a la proteína como 50 se indica. El contenido en proteínas de los lisados bacterianos totales ("A") y los sobrenadantes del cultivo precipitados ("B") se analizó mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-YopE. Los números escritos indican el peso molecular en kDa a la correspondiente altura.

Figuras 15A a M: Cepas de *Y. enterocolitica* y *S. enterica* usadas en este estudio. Lista de cepas de *Y. enterocolitica* y *S. enterica* usadas en este estudio que proporciona información acerca de las cepas base, los plásmidos y las 55 proteínas para el transporte dependiente de T3SS codificadas por los correspondientes plásmidos. Además, se proporciona información sobre los oligonucleótidos usados para la construcción del correspondiente plásmido, el esqueleto del plásmido y las resistencias a antibióticos.

Figura 16: El transporte de tBid murina, Bid BH3 murina y Bax BH3 murina hacia el interior de células B16F10 induce una apoptosis masiva. Células B16F10 no infectadas (I) o después de una infección (MOI de 50) durante 2,5 h con

*Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd*, y II: +pBadSi\_2, III: +YopE<sub>1-138</sub>- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para tBid murina, IV: +YopE<sub>1-138</sub>- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para Bid BH3 murina, o V: +YopE<sub>1-138</sub>- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para Bax BH3 murina. Después de la fijación, las células se tiñeron para el citoesqueleto de actina y los núcleos (ambos en gris).

5 Figura 17: El transporte de tBid murina, Bid BH3 murina y Bax BH3 murina hacia el interior de células D2A1 induce una apoptosis masiva. Células D2A1 no infectadas (I) o después de una infección (MOI de 50) durante 2,5 h con *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd*, y II: +pBadSi\_2, III: +YopE<sub>1-138</sub>- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para tBid murina, IV: +YopE<sub>1-138</sub>- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para Bid BH3 murina, o V: +YopE<sub>1-138</sub>- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para Bax BH3 murina. Después de la fijación, las células se tiñeron para el citoesqueleto de actina y los núcleos (ambos en gris).

10 Figura 18: El transporte de tBid murina, Bid BH3 murina y Bax BH3 murina hacia el interior de células HeLa induce una apoptosis masiva. Células HeLa no infectadas (I) o después de una infección (MOI de 50) durante 2,5 h con *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd*, y II: +pBadSi\_2, III: +YopE<sub>1-138</sub>- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para tBid murina, IV: +YopE<sub>1-138</sub>- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para Bid BH3 murina, o V: +YopE<sub>1-138</sub>- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para Bax BH3 murina. Después de la fijación, las células se tiñeron para el citoesqueleto de actina y los núcleos (ambos en gris).

15 Figura 19: El transporte de tBid murina, Bid BH3 murina y Bax BH3 murina hacia el interior de células 4T1 induce una apoptosis masiva. Células 4T1 no infectadas (I) o después de una infección (MOI de 50) durante 2,5 h con *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd*, y II: +pBadSi\_2, III: +YopE<sub>1-138</sub>- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para tBid murina, IV: +YopE<sub>1-138</sub>- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para Bid BH3 murina, o V: +YopE<sub>1-138</sub>- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para Bax BH3 murina. Después de la fijación, las células se tiñeron para el citoesqueleto de actina y los núcleos (ambos en gris).

20 Figura 20: El transporte de tBid murina por *S. enterica* cultivada bajo condiciones inductoras de SPI-1 T3SS hacia el interior de células eucariotas induce la apoptosis. Análisis de la transferencia Western de caspasa 3 p17 rota de células HeLa no tratadas (I) o infectadas durante 4 h con III: *S. enterica* *aroA* que porta IV: SteA<sub>1-20</sub>-t-Bid, V: SteA<sub>FL</sub>-Bid, VI: SopE<sub>1-81</sub>-t-Bid o VII: SopE<sub>1-105</sub>-t-Bid a una MOI de 100. Para este experimento, todas las cepas de *S. enterica* *aroA* se cultivaron bajo condiciones inductoras de SPI-1 T3SS. En algunos casos, las células se trataron con II: estauroporina 1 μM. Los números escritos indican el peso molecular en kDa a la correspondiente altura.

25 Figura 21: El transporte de tBid murina por *S. enterica* cultivada bajo condiciones inductoras de SPI-2 T3SS hacia el interior de células eucariotas induce la apoptosis. Análisis de la transferencia Western de caspasa 3 p17 rota de células HeLa no tratadas (I) o infectadas durante 4 h con III: *S. enterica* *aroA* que porta IV: SteA<sub>1-20</sub>-t-Bid, V: SteA<sub>FL</sub>-Bid, VI: SopE<sub>1-81</sub>-t-Bid o VII: SopE<sub>1-105</sub>-t-Bid a una MOI de 100. Para este experimento, todas las cepas de *S. enterica* *aroA* se cultivaron bajo condiciones inductoras de SPI-2 T3SS. En algunos casos, las células se trataron con II: estauroporina 1 μM. Los números escritos indican el peso molecular en kDa a la correspondiente altura.

30 Figura 22: Secrección dependiente de T3SS por *S. enterica* de diversas proteínas del ciclo celular hacia el sobrenadante del cultivo. Experimento de secreción *in vitro* de *S. enterica* *aroA* + SteA<sub>FL</sub> (I, III, V, VII) o SopE<sub>1-105</sub> (II, IV, VI, VIII) condensados a proteínas como se lista a continuación. I y II: Ink4a-MycHis; III y IV: Ink4c-MycHis; V y VI: Mad2-MycHis; VII y VIII: Cdk1-MycHis. El contenido en proteínas de los sobrenadantes del cultivo precipitados ("A") y los lisados bacterianos totales ("B") se analizó mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-myc. Los números escritos indican el peso molecular en kDa a la correspondiente altura.

35 Figura 23: Secrección dependiente de T3SS de diversos péptidos que interfieren en el ciclo celular conocidos hacia el sobrenadante del cultivo. Experimento de secreción *in vitro* de I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* + pBad\_Si2. II-VII: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* + YopE<sub>1-138</sub> condensado a los péptidos listados a continuación: II: Ink4A<sub>84-103</sub>; III: p107/RBL1<sub>657-662</sub>; IV: p21<sub>141-160D149A</sub>; V: p21<sub>145-160D149A</sub>; VI: p21<sub>117-33</sub>; VII: ciclina D2<sub>139-147</sub>. El contenido en proteínas de los sobrenadantes del cultivo precipitados ("A") y los lisados bacterianos totales ("B") se analizó mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-YopE. Los números escritos indican el peso molecular en kDa a la correspondiente altura.

40 Figura 24: La fusión de la proteína transportada por T3SS a la ubiquitina permite la retirada del apéndice YopE<sub>1-138</sub>. Se infectaron células HeLa con una cepa que transporta una proteína de interés condensada a YopE<sub>1-138</sub> con una ubiquitina directamente condensada (YopE<sub>1-138</sub>-Ubi). Después del transporte de la proteína al interior de la célula eucariota, las proteasas específicas de ubiquitina endógenas escindirán el apéndice YopE<sub>1-138</sub>-Ubi de la proteína de interés. Se analizaron células HeLa lisadas con digitonina no infectadas (I) o después de una infección (MOI de 100) durante 1 h con II: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* + YopE<sub>1-138</sub>-Flag-INK4C-MycHis, o III: +YopE<sub>1-138</sub>-Flag-Ubicuitina-INK4C-MycHis mediante transferencia Western anti-INK4C para la presencia de IV: YopE<sub>1-138</sub>-Flag-Ubicuitina-INK4C-MycHis, o V: YopE<sub>1-138</sub>-Flag-INK4C-MycHis, la forma escindida VI: INK4C-MycHis, y VII: la INK4C endógena.

#### Descripción detallada de la invención

45 La presente invención proporciona cepas bacterianas Gram-negativas recombinantes y su uso para el transporte de proteínas heterólogas hacia el interior de células eucariotas.

Para poder interpretar esta memoria descriptiva, se aplicarán las siguientes definiciones y, cuando sea apropiado, los términos y expresiones usados en singular también incluirán el plural y viceversa. Se entenderá que la terminología empleada en la presente se utiliza para describir solo realizaciones concretas y no pretende ser limitante.

- 5 La expresión "cepa bacteriana Gram-negativa", tal como se emplea en la presente, incluye las siguientes bacterias: *Aeromonas salmonicida*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas veronii*, *Anaeromyxobacter dehalogenans*, *Bordetella bronchiseptica*, *Bordetella parapertussis*, *Bordetella pertussis*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Burkholderia cenocepacia*, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia mallei*, *Burkholderia pseudomallei*, *Chlamydia muridarum*, *Chlamydia trachmoatis*, *Chlamydophila abortus*, *Chlamydophila pneumoniae*, *Chromobacterium violaceum*, *Citrobacter rodentium*, *Desulfovibrio vulgaris*, *Edwardsiella tarda*, *Endozoicomonas elysicola*, *Erwinia amylovora*, *Escherichia albertii*, *Escherichia coli*, *Lawsonia intracellularis*, *Mesorhizobium loti*, *Myxococcus xanthus*, *Pantoea agglomerans*, *Photobacterium damsela*, *Photorhabdus luminescens*, *Photorhabdus temperate*, *Pseudoalteromonas spongiae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas plecoglossicida*, *Pseudomonas syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium sp*, *Salmonella enterica* y otras *Salmonella* sp, *Shigella flexneri* y otras *Shigella* sp, *Sodalis glossinidius*,  
10 *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio azureus*, *Vibrio campbellii*, *Vibrio caribbeanicus*, *Vibrio harvey*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio tasmaniensis*, *Vibrio tubiashii*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas oryzae*,  
15 *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*. Las cepas bacterianas Gram-negativas preferidas de la invención son cepas bacterianas Gram-negativas incluidas en las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae*. La cepa bacteriana Gram-negativa de la presente invención normalmente se usa para el  
20 transporte de proteínas heterólogas por el T3SS bacteriano hacia el interior de células eucariotas *in vitro* e *in vivo*.

La expresión "cepa bacteriana Gram-negativa recombinante" usada en la presente se refiere a una cepa bacteriana Gram-negativa genéticamente transformada con un vector. Un vector útil de la presente invención, por ejemplo, es un vector de expresión, un vector para la inserción cromosómica o de un plásmido de virulencia, o un fragmento de ADN para la inserción cromosómica o de un plásmido de virulencia.

- 25 Las expresiones "cepa bacteriana Gram-negativa deficiente en la producción de un aminoácido fundamental para el crecimiento" y "mutante auxotrófico" se emplean en la presente de modo intercambiable y se refieren a cepas bacterianas Gram-negativas que no pueden crecer en ausencia de al menos un aminoácido esencial proporcionado de modo exógeno o de uno de sus precursores. El aminoácido que la cepa no produce, por ejemplo, es aspartato, ácido meso-2,6-diaminopimélico, aminoácidos aromáticos o leucina-arginina [23]. Esta cepa puede generarse, por ejemplo, mediante la delección del gen de aspartato-beta-semialdehído deshidrogenasa ( $\Delta$ asd). Este mutante auxotrófico no puede crecer en ausencia de ácido meso-2,6-diaminopimélico exógeno [24]. La mutación, por ejemplo, la delección del gen de aspartato-beta-semialdehído deshidrogenasa se prefiere en la presente para una cepa bacteriana Gram-negativa deficiente en la producción de un aminoácido fundamental para el crecimiento de la presente invención.

- 35 La expresión "cepa bacteriana Gram-negativa deficiente en la producción de proteínas de adhesión que se unen a la superficie de una célula eucariota o matriz extracelular" se refiere a cepas bacterianas Gram-negativas mutantes que no expresan al menos una proteína de adhesión, comparado con las proteínas de adhesión expresadas por la correspondiente cepa de tipo salvaje. Las proteínas de adhesión pueden incluir, por ejemplo, moléculas de adhesión poliméricas extendidas, tales como pilis/fimbrias o adhesinas no fimbriadas. Las adhesinas fimbriadas incluyen pilis de tipo 1 (tales como pilis Fim de *E. coli* con la adhesina FimH), pilis P (tales como pilis Pap con la adhesina PapG de *E. coli*), pilis de tipo 4 (como la proteína de pilina procedente, por ejemplo, de *P. aeruginosa*) o curlis (proteínas Csg con la adhesina CsgA de *S. enterica*). Las adhesiones no fimbriadas incluyen adhesinas autotransportadoras triméricas, tales como YadA procedente de *Y. enterocolitica*, BpaA (*B. pseudomallei*), Hia (*H. influenzae*), BadA (*B. henselae*), NadA (*N. meningitidis*) o UspA1 (*M. catarrhalis*), así como otras adhesinas autotransportadoras, tales  
40 como AIDA-1 (*E. coli*), así como otras adhesinas/invasinas, tales como InvA procedente de *Y. enterocolitica*, o intimina (*E. coli*) o miembros de la familia Dr o la familia Afa (*E. coli*). Los términos YadA e InvA, tal como se emplean en la presente, se refieren a proteínas procedentes de *Y. enterocolitica*. La YadA autotransportadora [25, 26] se une a diferentes formas de colágeno, así como a fibronectina, mientras que la invasina InvA [27-29] se une a  $\beta$ -integrinas en la membrana de células eucariotas. Si la cepa bacteriana Gram-negativa es una cepa de *Y. enterocolitica*, la cepa es preferiblemente deficiente en InvA y/o YadA.  
45

- Tal como se emplea en la presente, la expresión "familia de *Enterobacteriaceae*" comprende una familia de bacterias facultativamente anaerobias, gram-negativas y con forma de varilla, que se encuentran en el suelo, el agua, plantas y animales, y con frecuencia aparecen como patógenos en vertebrados. Las bacterias de esta familia comparten una fisiología similar y muestran una conservación de elementos funcionales y genes de los respectivos genomas.  
55 Además de ser oxidasa negativos, todos los miembros de esta familia son fermentadores de glucosa y la mayoría son reductores de nitrato.

- 60 Las bacterias de *Enterobacteriaceae* de la invención pueden ser cualquier bacteria que pertenezca a esa familia y, de modo específico, incluyen, pero no se limitan a bacterias de los siguientes géneros: *Escherichia*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Erwinia*, *Morganella*, *Providencia*, o *Yersinia*. En realizaciones más específicas, la bacteria es de la especie *Escherichia coli*, *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermanii*, *Escherichia vulneris*, *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori*, *Shigella*

5 *dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia pestis*, *Yersinia enterocolitica*, *Erwinia amylovora*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus penneri*, *Proteus hauseri*, *Providencia alcalifaciens*, o *Morganella morganii* species. Preferiblemente, la cepa bacteriana Gram-negativa se selecciona del grupo que consiste en los géneros *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas*, *Chlamydia*, *Erwinia*, *Pantoea*, *Vibrio*, *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Xanthomonas*, *Chromobacterium*, *Sodalis*, *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Rhizobiae*, *Aeromonas*, *Photorhabdus*, *Bordetella* y *Desulfovibrio*, más preferiblemente del grupo que consiste en los géneros *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella*, y *Pseudomonas*, más preferiblemente del grupo que consiste en los géneros *Yersinia* y *Salmonella*.

10 El término “*Yersinia*”, tal como se emplea en la presente, incluye todas las especies de *Yersinia*, que incluyen *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis* y *Yersinia pestis*. Se prefiere *Yersinia enterocolitica*.

El término “*Salmonella*”, tal como se emplea en la presente, incluye todas las especies de *Salmonella*, que incluyen *Salmonella enterica* y *S. bongori*. Se prefiere *Salmonella enterica*.

15 Un “promotor”, tal como se emplea en la presente, se refiere una secuencia de ácido nucleico que regula la expresión de una unidad transcripcional. Una “región de promotor” es una región reguladora capaz de unirse a la ARN polimerasa en una célula e iniciar la transcripción de una secuencia codificadora cadena abajo (dirección 3'). Dentro de la región de promotor se encuentra un sitio de inicio de la transcripción (definido de modo conveniente mediante cartografiado con nucleasa S1), así como dominios de unión de proteínas (secuencias consenso) que son responsables de la unión de la ARN polimerasa, tal como la región -35 putativa y la caja Pribnow. La expresión “unido operablemente”, cuando describe la relación entre dos regiones de ADN, simplemente significa que están relacionadas entre sí desde el punto de vista funcional y que están localizadas sobre el mismo fragmento de ácido nucleico. Un promotor está unido operablemente a un gen estructural si controla la transcripción del gen y está localizado sobre el mismo fragmento de ácido nucleico que el gen. Habitualmente, el promotor es funcional en dicha cepa bacteriana Gram-negativa, es decir, el promotor es capaz de expresar la proteína de fusión de la presente invención, es decir, el promotor es capaz de expresar la proteína de fusión de la presente invención sin más modificaciones genéticas ni expresión de otras proteínas. Además, un promotor funcional no debe ser contrarregulado en la naturaleza por el T3SS bacteriano.

30 El término “transporte” usado en la presente se refiere al transporte de una proteína desde una cepa bacteriana Gram-negativa recombinante hasta una célula eucariota, e incluye las etapas de expresar la proteína heteróloga en la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante, segregar la proteína o proteínas expresadas a partir de dicha cepa bacteriana Gram-negativa, y translocar la proteína o proteínas segregadas por dicha cepa bacteriana Gram-negativa hacia el citosol de la célula eucariota. Por consiguiente, las expresiones “señal de transporte” o “señal de secreción”, que se emplean de modo intercambiable en la presente, se refieren a una secuencia de polipéptido que puede ser reconocida por el sistema de secreción y translocación de la cepa bacteriana Gram-negativa y que dirige el transporte de una proteína desde la cepa bacteriana Gram-negativa hacia las células eucariotas.

35 Tal como se emplea en la presente, la “secreción” de una proteína se refiere al transporte de una proteína heteróloga hacia afuera a través de la membrana celular de una cepa bacteriana Gram-negativa recombinante. La “translocación” de una proteína se refiere al transporte de una proteína heteróloga desde cepa bacteriana Gram-negativa recombinante a través de la membrana plasmática de una célula eucariota hacia el citosol de dicha célula eucariota.

40 La expresión “células eucariotas”, tal como se emplea en la presente, incluye, por ejemplo, las siguientes células eucariotas: Hi-5, HeLa, Hek, HUVEC, 3T3, CHO, Jurkat, Sf-9, HepG2, Vero, MDCK, Mef, THP-1, J774, RAW, Caco2, NCI60, DU145, Lncap, MCF-7, MDA-MB-438, PC3, T47D, A549, U87, SHSY5Y, Ea.Hy926, Saos-2, 4T1, D2A1, B16F10, y hepatocitos humanos primarios. Las “células eucariotas”, tal como se emplean en la presente, también se denominan “células diana” o “células eucariotas diana”.

45 La expresión “proteína efectora de T3SS”, tal como se emplea en la presente, se refiere a proteínas que son inyectadas en la naturaleza por los sistemas T3S hacia el citosol de células eucariotas, y a proteínas que son segregadas en la naturaleza por sistemas T3S que pueden formar, por ejemplo, el poro de translocación en la membrana eucariota (que incluyen translocadores formadores de poro (tales como YopB y YopD de *Yersinia*) y proteínas de la punta, tal como LcrV de *Yersinia*). Preferiblemente se emplean proteínas que son inyectadas en la naturaleza por sistemas T3S hacia el citosol de células eucariotas. Estos factores de virulencia paralizan o reprograman la célula eucariota en beneficio del patógeno. Los efectores de T3S muestran un enorme repertorio de actividades bioquímicas y modulan la función de moléculas reguladoras del hospedante cruciales [5,30] e incluyen AvrA, AvrB, AvrBs2, AvrBS3, AvrBsT, AvrD, AvrD1, AvrPphB, AvrPphC, AvrPphEPto, AvrPpiBPto, AvrPto, AvrPtoB, AvrRpm1, AvrRpt2, AvrXv3, CigR, EspF, EspG, EspH, EspZ, ExoS, ExoT, GogB, GtgA, GtgE, familia de proteínas, HopAB2, HopAO1, HopI1, HopM1, HopN1, HopPtoD2, HopPtoE, HopPtoF, HopPtoN, HopU1, HsvB, IcsB, IpaA, IpaB, IpaC, IpaH, IpaH7.8, IpaH9.8, IpgB1, IpgB2, IpgD, LcrV, Map, OspC1, OspE2, OspF, OspG, Ospl, PippB, PipB2, PopB, PopP2, PthXo1, PthXo6, PthXo7, SifA, SifB, SipA/SspA, SipB, SipC/SspC, SipD/SspD, SlrP, SopA, SopB/SigD, SopD, SopE, SopE2, SpiC/SsaB, SptP, SpvB, SpvC, SrfH, SseJ, SseB, SseC, SseD, SseF, SseG,

Ssel/SrfH, SseJ, SseK1, SseK2, SseK3, SseL, SspH1, SspH2, SteA, SteB, SteC, SteD, SteE, TccP2, Tir, VirA, VirPphA, VopF, XopD, YopB, YopD, YopE, YopH, YopJ, YopM, YopO, YopP, YopT, YpkA.

Los genes efectores de T3SS de *Yersinia* se han clonado, por ejemplo, a partir de *Y. enterocolitica*, y son YopE, YopH, YopM, YopO, YopP/YopJ, y YopT [31]. Los respectivos genes efectores pueden clonarse a partir de *Shigella flexneri* (por ejemplo, OspF, IpgD, IpgB1), *Salmonella enterica* (por ejemplo, SopE, SopB, SptP), *P. aeruginosa* (por ejemplo, ExoS, ExoT, ExoU, ExoY) o *E. coli* (por ejemplo, Tir, Map, EspF, EspG, EspH, EspZ). Las secuencias de ácidos nucleicos de estos genes están disponibles para los expertos en la técnica, por ejemplo, en la base de datos Genebank (yopH, yopO, yopE, yopP, yopM, yopT en NC\_002120 GI:10955536; proteínas efectoras de *S. flexneri* en AF386526.1 GI: 18462515; efectores de *S. enterica* en NC\_016810.1 GI:378697983 o FQ312003.1 GI:301156631; efectores de *P. aeruginosa* en AE004091.2 GI:110227054 o CP000438.1 GI:115583796; y proteínas efectoras de *E. coli* en NC\_011601.1 GI:215485161).

Para los fines de la presente invención, los genes se indican mediante letras minúsculas y en cursiva para distinguirlos de las proteínas. En el caso de que los genes (indicados mediante letras minúsculas y en cursiva) aparezcan después de una especie bacteriana (tal como *E. coli*), se refieren a una mutación del correspondiente gen en la correspondiente especie bacteriana. Por ejemplo, YopE se refiere a la proteína efectora codificada por el gen *yopE*. *Y. enterocolitica* *yopE* representa una *Y. enterocolitica* que contiene una mutación en el gen *yopE*.

Tal como se emplean en la presente, los términos “polipéptido”, “péptido”, “proteína”, “polipeptídico” y “peptídico” se emplean de modo intercambiable para indicar una serie de restos aminoácidos conectados entre sí mediante enlaces peptídicos entre los grupos alfa-amino y carboxi de restos adyacentes. Se prefieren las proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que comprende al menos 10 aminoácidos, más preferiblemente al menos 20 aminoácidos.

Según la presente invención, “una proteína heteróloga” incluye proteínas naturales, o partes de estas, y también incluye proteínas modificadas de modo artificial, o partes de estas. Tal como se emplea en la presente, la expresión “proteína heteróloga” se refiere a una proteína heteróloga, o a partes de esta, distinta de la proteína efectora de T3SS o su fragmento N-terminal con el que puede condensarse. En concreto, la proteína heteróloga, tal como se emplea en la presente, se refiere a una proteína, o a una de sus partes, que no pertenece al proteoma, es decir, el complemento de proteínas naturales completo de la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante específica proporcionada y usada por la invención, por ejemplo, que no pertenece al proteoma, es decir, el complemento de proteínas naturales completo de una cepa bacteriana específica de los géneros *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* o *Pseudomonas*. Habitualmente, la proteína heteróloga es de origen animal, que incluye de origen humano. La proteína heteróloga se selecciona del grupo que consiste en proteínas implicadas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis, reguladores del ciclo celular, proteínas de repetición de anquirina, proteínas indicadoras, GTPasas pequeñas, proteínas relacionadas con GPCR, construcciones de fusión de nanocuerpos, efectores de T3SS bacterianos, efectores de T4SS bacterianos y proteínas víricas. Aún más particularmente preferidos son las proteínas heterólogas seleccionadas del grupo que consiste en proteínas implicadas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis, reguladores del ciclo celular, y proteínas de repetición de anquirina. Las más preferidas son proteínas implicadas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis, tales como proteínas heterólogas animales, preferiblemente humanas, implicadas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis.

En algunas realizaciones, el vector de la cepa bacteriana Gram-negativa de la presente invención comprende dos segundas secuencias de ADN que codifican las proteínas heterólogas idénticas o dos proteínas heterólogas distintas condensadas independientemente entre sí dentro de marco al extremo 3' de dicha primera secuencia de ADN.

En algunas realizaciones, el vector de la cepa bacteriana Gram-negativa de la presente invención comprende tres segundas secuencias de ADN que codifican las proteínas heterólogas idénticas o tres proteínas heterólogas distintas condensadas independientemente entre sí dentro de marco al extremo 3' de dicha primera secuencia de ADN.

La proteína heteróloga expresada por la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante habitualmente tiene un peso molecular de entre 1 y 150 kDa, preferiblemente de entre 1 y 120 kDa, más preferiblemente de entre 1 y 100 kDa, lo más preferiblemente de entre 15 y 100 kDa.

Según la presente invención, las “proteínas implicadas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis” incluyen, pero no se limitan a Bad, Bcl2, Bak, Bmt, Bax, Puma, Noxa, Bim, Bcl-xL, Apaf1, caspasa 9, caspasa 3, caspasa 6, caspasa 7, caspasa 10, DFFA, DFFB, ROCK1, APP, CAD, ICAD, CAD, EndoG, AIF, HtrA2, Smac/Diablo, Arts, ATM, ATR, Bok/Mtd, Bmf, Mcl-1(S), familia IAP, LC8, PP2B, proteínas 14-3-3, PKA, PKC, PI3K, Erk1/2, p90RSK, TRAF2, TRADD, FADD, Daxx, caspasa 8, caspasa 2, RIP, RAIDD, MKK7, JNK, FLIPs, FKHR, GSK3, CDK y sus inhibidores, tales como la familia INK4 (p16(INK4a), p15(INK4b), p18(INK4c), p19(INK4d)), y la familia Cip1/Waf1/Kip1-2 (p21(Cip1/Waf1), p27(Kip1), p57(Kip2)). Preferiblemente, se emplean Bad, Bmt, Bcl2, Bak, Bax, Puma, Noxa, Bim, Bcl-xL, caspasa 9, caspasa 3, caspasa 6, caspasa 7, Smac/Diablo, Bok/Mtd, Bmf, Mcl-1(S), LC8, PP2B, TRADD, Daxx, caspasa 8, caspasa 2, RIP, RAIDD, FKHR, CDK y sus inhibidores, tales como la familia INK4 (p16(INK4a), p15(INK4b), p18(INK4c), p19(INK4d)), lo más preferiblemente BIM, Bid, Bid truncada, FADD, caspasa 3 (y sus subunidades), Bax, Bad, Akt, CDK y sus inhibidores, tales como la familia INK4 (p16(INK4a), p15(INK4b), p18(INK4c),

p19(Ink4d)) [32-34]. Además, las proteínas implicadas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis incluyen DIVA, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bid y tBid, Egl-1, Bcl-Gs, citocromo C, beclina, CED-13, BNIP1, BNIP3, Bcl-B, Bcl-W, Ced-9, A1, NR13, Bfl-1, caspasa 1, caspasa 2, caspasa 4, caspasa 5, caspasa 8.

- 5 Las proteínas implicadas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis se seleccionan del grupo que consiste en proteínas proapoptóticas, proteínas antiapoptóticas, inhibidores de las vías de prevención de la apoptosis e inhibidores de vías o señalización prosurvivencia. Las proteínas proapoptóticas comprenden proteínas seleccionadas del grupo que consiste en Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid y tBid, Bok, Apaf1, Smac/Diablo, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, beclina 1, Egl-1 y CED-13, citocromo C, FADD, la familia de caspasas, y CDK y sus inhibidores, tales como la familia INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)) o seleccionadas del grupo que consiste en Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid y tBid, Bok, Egl-1, Apaf1, Smac/Diablo, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, beclina 1, Egl-1 y CED-13, citocromo C, FADD, y la familia de caspasas. Se prefieren Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid y tBid, Bok, Egl-1, Apaf1, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, beclina 1, Egl-1 and CED-13, Smac/Diablo, FADD, la familia de caspasas, CDK y sus inhibidores, tales como la familia INK4 (p16(Ink4a), p15(Ink4b), p18(Ink4c), p19(Ink4d)). Igualmente preferidas son Bax, Bak, Diva, Bcl-Xs, Nbk/Bik, Hrk/Dp5, Bmf, Noxa, Puma, Bim, Bad, Bid y tBid, Bok, Apaf1, BNIP1, BNIP3, Bcl-Gs, beclina 1, Egl-1 y CED-13, Smac/Diablo, FADD, la familia de caspasas.
- 10
- 15

Las proteínas antiapoptóticas comprenden proteínas seleccionadas del grupo que consiste en Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-B, Bcl-W, Mcl-1, Ced-9, A1, NR13, la familia IAP y Bfl-1. Se prefieren Bcl-2, Bcl-Xl, Bcl-B, Bcl-W, Mcl-1, Ced-9, A1, NR13 y Bfl-1.

- 20 Los inhibidores de las vías de prevención de la apoptosis comprenden proteínas seleccionadas del grupo que consiste en Bad, Noxa y Cdc25A. Se prefieren Bad y Noxa.

Los inhibidores de las vías o la señalización prosurvivencia comprenden proteínas seleccionadas del grupo que consiste en PTEN, ROCK, PP2A, PHLPP, JNK, p38. Se prefieren PTEN, ROCK, PP2A y PHLPP.

- 25 En algunas realizaciones, las proteínas heterólogas implicadas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis se seleccionan del grupo que consiste en proteínas solo con BH3, caspasas y proteínas de señalización intracelular de control del receptor de muerte de la apoptosis.

Las proteínas solo con BH3 comprenden proteínas seleccionadas del grupo que consiste en Bad, BIM, Bid y tBid, Puma, Bik/Nbk, Bod, Hrk/Dp5, BNIP1, BNIP3, Bmf, Noxa, Mcl-1, Bcl-Gs, beclina 1, Egl-1 y CED-13. Se prefieren Bad, BIM, Bid y tBid.

- 30 Las caspasas comprenden proteínas seleccionadas del grupo que consiste en caspasa 1, caspasa 2, caspasa 3, caspasa 4, caspasa 5, caspasa 6, caspasa 7, caspasa 8, caspasa 9, caspasa 10. Se prefieren la caspasa 3, caspasa 8 y caspasa 9.

35 Las proteínas de señalización intracelular de control del receptor de muerte de la apoptosis comprenden proteínas seleccionadas del grupo que consiste en FADD, TRADD, ASC, BAP31, GULP1/CED-6, CIDEA, MFG-E8, CIDEc, RIPK1/RIP1, CRADD, RIPK3/RIP3, Crk, SHB, CrkL, DAXX, la familia 14-3-3, FLIP, DFF40 y 45, PEA-15, SODD. Se prefieren FADD y TRADD.

- 40 En algunas realizaciones, dos proteínas heterólogas implicadas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis están comprendidas en el vector de la cepa bacteriana Gram-negativa de la presente invención, y una proteína es una proteína proapoptótica y la otra proteína es un inhibidor de las vías de prevención de la apoptosis, o una proteína es una proteína proapoptótica y la otra proteína es un inhibidor de las vías o la señalización prosurvivencia.

Las proteínas proapoptóticas incluidas en la presente invención habitualmente tienen una estructura en alfa-hélice, preferiblemente una hélice hidrófoba rodeada por hélices anfipáticas, y habitualmente comprenden al menos uno de los dominios BH1, BH2, BH3 o BH4, preferiblemente comprenden al menos un dominio BH3. Habitualmente, las proteínas proapoptóticas incluidas en la presente invención no tienen actividad enzimática.

- 45 La expresión "sitio de ruptura de proteasa", tal como se emplea en la presente, se refiere a un motivo de aminoácidos específico dentro de una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, dentro de una secuencia de aminoácidos de una proteína o una proteína de fusión, que es rota por una proteasa específica que reconoce el motivo de aminoácidos. Para un análisis, véase [35]. Los ejemplos de sitios de ruptura de proteasas son motivos de aminoácidos que son rotos por una proteasa seleccionada del grupo que consiste en enteroquinasa (cadena ligera), enteropeptidasa, proteasa PreScission, proteasa del rinovirus humano (HRV 3C), proteasa de TEV, proteasa de TVMV, proteasa de factor Xa y trombina.
- 50

Los siguientes motivos de aminoácidos son reconocidos por la respectiva proteasa:

- Asp-Asp-Asp-Asp-Lys: enteroquinasa (cadena ligera)/enteropeptidasa
- Leu-Glu-Val-Leu-Phe-Gln/Gly-Pro: proteasa PreScission/proteasa del rinovirus humano (HRV 3C)

- Glu-Asn-Leu-Tyr-Phe-Gln-Ser y motivos modificados basados en Glu-X-X-Tyr-X-Gln-Gly/Ser (en el X es cualquier aminoácido) reconocidos por la proteasa de TEV (virus del grabado del tabaco)
  - Glu-Thr-Val-Arg-Phe-Gln-Ser: proteasa de TVMV
  - Ile-(Glu o Asp)-Gly-Arg: proteasa de factorXa
  - 5 - Leu-Val-Pro-Arg/Gly-Ser: trombina.
- La ubiquitina se incluye en los sitios de ruptura de proteasas tal como se emplean en la presente. Así, en algunas realizaciones preferidas, la ubiquitina se emplea como sitio de ruptura de proteasa, concretamente, la tercera secuencia de ADN codifica la ubiquitina como sitio de ruptura de proteasa, que puede ser roto por una proteasa específica que procesa la ubiquitina en el sitio N-terminal, por ejemplo, que puede ser roto por una proteasa específica que procesa la ubiquitina denominada enzima desubiquitinante en el sitio N-terminal endógenamente en la célula a la cual se ha transportado la proteína de fusión. La ubiquitina es procesada en su extremo C-terminal por un grupo de proteasas C-terminales específicas de ubiquitina endógenas (enzimas desubiquitinantes, "deubiquitinating enzymes", DUB). Se supone que la ruptura de la ubiquitina por las DUB se produce en el mismo extremo C-terminal de la ubiquitina (después de G76).
- 15 Un "individuo", "sujeto" o "paciente" es un vertebrado. En ciertas realizaciones, el vertebrado es un mamífero. Los mamíferos incluyen, pero no se limitan a primates (que incluyen seres humanos y primates no humanos) y roedores (por ejemplo, ratones y ratas). En ciertas realizaciones, un mamífero es un ser humano.
- 20 El término "mutación" se usa en la presente como un término general e incluye cambios en un solo par de bases y en múltiples pares de bases. Estas mutaciones pueden incluir sustituciones, mutaciones de desplazamiento de marco, delecciones, inserciones y truncamientos.
- 25 La expresión "molécula de marcaje o un sitio aceptor para una molécula de marcaje", tal como se emplea en la presente, se refiere a un compuesto químico pequeño que se une a una secuencia de aminoácidos específica que provoca la fluorescencia del compuesto químico unido, preferiblemente, cumarina ligasa/sitio aceptor de cumarina (y sus derivados), resorufina ligasa/sitio aceptor de resorufina (y sus derivados), y el motivo de tetra-cisteína (tal como Cys-Cys-Pro-Gly-Cys-Cys y sus derivados) usados con el tinte F1AsH/ReAsH (Life Technologies) o una proteína a fluorescente, tal como la proteína fluorescente verde potenciada ("Enhanced Green Fluorescent Protein", EGFP).
- 30 La expresión "señal de localización nuclear", tal como se emplea en la presente, se refiere a una secuencia de aminoácidos que marca una proteína para importarla al núcleo de una célula eucariota, e incluye preferiblemente una señal de localización nuclear vírica, tal como NLS derivada del antígeno T grande de SV40 (PPKKKRKV).
- 35 La expresión "sitio de clonación múltiple", tal como se emplea en la presente, se refiere a una secuencia de ADN corta que contiene varios sitios de restricción para la ruptura por endonucleasas de restricción, tales como AcII, HindIII, SsP1, MluI, Tsp509I, PciI, AgeI, BspMI, BfuAI, SexAI, Mlul, BceAI, HpyCH4IV, HpyCH4III, Bael, BsaXI, AfI1II, Spel, Bsrl, Bmrl, BgIII, Afel, Alul, Stul, Scal, Clal, BspDI, PI-SceI, Nsil, Asel, Swal, CspCI, MfeI, BssSI, BmgBI, PmlI, DraI1II, AleI, EcoP 151, Pvull, AlwNI, BtsIMutl, TspRI, Ndel, NlaIII, CviAII, FatI, MsII, FspEI, XcmI, BstXI, PflMI, Bccl, Ncol, BseYI, Faul, Smal, Xmal, TspMI, Nt.CviPII, LpnPI, Acil, Sacl, BsrBI, Mspl, Hpall, ScrFI, BssKI, StyD4I, BsajI, BslI, Btgl, NcI1, AvrII, MnII, BbvCI, Nb.BbvCI, Nt.BbvCI, SbfI, Bpu10I, Bs36I, EcoNI, HpyAV, BstNI, PspGI, StyI, Bcgl, Pvul, BstUI, EagI, RsrII, BsiEI, BsiWI, BsmBI, Hpy99I, MspAll, MspJ1, SgrAI, Bfal, BspCNI, Xhol, Earl, Acul, PstI, BpmI, Ddel, Sfcl, AfI1I, BpuEI, SmII, Aval, BsoBI, Mboll, BbsI, Xmnl, Bsml, Nb.Bsml, EcoRI, Hgal, AatII, Zrai, Tth111I PflFI, PshAI, AhdI, DrdI, Eco53kI, Sacl, BseRI, PleI, Nt.BstNBI, MlyI, Hinfl, EcoRV, Mbol, Sau3AI, DpnII, BfuCI, DpnI, BsaBI, Tfil, BsrDI, Nb.BsrDI, Bbvl, BtsI, Nb.BtsI, BstAPI, Sfani, SphI, NmeAIII, NaeI, NgoMIV, BglI, AsISI, BtgZI, HinPI, Hhal, BssHII, NotI, Fnu4HI, Cac8I, Mwol, Nhel, BmtI, SapI, BspQI, Nt.BspQI, Blpl, Tscl, ApeKI, Bsp1286I, Alwl, Nt.Alwl, BamHI, FokI, BtsCI, HaellI, Phol, Fsel, Sfil, NarI, KasI, Sfol, PluTI, Ascl, Ecil, BsmFI, Apal, PspOMI, Sau961, NlaIV, Kpnl, Acc65I, Bsal, HphI, BstEII, Avall, BanI, BaeGI, BsaHI, BanII, Rsal, CviQI, BstZ17I, BcIVI, Sall, Nt.BsmAI, BsmAI, BcoDI, ApaLI, BsgI, Accl, Hpyl66II, Tsp45I, Hpal, PmeI, Hincl, BsiHKAI, Apol, Nspl, BsrFI, BstYI, HaellI, CviKI-1, EcoO109I, PpuMI, I-CeuI, SnaBI, I-SceI, BspHI, BspEI, Mmel, TaqI, NruI, Hpy188I, Hpyl88III, XbaI, BclI, HpyCH4V, FspI, PI-PspI, Mscl, BsrGI, Msel, PacI, Psil, BstBI, DraI, PspXI, BsaWI, BsaAI, Eael, preferiblemente Xhol, XbaI, HindIII, Ncol, NotI, EcoRI, EcoRV, BamHI, Nhel, Sacl, Sall, BstBI. La expresión "sitio de clonación múltiple", tal como se emplea en la presente, se refiere también a una secuencia de ADN corta que se usa en acontecimientos de recombinación, por ejemplo, en la estrategia de clonación Gateway o en métodos tales como el ensamblaje de Gibson o la clonación TOPO.
- 55 La expresión "cepa de *Yersinia* de tipo salvaje", tal como se emplea en la presente, se refiere a una variante natural (tal como *Y. enterocolitica* E40) o una variante natural que contiene modificaciones genéticas que permiten el uso de vectores, tales como mutaciones de delección en endonucleasas de restricción o genes de resistencia a antibióticos (tal como *Y. enterocolitica* MRS40, el derivado sensible a la ampicilina de *Y. enterocolitica* E40). Estas cepas contienen ADN cromosómico, así como un plásmido de virulencia no modificado (denominado pYV).
- El término "comprende" se emplea en general en el sentido de incluir, es decir, de permitir la presencia de una o más características o componentes.

Preferiblemente, la cepa bacteriana Gram-negativa es una cepa de *Yersinia*, más preferiblemente una cepa de *Yersinia enterocolitica*. La más preferida es *Yersinia enterocolitica* E40 [13] o sus derivados sensibles a la ampicilina, tal como *Y. enterocolitica* MRS40 según se describe en [36]. También preferiblemente, la cepa bacteriana Gram-negativa es una cepa de *Salmonella*, más preferiblemente una cepa de *Salmonella enterica*. La más preferida es *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* SL1344, según está descrita en la colección de cultivos de la sanidad pública de Inglaterra (NCTC 13347).

En una realización de la presente invención, la señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana comprende una proteína efectora de T3SS bacteriana, o un fragmento N-terminal de esta, en la que la proteína efectora de T3SS, o un fragmento N-terminal de esta, pueden comprender un sitio de unión de chaperona. Una proteína efectora de T3SS, o un fragmento N-terminal de esta, que comprende un sitio de unión de chaperona es particularmente útil como señal de transporte en la presente invención. Las proteínas efectoras de T3SS más preferidas, o los fragmentos N-terminales de esta, son SteA o YopE o un fragmento N-terminal de estas que incluye al menos los primeros 20 aminoácidos de la proteína efectora YopE o al menos los primeros 20 aminoácidos de la proteína efectora SteA, más en particular YopE o un fragmento N-terminal de esta que incluye al menos los primeros 20 aminoácidos de la proteína efectora YopE.

En algunas realizaciones, la señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana codificada por la primera secuencia de ADN comprende la proteína efectora de T3SS bacteriana, o un fragmento N-terminal de esta, en la que el fragmento N-terminal de esta incluye más preferiblemente al menos los primeros 100 aminoácidos de la proteína efectora de T3SS bacteriana.

En algunas realizaciones, la señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana codificada por la primera secuencia de ADN comprende la proteína efectora de T3SS bacteriana, o un fragmento N-terminal de esta, en la que la proteína efectora de T3SS bacteriana, o un fragmento N-terminal de esta, comprende un sitio de unión de chaperona.

Las proteínas efectoras de T3SS más preferidas, o un fragmento N-terminal de esta, que comprenden un sitio de unión de chaperona comprenden las siguientes combinaciones de sitio de unión de chaperona y proteína efectora de T3SS, o un fragmento N-terminal de esta: YopE, o un fragmento N-terminal de esta, que comprende el sitio de unión a chaperona SycE, tal como un fragmento N-terminal de una proteína efectora YopE que contiene los 138 aminoácidos N-terminales de la proteína efectora YopE, denominado en la presente YopE<sub>1-138</sub> y mostrado en SEQ ID NO:2, o SopE, o un fragmento N-terminal de esta, que comprende el sitio de unión a chaperona InvB, tal como un fragmento N-terminal de una proteína efectora SopE que contiene los 81 o 105 aminoácidos N-terminales de la proteína efectora SopE, denominado en la presente SopE<sub>1-81</sub> o SopE<sub>1-105</sub>, respectivamente, y mostrado en SEQ ID NO:142 o 143.

En una realización de la presente invención, la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante es una cepa de *Yersinia*, y la señal de transporte procedente de la proteína efectora de T3SS bacteriana codificada por la primera secuencia de ADN comprende una proteína efectora YopE, o una parte N-terminal de esta, preferiblemente la proteína efectora de *Y. enterocolitica* YopE, o una parte N-terminal de esta. Preferiblemente, el sitio de unión a SycE está comprendido dentro de la parte N-terminal de la proteína efectora YopE. En conexión con esto, un fragmento N-terminal de una proteína efectora YopE puede comprender los 12, 16, 18, 52, 53, 80 o 138 aminoácidos N-terminales [10, 37, 38]. El más preferido es el fragmento N-terminal de una proteína efectora YopE que contiene los 138 aminoácidos N-terminales de la proteína efectora YopE, por ejemplo, como se describe en Forsberg y Wolf-Watz [39], denominado en la presente YopE<sub>1-138</sub> y mostrado en SEQ ID NO:2.

En una realización de la presente invención, la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante es una cepa de *Salmonella*, y la señal de transporte procedente de la proteína efectora de T3SS bacteriana codificada por la primera secuencia de ADN comprende una proteína efectora SopE o SteA, o una parte N-terminal de estas, preferiblemente la proteína efectora de *Salmonella enterica* SopE o SteA, o una parte N-terminal de estas. Preferiblemente, el sitio de unión de chaperona está comprendido dentro de la parte N-terminal de la proteína efectora SopE. En conexión con esto, un fragmento N-terminal de una proteína efectora SopE puede comprender los 81 o 105 aminoácidos N-terminales. Lo más preferido es SteA de longitud completa y un fragmento N-terminal de la proteína efectora SopE que contiene los 105 aminoácidos N-terminales de la proteína efectora, por ejemplo, como se indica en SEQ ID NO: 142 o 143.

Los expertos en la técnica están familiarizados con los métodos para identificar las secuencias polipeptídicas de una proteína efectora que son capaces de transportar una proteína. Por ejemplo, uno de estos métodos es descrito por Sory *et al.* [13]. Brevemente, las secuencias polipeptídicas, por ejemplo, procedentes de diversas porciones de las proteínas Yop, pueden condensarse dentro de marco con una enzima indicadora, tal como el dominio de adenilato ciclase activado por calmodulina (o Cya) de la ciclolisina de *Bordetella pertussis*. El transporte de una proteína híbrida de Yop-Cya hacia el citosol de células eucariotas se indica por la aparición de actividad ciclase en las células eucariotas infectadas que conduce a la acumulación de AMPc. Empleando esta estrategia, los expertos en la técnica pueden determinar, si lo desean, el requisito de secuencia mínima, es decir, una secuencia de aminoácidos contiguos de la longitud más corta que es capaz de transportar una proteína; véase, por ejemplo, [13]. Por consiguiente, las señales de transporte preferidas de la presente invención consisten en al menos la secuencia

mínima de aminoácidos de una proteína efectora de T3SS que es capaz de transportar una proteína.

En una realización, la presente invención proporciona cepas bacterianas Gram-negativas recombinantes mutantes, en particular, cepas bacterianas Gram-negativas recombinantes que son deficientes en la producción de al menos una proteína efectora de T3SS funcional. Según la presente invención, dicha cepa bacteriana Gram-negativa

5 mutante, por ejemplo, una cepa de *Yersinia* mutante, puede generarse introduciendo al menos una mutación en al menos un gen que codifica un efecto. Preferiblemente, dichos genes que codifican efectores incluyen YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM, YopP/YopJ y YopT, por lo que se refiere a una cepa de *Yersinia*. Preferiblemente, dichos genes que codifican efectores incluyen AvrA, CigR, GogB, GtgA, GtgE, PipB, SifB, SipA/SspA, SipB, SipC/SspC, SipD/SspD, SlrP, SopB/SigD, SopA, SpiC/SsaB, SseB, SseC, SseD, SseF, SseG, Ssel/SrfH, SopD, SopE, SopE2, SspH1, SspH2, PipB2, SifA, SopD2, SseJ, SseK1, SseK2, SseK3, SseL, SteC, SteA, SteB, SteD, SteE, SpvB, SpvC, SpvD, SrfJ, SptP, por lo que se refiere a una cepa de *Salmonella*. Los más preferiblemente, todos los genes que codifican efectores se delecionan. Los expertos en la técnica pueden emplear cualquiera de una serie de técnicas convencionales para generar mutaciones en estos genes de efectores de T3SS. Sambrook *et al.* describen, en general, dichas técnicas. Véase, Sambrook *et al.* [40].

10 15 Según la presente invención, la mutación puede generarse en la región del promotor de un gen que codifica un efecto, de modo que la expresión de dicho gen de efecto se abole.

La mutación también puede generarse en la región codificadora de un gen que codifica un efecto, de modo que la actividad catalítica de la proteína efectora codificada es abolida. La "actividad catalítica" de una proteína efectora se refiere normalmente a la función anticélula diana de una proteína efectora, concretamente, toxicidad. Esta actividad 20 25 está gobernada por los motivos catalíticos en el dominio catalítico de una proteína efectora. Las estrategias para identificar el dominio catalítico y/o los motivos catalíticos de una proteína efectora son muy conocidas por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, [41, 42].

Por consiguiente, una mutación preferida de la presente invención es una delección del dominio catalítico entero. Otra 30 35 mutación preferida es una mutación de desplazamiento de marco en un gen que codifica un efecto, de modo que el dominio catalítico no está presente en el producto de proteína expresado a partir de dicho gen "de marco desplazado". La mutación más preferida es una mutación con la delección de la región codificadora completa de la proteína efectora. La presente invención contempla otras mutaciones, tales como delecciones pequeñas o sustituciones de pares de bases, que se generan en los motivos catalíticos de una proteína efectora que conducen a la destrucción de la actividad catalítica de una proteína efectora concreta.

40 45 Las mutaciones que se generan en los genes de las proteínas efectoras de T3SS funcionales pueden introducirse en la cepa concreta por medio de una serie de métodos. Uno de estos métodos implica clonar un gen mutado en un vector "suicida" que es capaz de introducir la secuencia mutada en la cepa a través de intercambio alélico. Un ejemplo de dicho vector "suicida" se describe en [43].

De esta manera, pueden introducirse sucesivamente mutaciones generadas en múltiples genes en una cepa 50 55 bacteriana Gram-negativa para producir un polimutante, por ejemplo, una cepa recombinante mutante sextuple. El orden en que se introducen estas secuencias mutadas no es importante. Bajo algunas circunstancias, puede resultar deseable mutar solo algunos, pero no todos los genes de efectores. Por consiguiente, la presente invención contempla además *Yersinia* polimutantes distintos de *Yersinia* mutantes sextuples, por ejemplo, cepas mutantes dobles, mutantes triples, mutantes cuádruples y mutantes quíntuples. Con el fin de transportar proteínas, el sistema de secreción y translocación de la presente cepa mutante debe estar intacto.

Una cepa bacteriana Gram-negativa recombinante más preferida de la invención es una cepa de *Yersinia* mutante sextuple, en la que todos los genes que codifican efectores están mutados, de modo que la *Yersinia* resultante ya no produce ninguna proteína efectora funcional. Dicha cepa de *Yersinia* mutante sextuple se denomina ΔyopH,O,P,E,M,T para *Y. enterocolitica*. Como ejemplo, dicho mutante sextuple puede producirse a partir de la cepa de *Y. enterocolitica* MRS40 para producir *Y. enterocolitica* MRS40 ΔyopH,O,P,E,M,T, que es preferida.

Otro aspecto de la presente invención se dirige a un vector para su uso en combinación con las cepas bacterianas Gram-negativas recombinantes para transportar una proteína deseada hacia el interior de células eucariotas, en el que el vector comprende, en la dirección 5' a 3':

un promotor;

50 55 una primera secuencia de ADN que codifica una señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana, unida operablemente a dicho promotor, en la que la proteína efectora de T3SS bacteriana se selecciona del grupo que consiste en SopE, SteA y YopE;

una segunda secuencia de ADN que codifica una proteína heteróloga condensada dentro de marco al extremo 3' de dicha primera secuencia de ADN, en la que la proteína heteróloga se selecciona del grupo que consiste en proteínas implicadas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis, reguladores del ciclo celular, proteínas de repetición de anquirina, proteínas indicadoras, GTPasas pequeñas, proteínas relacionadas con GPCR, construcciones de fusión de nanocuerpos, efectores de T3SS bacterianos, efectores de T4SS bacterianos y proteínas víricas; y

opcionalmente, una tercera secuencia de ADN que codifica un sitio de ruptura de proteasa, en la que la tercera secuencia de ADN está localizada entre el extremo 3' de dicha primera secuencia de ADN y el extremo 5' de dicha segunda secuencia de ADN.

El promotor, la proteína heteróloga y el sitio de ruptura de proteasa, tal como se describieron anteriormente, pueden usarse para el vector de la cepa bacteriana Gram-negativa.

Los vectores que pueden usarse según la invención dependen de las cepas bacterianas Gram-negativas usadas como conocen los expertos en la técnica. Los vectores que pueden usarse según la invención incluyen vectores de expresión, vectores para la inserción cromosómica o de un plásmido de virulencia, y fragmentos de ADN para la inserción cromosómica o de un plásmido de virulencia. Los vectores de expresión que son útiles, por ejemplo, en cepas de *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* o *Pseudomonas*, son, por ejemplo, los plásmidos pUC, pBad, pACYC, pUCP20 y pET. Los vectores para la inserción cromosómica o de un plásmido de virulencia que son útiles, por ejemplo, en cepas de *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* o *Pseudomonas*, son, por ejemplo, pKNG101. Los fragmentos de ADN para la inserción cromosómica o de un plásmido de virulencia se refieren a métodos usados, por ejemplo, en cepas de *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* o *Pseudomonas*, tales como, por ejemplo, la modificación genética lambda-rojo. Los vectores para la inserción cromosómica o de un plásmido de virulencia, o los fragmentos de ADN para la inserción cromosómica o de un plásmido de virulencia, pueden insertar la primera, la segunda y/o la tercera secuencia de ADN de la presente invención, de modo que la primera, la segunda y/o la tercera secuencia de ADN está unida operablemente a un promotor endógeno de la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante. Así, si se emplea un vector para la inserción cromosómica o de un plásmido de virulencia, o un fragmento de ADN para la inserción cromosómica o de un plásmido de virulencia, un promotor endógeno puede estar codificado sobre el ADN bacteriano endógeno (ADN cromosómico o plasmídico) y solo la primera y la segunda secuencia de ADN serán proporcionadas por el vector modificado para la inserción cromosómica o de un plásmido de virulencia o por el fragmento de ADN para la inserción cromosómica o de un plásmido de virulencia. Así, no es absolutamente necesario que el vector usado para la transformación de cepas bacterianas Gram-negativas recombinantes comprenda un promotor, es decir, las cepas bacterianas Gram-negativas recombinantes de la presente invención pueden transformarse con un vector que no comprenda un promotor. Preferiblemente se usa un vector de expresión. El vector de la presente invención normalmente se emplea para el transporte de las proteínas heterólogas por el T3SS bacteriano hacia el interior de células eucariotas *in vitro* e *in vivo*.

Un vector de expresión preferido para *Yersinia* se selecciona del grupo que consiste en pBad\_Si\_1 y pBad\_Si\_2. pBad\_Si2 se construye clonando el fragmento SycE-YopE<sub>1-138</sub> que contiene promotores endógenos para YopE y SycE a partir de pYV40 purificado en el sitio KpnI/HindIII de pBad-MychHisA (Invitrogen). Otras modificaciones incluyen la retirada del fragmento Ncol/BglII de pBad-MychHisA mediante digestión, tratamiento con fragmento de Klenow y reacoplamiento. Además, en el extremo 3' de YopE<sub>1-138</sub> se añadieron los siguientes sitios de ruptura: XbaI-Xhol-BstBI-(HindIII). pBad\_Si1 es igual que pBad\_Si2, pero codifica EGFP amplificada a partir de pEGFP-C1 (Clontech) en el sitio Ncol/BglII bajo el promotor inducible de arabinosa.

Un vector de expresión preferido para *Salmonella* se selecciona del grupo que consiste en pSi\_266, pSi\_267, pSi\_268 y pSi\_269. Los plásmidos pSi\_266, pSi\_267, pSi\_268 y pSi\_269 que contienen el correspondiente promotor endógeno y el fragmento SteA<sub>1-20</sub> (pSi\_266), la secuencia SteA de longitud completa (pSi\_267), el fragmento SopE<sub>1-81</sub> (pSi\_268) o el fragmento SopE<sub>1-105</sub> (pSi\_269) se amplificaron a partir del ADN genómico de *S. enterica* SL1344 y se clonaron en el sitio Ncol/KpnI de pBad-MychHisA (Invitrogen).

Los vectores de la presente invención pueden incluir otros elementos de secuencia, tales como una secuencia de terminación 3' (que incluye un codón de fin y una secuencia de poliA), o un gen que confiere resistencia a un fármaco que permite la selección de los transformantes que han recibido el presente vector.

Los vectores de la presente invención pueden transformarse por medio de una serie de métodos conocidos en las cepas bacterianas Gram-negativas recombinantes. Para el objetivo de la presente invención, los métodos de transformación para introducir un vector incluyen, pero no se limitan a electroporación, transformación mediada por fosfato de calcio, conjugación o sus combinaciones. Por ejemplo, un vector puede transformarse en una primera cepa de bacterias mediante un procedimiento de electroporación convencional. Después, dicho vector puede trasladarse desde la primera cepa de bacterias a la cepa deseada mediante conjugación, un proceso denominado "movilización". Los transformantes (es decir, las cepas bacterianas Gram-negativas que han captado el vector) pueden seleccionarse, por ejemplo, con antibióticos. Estas técnicas son muy conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, [13].

Según la presente invención, el promotor del vector de expresión de la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante de la invención puede ser un promotor nativo de una proteína efectora de T3SS de la respectiva cepa, o una cepa bacteriana compatible, o un promotor usado en vectores de expresión que son útiles, por ejemplo, en cepas de *Yersinia*, *Escherichia*, *Salmonella* o *Pseudomonas*, por ejemplo, pUC y pBad. Estos promotores son el promotor de T7, el promotor Plac o el promotor Ara-bad.

Si la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante es una cepa de *Yersinia*, el promotor puede proceder de un gen de virulón de *Yersinia*. Un "gen de virulón de *Yersinia*" se refiere a genes sobre el plásmido de *Yersinia* pYV, cuya

expresión es controlada por la temperatura y por el contacto con una célula diana. Estos genes incluyen genes que codifican elementos de la maquinaria de secreción (los genes Ysc), genes que codifican translocadores (YopB, YopD, y LcrV), genes que codifican elementos de control (YopN, TyeA y LcrG), genes que codifican chaperonas de efectores de T3SS (SycD, SycE, SycH, SycN, SycO y SycT), y genes que codifican efectores (YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM, YopT y YopP/YopJ), así como otras proteínas codificadas por pYV, tales como VirF y YadA.

En una realización preferida de la presente invención, el promotor es el promotor nativo de un gen que codifica un efecto de T3SS funcional. Si la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante es una cepa de *Yersinia*, el promotor se selecciona de uno cualquiera de YopE, YopH, YopO/YpkA, YopM y YopP/YopJ. Más preferiblemente, el promotor es de YopE o SycE.

- 10 5 Si la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante es una cepa de *Salmonella*, el promotor puede proceder de la isla de patogenicidad Spil o Spill, o de una proteína efectora codificada en otra parte. Estos genes incluyen genes que codifican elementos de la maquinaria de secreción, genes que codifican translocadores, genes que codifican elementos de control, genes que codifican chaperonas de efectores de T3SS, y genes que codifican efectores, así como otras proteínas codificadas por SPI-1 o SPI-2. En una realización preferida de la presente invención, el promotor es el promotor nativo de un gen que codifica un efecto de T3SS funcional. Si la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante es una cepa de *Salmonella*, el promotor se selecciona de cualquiera de las proteínas efectoras. Más preferiblemente, el promotor es de SopE, InvB o SteA.

- 20 15 En una realización preferida, el vector de expresión comprende una secuencia de ADN que codifica un sitio de ruptura de proteasa. La generación de un sitio de ruptura funcional y generalmente aplicable permite la escisión de la señal de transporte después de la translocación. Puesto que la señal de transporte puede interferir con la localización y/o la función correctas de la proteína translocada dentro de las células diana, la introducción de un sitio de ruptura de proteasas entre la señal de transporte y la proteína de interés proporciona, por primera vez, el transporte de proteínas casi nativas hacia el interior de células eucariotas. Preferiblemente, el sitio de ruptura de proteasa es un motivo de aminoácidos que es roto por una proteasa, o sus dominios catalíticos, seleccionado del grupo que consiste en enteroquinasa (cadena ligera), enteropeptidasa, proteasa PreScission, proteasa del rinovirus humano 3C, proteasa de TEV, proteasa de TVMV, proteasa de factorXa y trombina, más preferiblemente un motivo de aminoácidos que es roto por la proteasa de TEV. Igualmente preferible, el sitio de ruptura de proteasa es un motivo de aminoácidos que es roto por una proteasa, o sus dominios catalíticos, seleccionado del grupo que consiste en enteroquinasa (cadena ligera), enteropeptidasa, proteasa PreScission, proteasa del rinovirus humano 30 35 30 35 humano 3C, proteasa de TEV, proteasa de TVMV, proteasa de factorXa, proteasa de procesamiento de la ubiquitina, denominada enzima desubiquitinante, y trombina. El más preferido es un motivo de aminoácidos que es roto por la proteasa de TEV o por una proteasa de procesamiento de la ubiquitina.

Así, en otra realización de la presente invención, la proteína heteróloga es escindida de la señal de transporte procedente de la proteína efectora de T3SS bacteriana por una proteasa.

- 35 35 Los métodos preferidos de escisión son métodos en los que:
  - a) la proteasa se transloca hacia el interior de la célula eucariota por una cepa bacteriana Gram-negativa recombinante, como se describe en la presente, que expresa una proteína de fusión que comprende una señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana y la proteasa como proteína heteróloga; o
  - b) la proteasa se expresa de modo constitutivo o transitorio en la célula eucariota.
- 40 Habitualmente, la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante usada para transportar una proteína deseada hacia el interior de una célula eucariota y la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante que transloca la proteasa hacia el interior de la célula eucariota son diferentes.

- 45 45 En una realización de la presente invención, el vector comprende otra secuencia de ADN que codifica una molécula marcadora o un sitio acceptor para una molécula marcadora. Esta otra secuencia de ADN que codifica una molécula marcadora o un sitio acceptor para una molécula marcadora habitualmente está condensada al extremo 5' o al extremo 3' de la segunda secuencia de ADN. Una molécula marcadora o un sitio acceptor para una molécula marcadora preferidos se seleccionan del grupo que consiste en proteína fluorescente verde potenciada (EGFP), cumarina, sitio acceptor de cumarina ligasa, resorufina, sitio acceptor de resorufina ligasa, el motivo de tetra-cisteína, usados con el tinte FIAsh/Reash (Life Technologies). Los más preferidos son resorufina y un sitio acceptor de resorufina ligasa o EGFP. El uso de una molécula marcadora o un sitio acceptor para una molécula marcadora conduce a la unión de una molécula marcadora a la proteína heteróloga de interés, que después puede transportarse, tal como hacia el interior de la célula eucariota, y que permite el seguimiento de la proteína, por ejemplo, mediante microscopía de células vivas.

- 50 55 En una realización de la presente invención, el vector comprende otra secuencia de ADN que codifica un marcador peptídico. Esta otra secuencia de ADN que codifica un marcador peptídico habitualmente está condensada al extremo 5' o al extremo 3' de la segunda secuencia de ADN. Un marcador peptídico preferido se selecciona del grupo que consiste en marcador Myc, marcador His, marcador Flag, marcador HA, marcador Strep o marcador V5, o una combinación de dos o más marcadores de estos grupos. Los más preferidos son el marcador Myc, marcador

Flag, marcador His y marcadores combinados de Myc e His. El uso de un marcador peptídico conduce al seguimiento de la proteína marcada, por ejemplo, mediante inmunofluorescencia o transferencia Western usando anticuerpos antimarcador. Además, el uso de un marcador peptídico permite la purificación por afinidad de la proteína deseada después de la secreción hacia el sobrenadante del cultivo o después de la translocación hacia el interior de células eucariotas, en ambos casos usando un método de purificación ajustado al correspondiente marcador (por ejemplo, purificación por afinidad de metal-quelado usada con un marcador His, o una purificación basada en un anticuerpo anti-Flag cuando se usa el marcador Flag).

En una realización de la presente invención, el vector comprende otra secuencia de ADN que codifica una señal de localización nuclear ("nuclear localization signal", NLS). Esta otra secuencia de ADN que codifica una señal de localización nuclear (NLS) habitualmente está condensada al extremo 5' o al extremo 3' de la segunda secuencia de ADN, en la que dicha otra secuencia de ADN codifica una señal de localización nuclear (NLS). Una NLS preferida se selecciona del grupo que consiste en NLS del antígeno T grande de SV40 y sus derivados [44], así como otras NLS víricas. La más preferida es la NLS del antígeno T grande de SV40 y sus derivados.

En una realización de la presente invención, el vector comprende un sitio de clonación múltiple. El sitio de clonación múltiple habitualmente está localizado en el extremo 3' de la primera secuencia de ADN y/o en el extremo 5' o el extremo 3' de la segunda secuencia de ADN. El vector puede comprender uno o más sitios de clonación múltiple. Un sitio de clonación múltiple preferido se selecciona del grupo de enzimas de restricción que consiste en Xhol, XbaI, HindIII, NcoI, NotI, EcoRI, EcoRV, BamHI, NheI, SacI, SalI, BstBI. Las más preferidas son XbaI, Xhol, BstBI y HindIII.

La proteína expresada a partir de la primera y segunda secuencia de ADN condensadas y, opcionalmente, la tercera secuencia de ADN del vector también se denomina una "proteína de fusión" o una "proteína híbrida", es decir, una proteína de fusión o híbrida de una señal de transporte y una proteína heteróloga. La proteína de fusión también puede comprender, por ejemplo, una señal de transporte y dos o más proteínas heterólogas diferentes.

La presente invención contempla un método para transportar proteínas heterólogas, tal como se describió anteriormente en la presente, hacia el interior de células eucariotas en un cultivo celular, así como *in vivo*.

Así, en una realización, el método para transportar proteínas heterólogas comprende:

i) cultivar la cepa bacteriana Gram-negativa, tal como se describe en la presente;

ii) poner en contacto una célula eucariota con la cepa bacteriana Gram-negativa de i), en el que una proteína de fusión que comprende una señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana y la proteína heteróloga es expresada por la cepa bacteriana Gram-negativa y se transloca hacia el interior de la célula eucariota; y opcionalmente

iii) romper la proteína de fusión, de modo que la proteína heteróloga se escinde de la señal de transporte procedente de la proteína efectora de T3SS bacteriana.

En algunas realizaciones, al menos dos proteínas de fusión que comprenden cada una señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana y una proteína heteróloga son expresadas por la cepa bacteriana Gram-negativa y se translocan hacia el interior de la célula eucariota mediante los métodos de la presente invención.

La cepa bacteriana Gram-negativa recombinante puede cultivarse de modo que una proteína de fusión es expresada, que comprende la señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana y la proteína heteróloga, según métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, FDA, Bacteriological Analytical Manual (BAM), capítulo 8: *Yersinia enterocolitica*). Preferiblemente, la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante puede cultivarse en caldo de cultivo de infusión de cerebro-corazón, por ejemplo a 28 °C. Para la inducción de la expresión de T3SS y, por ejemplo, genes dependientes de los promotores de YopE/SycE, las bacterias pueden cultivarse a 37 °C.

En una realización preferida, la célula eucariota se pone en contacto con dos cepas bacterianas Gram-negativas de i), en las que la primera cepa bacteriana Gram-negativa expresa una primera proteína de fusión que comprende la señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana y una primera proteína heteróloga, y la segunda cepa bacteriana Gram-negativa expresa una segunda proteína de fusión que comprende la señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana y segunda proteína heteróloga, de modo que la primera y la segunda proteína de fusión se translocan hacia el interior de la célula eucariota. Esta realización proporciona la coinfección, por ejemplo, de células eucariotas con dos cepas bacterianas como un método válido para transportar, por ejemplo, dos proteínas híbridas diferentes hacia el interior de células individuales para conseguir su interacción funcional.

La presente invención contempla una amplia gama de células eucariotas que pueden ser la diana de la presente cepa bacteriana Gram-negativa recombinante, por ejemplo, Hi-5 (BTI-TN-5B1-4; Life Technologies B855-02), células HeLa, por ejemplo, HeLa Ccl2 (en ATCC n.º CCL-2), células de fibroblastos, por ejemplo, células de fibroblastos 3T3 (en ATCC n.º CCL-92) o Mef (en ATCC n.º SCRC-1040), Hek (en ATCC n.º CRL-1573), HUVEC (en ATCC n.º PCS-

100-013), CHO (en ATCC n.º CCL-61), Jurkat (en ATCC n.º TIB-152), Sf-9 (en ATCC n.º CRL-1711), HepG2 (en ATCC n.º HB-8065), Vero (en ATCC n.º CCL-81), MDCK (en ATCC n.º CCL-34), THP-1 (en ATCC n.º TIB-202), J774 (en ATCC n.º TIB-67), RAW (en ATCC n.º TIB-71), Caco2 (en ATCC n.º HTB-37), líneas de células NCI (en ATCC n.º HTB-182), DU145 (en ATCC n.º HTB-81), Lncap (en ATCC n.º CRL-1740), MCF-7 (en ATCC n.º HTB-22), 5 líneas celulares MDA-MB (en ATCC n.º HTB-128), PC3 (en ATCC n.º CRL-1435), T47D (en ATCC n.º CRL-2865), A549 (en ATCC n.º CCL-185), U87 (en ATCC n.º HTB-14), SHSY5Y (en ATCC n.º CRL-2266s), Ea.Hy926 (en ATCC n.º CRL-2922), Saos-2 (en ATCC n.º HTB-85), 4T1 (en ATCC n.º CRL-2539), B16F10 (en ATCC n.º CRL-6475), o 10 hepatocitos humanos primarios (en Life Technologies HMCPIS), preferiblemente HeLa, Hek, HUVEC, 3T3, CHO, Jurkat, Sf-9, HepG2 Vero, THP-1, Caco2, Mef, A549, 4T1, B16F10 y hepatocitos humanos primarios, y lo más preferiblemente HeLa, Hek, HUVEC, 3T3, CHO, Jurkat, THP-1, A549 y Mef. La "diana" significa la adhesión extracelular de la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante a una célula eucariota.

Según la presente invención, el transporte de una proteína puede lograrse poniendo en contacto una célula eucariota con una cepa bacteriana Gram-negativa recombinante bajo condiciones apropiadas. Diversas referencias bibliográficas y técnicas están disponibles para los expertos en la técnica con respecto a las condiciones para inducir 15 la expresión y la translocación de genes de virulones, que incluyen la temperatura deseada, la concentración de Ca<sup>++</sup>, la adición de inductores, tales como rojo Congo, la forma en que se mezclan la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante y las células diana, y similares. Véase, por ejemplo, [45]. Las condiciones pueden variar dependiendo del tipo de células eucariotas que se van a tratar y la cepa bacteriana recombinante que se va a usar. Los expertos en la técnica pueden lograr estas variaciones usando técnicas convencionales.

20 Los expertos en la técnica también pueden usar una serie de ensayos para determinar si el transporte de una proteína de fusión ha tenido éxito. Por ejemplo, la proteína de fusión puede detectarse mediante inmunofluorescencia usando anticuerpos que reconocen un marcador condensado (tal como un marcador Myc). La determinación también puede basarse en la actividad enzimática de la proteína que se está transportando, por ejemplo, el ensayo descrito en [13].

25 En una realización, la presente invención proporciona un método para purificar una proteína heteróloga, que comprende cultivar la cepa bacteriana Gram-negativa, como se describe en la presente, de modo que una proteína de fusión que comprende una señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana y la proteína heteróloga se expresa y se segregá hacia el sobrenadante del cultivo. La proteína de fusión expresada 30 puede comprender además un sitio de ruptura de proteasa entre la señal de transporte procedente de la proteína efectora de T3SS bacteriana y la proteína heteróloga y/o puede comprender además un marcador peptídico.

Así, en una realización particular, el método para purificar una proteína heteróloga comprende:

- i) cultivar la cepa bacteriana Gram-negativa, como se describe en la presente, de modo que una proteína de fusión que comprende una señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana, la proteína heteróloga y un sitio de ruptura de proteasa entre la señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana y la proteína heteróloga, se expresa y se segregá hacia el sobrenadante del cultivo;
- ii) añadir una proteasa al sobrenadante del cultivo, en el que la proteasa rompe la proteína de fusión, de modo que la proteína heteróloga se escinde de la señal de transporte procedente de la proteína efectora de T3SS bacteriana;
- iii) opcionalmente, aislar la proteína heteróloga del sobrenadante del cultivo.

Así, en otra realización particular, el método para purificar una proteína heteróloga comprende:

- i) cultivar la cepa bacteriana Gram-negativa, como se describe en la presente, de modo que una proteína de fusión que comprende una señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana, la proteína heteróloga y un marcador peptídico se expresa y se segregá hacia el sobrenadante del cultivo;
- ii) detectar el marcador peptídico, por ejemplo, mediante una purificación en columna de afinidad del sobrenadante.

Así, en otra realización particular, el método para purificar una proteína heteróloga comprende:

- i) cultivar la cepa bacteriana Gram-negativa, como se describe en la presente, de modo que una proteína de fusión que comprende una señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana, la proteína heteróloga, un sitio de ruptura de proteasa entre la señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana y la proteína heteróloga, y un marcador peptídico, se expresa y se segregá hacia el sobrenadante del cultivo;
- ii) añadir una proteasa al sobrenadante del cultivo, en el que la proteasa rompe la proteína de fusión, de modo que la proteína heteróloga se escinde de la señal de transporte procedente de la proteína efectora de T3SS bacteriana;
- ii) detectar el marcador peptídico, por ejemplo, mediante una purificación en columna de afinidad del sobrenadante.

En las realizaciones particulares descritas anteriormente, la proteasa puede añadirse al sobrenadante del cultivo en forma, por ejemplo, de una proteína de proteasa purificada o añadiendo una cepa bacteriana que expresa y segregá

una proteasa hacia el sobrenadante del cultivo. Otras etapas pueden incluir la retirada de la proteasa, por ejemplo, mediante una purificación en columna de afinidad.

En una realización, la presente invención proporciona la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante, como se describe en la presente, para su uso en medicina.

- 5 En una realización, la presente invención proporciona la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante, como se describe en la presente, para su uso en el transporte de una proteína heteróloga como un medicamento o una vacuna a un sujeto. La proteína heteróloga puede administrarse a un sujeto como una vacuna, poniendo en contacto la cepa bacteriana Gram-negativa con células eucariotas, por ejemplo, con un animal vivo *in vivo*, de modo que la proteína heteróloga se transloca hacia el interior del animal vivo, que después produce anticuerpos contra la proteína heteróloga. Los anticuerpos producidos pueden usarse directamente o pueden aislarse y purificarse y usarse en diagnósticos, en un uso para la investigación, así como en terapia. Las células B que producen los anticuerpos o la secuencia de ADN contenida en su interior pueden usarse para la producción posterior de anticuerpos específicos para su uso en diagnósticos, en un uso para la investigación, así como en terapia.
- 10 15 En una realización, la presente invención proporciona un método para transportar una proteína heteróloga, en el que la proteína heteróloga se transporta *in vitro* hacia el interior de una célula eucariota.

En otra realización, la presente invención proporciona un método para transportar una proteína heteróloga, en el que la célula eucariota es un animal vivo, en el que el animal vivo se pone en contacto con la cepa bacteriana Gram-negativa *in vivo* de modo que una proteína de fusión se transloca hacia el interior del animal vivo. El animal preferido es un mamífero, más preferiblemente un ser humano.

- 20 En otra realización, la presente invención proporciona el uso de la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante, como se describe anteriormente, para selecciones de alta capacidad de procesamiento de inhibidores de una vía celular o acontecimiento activado por la proteína o proteínas heterólogas translocadas.

En otra realización, la presente invención proporciona un banco de cepas bacterianas Gram-negativas, en el que la proteína heteróloga codificada por la segunda secuencia de ADN del vector de expresión de las cepas bacterianas Gram-negativas es una proteína humana o murina, preferiblemente una proteína humana, y en el que cada proteína humana o murina expresada por las cepas bacterianas Gram-negativas tiene una secuencia de aminoácidos diferente. Un posible banco puede contener, por ejemplo, la colección de quinasas Orf humanas de Addgene que contiene 560 proteínas (Addgene n.º 1000000014). Como vector de clonación para la expresión, pueden usarse los vectores de expresión descritos anteriormente.

- 30 En otra realización, la presente invención proporciona un kit que comprende un vector, tal como se describe en la presente, y una cepa bacteriana que expresa y segregá una proteasa capaz de romper el sitio de ruptura de proteasa comprendido en el vector. Un vector particularmente útil es un vector para su uso en combinación con la cepa bacteriana para transportar una proteína deseada hacia el interior de células eucariotas, tal como se describió anteriormente, en el que el vector comprende, en la dirección 5' a 3':

35 un promotor;

una primera secuencia de ADN que codifica una secuencia de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana, unida operablemente a dicho promotor;

una segunda secuencia de ADN que codifica una proteína heteróloga condensada dentro de marco al extremo 3' de dicha primera secuencia de ADN; y, como alternativa,

- 40 una tercera secuencia de ADN que codifica un sitio de ruptura de proteasa, en la que la tercera secuencia de ADN está localizada entre el extremo 3' de dicha primera secuencia de ADN y el extremo 5' de dicha segunda secuencia de ADN.

### Ejemplos

Ejemplo 1

- 45 A) Materiales y métodos

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento. Las cepas usadas en este estudio se listan en las figuras 15A a N. *E. coli* Top 10, usada para la purificación y la clonación de plásmidos, y *E. coli* Sm10λ pir, usada para la conjugación, así como *E. coli* BW19610 [46], usada para propagar pKNG101, se cultivaron del modo habitual sobre placas de agar LB y en caldo de cultivo LB a 37 °C. Se empleó ampicilina a una concentración de 200 µg/ml (*Yersinia*) o 100 µg/ml (*E. coli*) para seleccionar vectores de expresión. Se usó estreptomicina a una concentración de 100 µg/ml para seleccionar vectores suicidas. *Y. enterocolitica* MRS40 [36], un derivado de E40 no resistente a la ampicilina [13] y cepas derivadas de este fueron cultivados del modo habitual en infusión de cerebro-corazón ("Brain Heart Infusion", BHI; Difco) a temperatura ambiente. A todas las cepas de *Y. enterocolitica* se le añadió ácido nalidíxico (35 µg/ml) y todas las cepas de *Y. enterocolitica* *asd* fueron suplementadas además con 100 µg/ml de ácido *meso*-2,6-

diaminopimélico (mDAP, Sigma Aldrich). Se cultivó *S. enterica* SL1344 del modo habitual sobre placas de agar LB y en caldo de cultivo LB a 37 °C. Se empleó ampicilina a una concentración de 100 µg/ml para seleccionar vectores de expresión en *S. enterica*.

Manipulaciones genéticas de *Y. enterocolitica*.

- 5 Se han descrito manipulaciones genéticas de *Y. enterocolitica* [47, 48]. Brevemente, se construyeron mutadores para la modificación o la delección de genes en los plásmidos pYV o sobre el cromosoma mediante una PCR solapante de 2 fragmentos usando el plásmido pYV40 purificado o ADN genómico como molde, obteniéndose 200-250 pb de secuencias flanqueantes en ambos lados de la parte deletreada o modificada del respectivo gen. Los fragmentos resultantes se clonaron en pKNGI01 [43] en *E. coli* BW19610 [46]. Los plásmidos con la secuencia verificada se transformaron en *E. coli* SmI0 λ pir, a partir del cual los plásmidos fueron movilizados hacia el interior de la correspondiente cepa de *Y. enterocolitica*. Los mutantes que portan el vector integrado se propagaron durante varias generaciones sin presión selectiva. Despues se usó sacarosa para seleccionar los clones que habían perdido el vector. Por último, los mutantes se identificaron mediante PCR de colonias.
- 10

Construcción de plásmidos.

- 15 Se usaron los plásmidos pBad\_Si2 o pBad\_Si1 (figura 10) para la clonación de proteínas de fusión con los 138 aminoácidos N-terminales de YopE (SEQ ID NO:2). Se construyó pBad\_Si2 mediante la clonación del fragmento SycE-YopE<sub>1-138</sub> que contiene promotores endógenos para YopE y SycE a partir de pYV40 purificado en el sitio KpnI/HindIII de pBad-MycHisA (Invitrogen). Otras modificaciones incluyen la retirada del fragmento Ncol/BglII de pBad-MycHisA mediante digestión, tratamiento con fragmento de Klenow y reacoplamiento. Un terminador 20 transcripcional bidireccional (BBa\_B1006; iGEM Foundation) se clonó en el sitio cortado con KpnI y tratado con Klenow (pBad\_Si2) o el sitio cortado con BglII (pBad\_Si1). Además, en el extremo 3' de YopE<sub>1-138</sub> se añadieron los siguientes sitios de ruptura: XbaI-Xhol-BstBI-(HindIII) (figura 10 B). pBad\_Si1 es igual que pBad\_Si2, pero codifica EGFP amplificada a partir de pEGFP-C1 (Clontech) en el sitio Ncol/BglII bajo el promotor inducible de arabinosa. Los plásmidos pSi\_266, pSi\_267, pSi\_268 y pSi\_269 que contienen el correspondiente promotor endógeno y el fragmento SteA<sub>1-20</sub> (pSi\_266), la secuencia SteA de longitud completa (pSi\_267), el fragmento SopE<sub>1-81</sub> (pSi\_268) o el fragmento SopE<sub>1-105</sub> (pSi\_269) se amplificaron a partir del ADN genómico de *S. enterica* SL1344 y se clonaron en el sitio Ncol/KpnI de pBad-MycHisA (Invitrogen).
- 25

- 30 Los genes de longitud completa, o sus fragmentos, se amplificaron con los cebadores específicos listados en la siguiente tabla I y se clonaron como fusiones con YopE<sub>1-138</sub> en el plásmido pBad\_Si2 o, en el caso de z-BIM (SEQ ID NO:21), en pBad\_Si1 (véase la siguiente tabla II). Para la fusión con SteA o SopE, construcciones de ADN sintético fueron rotas por KpnI/HindIII y clonadas en pSi\_266, pSi\_267, pSi\_268 o pSi\_269, respectivamente. En el caso de genes de especies bacterianas, se usó ADN genómico purificado como molde (*S. flexneri* M90T, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* SL1344, *Bartonella henselae* ATCC 49882). Para genes humanos se usó un banco de ADNc universal (Clontech), si no se indica lo contrario (figuras 15A a N), y los genes de pez cebra se 35 amplificaron a partir de un banco de ADNc (un amable obsequio de M. Affolter). Los plásmidos acoplados se clonaron en *E. coli* Top 10. Los plásmidos secuenciados se electroporaron en la cepa deseada de *Y. enterocolitica* o *S. enterica* usando los mismos ajustes que para la electroporación de *E. coli* convencional.

# ES 2 754 508 T3

Tabla I (Cebador No. Si- Secuencia

285:	CATACCATTGGAGTGAGCAAGGGCGAG
286:	GGAAAGATCTTACCTTGTACAAGTCGTCAT
287:	GGGGGTACCTCAACTAAATGACCCGGGTG
288:	GTTAAAGCTTlbgalclagaclogcgCGTGGGAACCTGGTC
289:	CAGTddgagCAAATCTAACAAAATACCTCCAC
290:	cagtTCGAATTAAATTGATTGCTTGACGG
291:	CAGTddgagCTAACATAACATATCACCCAG
292:	GTTAAAGCTTlCAGGAGSGATTCGAAG
293:	CAGTddgagCTAGGGCGATTCGAAG
294:	GTTAAAGCTTACATTCTAACATACATAC
295:	CAGTddgagCTAGGGCGATTCGAAG
296:	cagtTCGAATTAAATTGATTGATTCAGTCA
297:	CAGTddgagCTAGGGCGATTCGAAG
298:	cagtTCGAATTAAATTGATTGATTCAGTCA
299:	CAGTddgagCTAGGGCGATTCGAAG
300:	cagtTCGAATTAAATTGATTGATTCAGTCA
301:	CAGTddgagCTAGGGCGATTCGAAG
302:	cagtTCGAATTAAATTGATTGATTCAGTCA
303:	GTTAAAGCTTlCAGGAGSGATTCGAAG
304:	GTTAAAGCTTCAAGATGTGATTATGAAAGAAATG
305:	cagtTCGAACCCATAAAAAAAGCCCTGTC
306:	GTTAAAGCTTCAACTCTATCATCAACCGATAAAATGg
307:	CAGTddgagCTCACTCAAGAAACGCGAA
308:	cagtTCGAATTTCCTCTCTCTCTCTCAcg
309:	cgtlACTAGAAAAATGATGAAATGGAGACTG
310:	GTTAAAGCTTlAGCTGGAGACGSGTGAC
311:	CAGTddgagTCCAGATCTCACTGGAGTTG
312:	GTTAAAGCTTCACTGGAGGGGG
313:	CAGTddgagTCACTGGAGTTACTCATGAAACTACTTTTGAG
314:	ggccggatcccaggcgldggggdla
315:	CATTATTCTCCCTAGTTAGTCACagcaadgdgdcdlc
316:	garaggaggcaggcgldgtGACTTAACTAGGGAGAAATAATG
317:	cgallccagggttcilicCATTTCCCTCCAGGTACTA
318:	TAGTACCTGAGGGAAATTGagaagaaacggcgac
319:	cgtlCTAGAGggllaggcgacaliccgatCTAGACTAAAGTATGAGGAGAGAAATTGAA
320:	GTTAAAGCTTCACTGGCCGTCST
321:	CGTAdagAGACCGTTCCCTGGTGC
322:	cgtlCTAGAGggllaggcgacaliccgatCTAGACTAAAGTATGAGGAGAGAAATTGAA
323:	GTTAAAGCTTGCCTGGAGACGGTAGC
324:	CGTAldagATGAGACTGAGGTCGAGGTAG
325:	CGTAldagATGAGACTGAGGTCGAGGTAGCAA
326:	
327:	
328:	
329:	
330:	
331:	
332:	
333:	
334:	
335:	
336:	
337:	
338:	
339:	
340:	
341:	
342:	
343:	
344:	
345:	
346:	
347:	
348:	
349:	
350:	
351:	
352:	
353:	
354:	
355:	
356:	
357:	
358:	
359:	
360:	
361:	
362:	
363:	
364:	
365:	
366:	
367:	
368:	
369:	
370:	
371:	
372:	
373:	
374:	
375:	
376:	
377:	
378:	
379:	
380:	
381:	
382:	
383:	
384:	
385:	
386:	
387:	

(continuación)

(continuación)

482: CGTAatcagaATGGCGCTGCAGC  
 483: GTAAAGCTTCAGTCATTGACAGGAATTTC  
 486: CGTAatcagaATGGAGCCGGGGCG  
 487: GTAAAGCTTCATACTGGGATGTCTg  
 482: CGTAatcagaATGCCGAGGAGAACAGGG  
 483: GTAAAGCTTCAGTCCCCGTGGCTGTGc  
 494: CGTAatcagaATGCCGAGGCCCTG  
 495: GTAAAGCTTbTTGAAGATTGGGCTCC  
 504: CGTAtctagaGAAAATCTGTATTITCAAAAGTGAATCTGTATTITCAAAGTATGC  
 CCCGGCCC  
 505: GTAAAGCTTCCCCACCGTACTCGTCAAATtc  
 508: CGTAtctagaGAAAATCTGTATTITCAAAGTGAATCTGTATTITCAAAGTATGG  
 CCGAGCCTTG  
 509: GTAAAGCTTGAAGATTGGCTCC  
 511: CGTAtctagaGAAAATCTGTATTITCAAAGTGAATCTGTATTITCAAAGTGTGA  
 GCAAGGGCGAG  
 512: CGTAtctagaGAAAATCTGTATTITCAAAGTGAATCTGTATTITCAAAGTCCGC  
 CGAAAAAAACGTAAAGTTGTGAGCAAGGGCGAG  
 513: GTAAAGCTTAAACTTACGTTTTTCGGGGCTGTACAGCTCGTCAAT  
 515: CGTAtctagaGAAAATCTGTATTITCAAAGTGAATCTGTATTITCAAAGTGTATT  
 ATAAAGATGATGATAAAATGGCGAGCCTG  
 558: CGTATCTAGAAATGACCAGTTTGAAGATGC  
 559: GTAAAGCTTCATGACTCATTTCATCCAT  
 561: CGTATCTAGAAATGAGTCTCTTAAACTGTGAGAACAG  
 562: GTAAAGCTTCACACCCCGCATCA  
 cagccatggATTATGGTCATAGATATGACCTC  
 CAGTctcgatATGCAGATCTTCGTCAAGAC  
 GTAAAGCTTgtatgcgtaaAccCACACGTAGACGTAAAGAC  
 cagtTCGAAGATTATAAAAGATGATGATAAAATGGCCGAGCCTG

(continuación)

612: CGGGGTACCAAGGAGCTATTTCGAAAG  
 613: CGGGGTACCAAGGAGCTATTTCGAAAG  
 614: catggcaggCGCAAGGGCTCTC  
 615: egggdaccTTTATTTGTCAACACTGCC  
 616: qgggtaacctGCGGGTCTTTACTCG  
 677:TTACTATTTCGAAGGAAATTATTCATAAATATTGCCGCCATCTGCCCAAATTGGT  
 GATGAAATGGATCATTAAAGCTTGGAGTA  
 678:TACTCCAAGCTTAATGATCCATTTCATCACCAATTGGCCAGATGGGGCA  
 ATATTATGAATAATTTCITCGAATAGTAA  
 682:TTACTACTCGAGAAAAAAACTGAGCGAATGTCTGCGCCGATTGGTGAACT  
 GGATAGCTAAGCTTGGAGTA  
 683:TACTCCAAGCTTAGCTATCCAGTTCATCACCAATGGGGCAGACATTGCTC  
 AGTTTTCTCGAGTAGTAA

Tabla II: Proteínas de fusión clonadas

Proteína que va a ser transportada por T3SS	SEQ ID NO: de la proteín	Esqueleto del plásmido	Nombre del plásmido resultante	n.º de secuencia del cebador	Cebadores, SEQ ID NO:
YopE1-138-MycHis	3	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_1	285/286 (EGFP), 287/288 (sycE-YopE1-138)	44/45 y 46/47
YopE1-138-MycHis	3	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_2	287/288 (sycE-YopE1-138)	46/47
YopE1-138-IpgB1	4	pBad_Si_2	pSi_16	292/293	48/49
YopE1-138-SopE	5	pBad_Si_2	pSi_20	296/297	50/51
YopE1-138-Rac1 Q61L	26	pBad_Si_2	pSi_22	299/300	52/53
YopE1-138-RhoA Q61E	27	pBad_Si_2	pSi_24	301/302	54/55
YopE1-138-SopE-MycHis	135	pBad_Si_2	pSi_28	296/306	50/56
YopE1-138-SopB	6	pBad_Si_2	pSi_30	307/308	57/58
YopE1-138-FADD	28	pBad_Si_2	pSi_37	367/386	76/79
YopE1-138-OspF	7	pBad_Si_2	pSi_38	317/318	59/60
YopE1-138-BepG 715-end	136	pBad_Si_2	pSi_43	324/351	61/67
YopE1-138-Rac1 Q61L-MycHis	137	pBad_Si_2	pSi_51	299/339	52/62
YopE1-138-Slmb1-VhH4	32	pBad_Si_2	pSi_53	341/342	63/64
YopE1-138-Bad	29	pBad_Si_2	pSi_57	346/347	65/66
YopE1-138-SptP	8	pBad_Si_2	pSi_64	364/365	74/75
YopE1-138-NLS-Slmb1-VhH4	33	pBad_Si_2	pSi_70	369/342	77/64
YopE1-138-Bid	24	pBad_Si_2	pSi_85	387/391	80/82
YopE1-138-t-Bid	25	pBad_Si_2	pSi_87	389/391	81/82
YopE1-138-Caspasa3 p17	22	pBad_Si_2	pSi_97	403/406	83/84
YopE1-138-GPCR GNA12	30	pBad_Si_2	pSi_103	410/413	85/86
YopE1-138-Caspasa3 p10/12	23	pBad_Si_2	pSi_106	417/420	87/88
YopE1-138-IpgD	9	pBad_Si_2	pSi_111	423/424	89/90
YopE1-138-Slmb1-VhH4-NLS	34	pBad_Si_2	pSi_112	341/425	63/91
YopE1-138-z-Bid	19	pBad_Si_2	pSi_116	428/430	92/94
YopE1-138-z-t-Bid	20	pBad_Si_2	pSi_117	429/430	93/94

# ES 2 754 508 T3

YopE1-138-BepA E305-end	11	pBad_Si_2	pSi_118	433/435	95/97
YopE1-138-BepA	10	pBad_Si_2	pSi_119	434/435	96/97
YopE1-138-ET1	36	pBad_Si_2	pSi_120	436/437	98/99
YopE1-138-z-BIM	21	pbad_Si_1	pSi_121	438/439	100/101
YopE1-138-VhH4 nanocuerpo que reconoce EGFP	31	pBad_Si_2	pSi_124	451/373	108/78
YopE1-138-protease de TEV S219V	42	pBad_Si_2	pSi_132	463/464	109/110
YopE1-138-EGFP	37	pBad_Si_2	pSi_140	477/476	112/111
YopE1-138-Cdkl	14	pBad_Si_2	pSi_143	478/479	113/114
YopE1-138-Mad2	15	pBad_Si_2	pSi_145	482/483	115/116
YopE1-138-Ink4A	16	pBad_Si_2	pSi_147	486/487	117/118
YopE1-138-Ink4B	17	pBad_Si_2	pSi_150	492/493	119/120
YopE1-138-nk4C	18	pBad_Si_2	pSi_151	494/495	121/122
YopE1-138-TIFA	13	pBad_Si_2	pSi_153	558/559	131/132
YopE1-138-2xsitio TEV-ET1	41	pBad_Si_2	pSi_156	504/505	123/124
YopE1-138- 2xsitioTEV-EGFP- NLS	39	pBad_Si_2	pSi_159	511/513	127/129
YopE1-138-2xsitio TEV-NLS-EGFP	38	pBad_Si_2	pSi_160	512/476	128/111
YopE1-138-2xsitio TEV-INK4C	40	pBad_Si_2	pSi_161	508/509	125/126
YopE1-138-2xsitio TEV-Flag -INK4C	43	pBad_Si_2	pSi_164	515/509	130/126
YopE1-138-Traf6 murino	12	pBad_Si_2	pSi_166	561/562	133/134
YopE1-138-parte BH3 de tBid murina con codones optimizados para <i>Y. enterocolitica</i>	138	pBad_Si_2	pSi_318	677/678	148/149
YopE1-138- parte BH3 de Bax murina con codones optimizados para <i>Y. enterocolitica</i>	139	pBad_Si_2	pSi_322	682/683	150/151
SteA1-20	140	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_266	580/612	152/153
SteA	141	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_267	580/613	152/154
SopE1-81	142	pBad-MycHisA	pSi_268	614/615	155/156

# ES 2 754 508 T3

		(Invitrogen)			
SopE1-105	143	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_269	614/616	155/157
SteA1-20-tBid murina con codones optimizados para <i>S. enterica</i>	144	pSi_266	pSi_270	construcción sintética	/
SteA-tBid murina con codones optimizados para <i>S. enterica</i>	145	pSi_267	pSi_271	construcción sintética	/
SopE1-81-tBid murina con codones optimizados para <i>S. enterica</i>	146	pSi_268	pSi_272	construcción sintética	/
SopE1-105-tBid murina con codones optimizados para <i>S. enterica</i>	147	pSi_269	pSi_273	construcción sintética	/
YopE1-138-Ink4A 84-103 con codones optimizados para <i>Y. enterocolitica</i>	158	pBad_Si_2	pSi_362	745/746	172/173
YopE1-138-p107/RBL1 657-662 (AAA02489.1) con codones optimizados para <i>Y. enterocolitica</i>	159	pBad_Si_2	pSi_363	747/748	174/175
YopE1-138-p21 141-160 (AAH13967.1) con codones optimizados para <i>Y. enterocolitica</i>	160	pBad_Si_2	pSi_364	749/750	176/177
YopE1-138-p21 145-160 (AAH13967.1) con codones optimizados para <i>Y. enterocolitica</i>	161	pBad_Si_2	pSi_366	753/754	178/179
YopE1-138-p21 17-33 (AAH13967.1) con codones optimizados para <i>Y. enterocolitica</i>	162	pBad_Si_2	pSi_367	755/756	180/181
YopE1-138-ciclina D2 139-147 (CAA48493.1) con codones optimizados para <i>Y. enterocolitica</i>	163	pBad_Si_2	pSi_368	757/758	182/183
SteA-Ink4a-MycHis	164	pSi_267	pSi_333	703/704	184/185
SopE1-105-Ink4a-MycHis	165	pSi_269	pSi_334	703/704	184/185
SteA-Ink4c-MycHis	166	pSi_267	pSi_335	PCR1: 705/706; PCR2: 707/708; PCR solapante: 705/708	186/187, 188/189

SopE1-105-Ink4c-MycHis	167	pSi_269	pSi_336	PCR1: 705/706; PCR2: 707/708; PCR solapante: 705/708	186/187, 188/189
SteA-Mad2-MycHis	168	pSi_267	pSi_337	709/710	190/191
SopE1-105-Mad2-MycHis	169	pSi_269	pSi_338	709/710	190/191
SteA-Cdk1-MycHis	170	pSi_267	pSi_339	711/712	192/193
SopE1-105-Cdk1-MycHis	171	pSi_269	pSi_340	711/712	192/193
YopE1-138-tBid murina con codones optimizados para <i>Y. enterocolitica</i>	194	pBad_Si_2	pSi_315	construcción sintética	/
YopE1-138-Ubiquitina	195	pBad_Si_2	pSi_236	585/586	197/198
YopE1-138-Ubiquitina-Flag-INK4C-MycHis	196	pSi_236	pSi_237_II	588/509	199/126

## Secreción de Yop.

La inducción del regulón *yop* se realizó desplazando el cultivo hasta 37 °C en BHI-Ox (condiciones permisivas a la secreción) [49]. Como fuente de carbono se añadió glucosa (4 mg/ml).

- 5 Las fracciones de células totales y del sobrenadante se separaron mediante centrifugación a 20 800 g durante 10 min a 4 °C. El sedimento celular se tomó como la fracción de células totales. Las proteínas en el sobrenadante se precipitaron con ácido tricloroacético al 10% (en p/v) final durante 1 h a 4 °C. Después de una centrifugación (20 800 g durante 15 min) y la retirada del sobrenadante, el sedimento resultante se lavó en acetona enfriada en hielo durante la noche. Las muestras se volvieron a centrifugar, el sobrenadante se rechazó, y el sedimento se secó al aire y se resuspendió en 1×SDS tinte de carga.
- 10 Las proteínas segregadas se analizaron mediante SDS-PAGE; en cada caso, se cargaron las proteínas segregadas por  $3 \times 10^8$  bacterias por carril. Se realizó la detección de las proteínas segregadas específicas mediante inmunotransferencia usando geles de SDS-PAGE al 12,5%. Para la detección de las proteínas en células totales, se cargaron  $2 \times 10^8$  bacterias por carril, si no se indica lo contrario, y las proteínas se separaron en geles de SDS-PAGE al 12,5% antes de la detección mediante inmunotransferencia.
- 15 La inmunotransferencia se realizó usando anticuerpos monoclonales de rata contra YopE (MIPA193-13A9; 1:1000, [50]). El antisero se preabsorbió dos veces durante la noche contra *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* para reducir la tinción del fondo. La detección se realizó con anticuerpos secundarios dirigidos contra anticuerpos de rata y conjugados con peroxidasa de rábano (1:5000; Southern Biotech), antes del revelado con sustrato quimioluminiscente ECL (LumiGlo, KPM).
- 20 Cultivo celular e infecciones.
- 25 Se cultivaron HeLa Ccl2, células de fibroblastos Swiss 3T3, 4T1, B16F10 y D2A1 en medio de Eagle modificado de Dulbecco ("Dulbecco's Modified Eagle Medium", DMEM) suplementado con FCS al 10% y L-glutamina 2 mM (cDMEM). Las HUVEC se aislaron y se cultivaron como se ha descrito [51]. Se cultivaron células Jurkat y 4T1 en RPMI 1640 suplementado con FCS al 10% y L-glutamina 2 mM. Se cultivaron *Y. enterocolitica* en BHI con aditivos durante la noche a temperatura ambiente, se diluyeron en BHI fresco hasta una DO<sub>600</sub> de 0,2 y se cultivaron durante 2 h a temperatura ambiente antes de desplazar la temperatura hasta 37 °C en un agitador de baño de agua durante 30 min más o durante 1 h en el caso de transporte de EGFP. Por último, las bacterias se recolectaron mediante centrifugación (6000 rcf, 30 seg) y se lavaron una vez con DMEM suplementado con HEPES 10 mM y L-glutamina 2 mM. Se cultivaron *S. enterica* en LB con aditivos durante la noche a 37 °C y se diluyeron 1:40 en LB fresco y se cultivaron durante 2,5 h a 37 °C (condiciones inductoras de Spil T3SS) o el cultivo de la noche se incubó aún más a 37 °C (condiciones inductoras de Spill T3SS). Por último, las bacterias se recolectaron mediante centrifugación (6000 rcf, 30 seg) y se lavaron una vez con DMEM suplementado con HEPES 10 mM y L-glutamina 2 mM. Las células sembradas en placas de 96 pocillos (para la inmunofluorescencia) o de 6 pocillos (para la transferencia Western) se infectaron a las MOI indicadas en DMEM suplementado con HEPES 10 mM y L-glutamina 2 mM.
- 30
- 35

Después de añadir las bacterias, las placas se centrifugaron durante 1 min a 1750 rpm y se colocaron a 37 °C durante los períodos de tiempo indicados. Las bacterias extracelulares se mataron con gentamicina (100 mg/ml) si se indica. En el caso del análisis de inmunofluorescencia, los ensayos de infección se detuvieron mediante fijación con PFA al 4%. Para los análisis de transferencia Western, las células se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo y se añadió tampón de lisis Phospho-safe (Novagen) para lisar las células. Después de la incubación en hielo, las células se centrifugaron (16 000 rcf, 25 min, 4 °C). Los sobrenadantes se recolectaron y se analizaron para el contenido en proteínas totales mediante el ensayo de Bradford BCA (Pierce) antes de una SDS-PAGE y una transferencia Western usando anticuerpos anti-fosfo-Akt (Ser473 y T308, ambos Cell Signaling), antiactina (Millipore), anti-Bid (Cell Signaling), anti-Myc (Santa Cruz), anti-p38 (Cell Signaling), anti-fosfo-p-38 (Thr180/Tyr182; Cell Signaling), anticaspasa-3 p17 (Cell Signaling) y anti-Ink4C (Cell Signaling).

#### Análisis de la secreción con *S. enterica*.

Para la inducción de la secreción de proteínas por *S. enterica*, *S. enterica* fue cultivada durante la noche en LB que contenía NaCl 0,3 M en un agitador orbital (ajustado a 150 rpm). Después *S. enterica* se diluyó 1:50 en LB fresco que contenía NaCl 0,3 M y se cultivó durante 4 h a 37 °C sin agitación.

Las fracciones de células totales y del sobrenadante se separaron mediante centrifugación a 20 800 g durante 20 min a 4 °C. El sedimento celular se tomó como la fracción de células totales. Las proteínas en el sobrenadante se precipitaron con ácido tricloroacético al 10% (en p/v) final durante 1 h a 4 °C. Después de una centrifugación (20 800 g durante 15 min) y la retirada del sobrenadante, el sedimento resultante se lavó en acetona enfriada en hielo durante la noche. Las muestras se volvieron a centrifugar, el sobrenadante se rechazó, y el sedimento se secó al aire y se resuspendió en 1×SDS tinte de carga.

Las proteínas segregadas se analizaron mediante SDS-PAGE; en cada caso, se cargaron las proteínas segregadas por  $3 \times 10^8$  bacterias por carril. Se realizó la detección de las proteínas segregadas específicas mediante inmunotransferencia usando geles de SDS-PAGE al 12,5%. Para la detección de las proteínas en células totales, se cargaron  $2 \times 10^8$  bacterias por carril, si no se indica lo contrario, y las proteínas se separaron en geles de SDS-PAGE al 12,5% antes de la detección mediante inmunotransferencia. La inmunotransferencia se realizó usando un anticuerpo anti-Myc (Santa Cruz).

#### Transferencia Western de proteínas translocadas de T3SS procedentes de células infectadas.

Se infectaron células HeLa en placas de 6 pocillos a una MOI de 100 como se describió anteriormente. En el caso de una coinfección con la cepa *Y. enterocolitica* que transloca la proteasa de TEV, se ajustó la DO<sub>600</sub> de las cepas y las dos suspensiones bacterianas se mezclaron en un tubo a una proporción de 1:1 (si no se indica lo contrario) antes de la adición a las células. Al final de la infección, las células se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo y se recogieron raspando en un pequeño volumen de PBS enfriado en hielo. Después de una centrifugación (16 000 rcf, 5 min, 4 °C), el sedimento se disolvió en digitonina al 0,002% suplementada con un cóctel de inhibidores de proteasas (Roche Complete, Roche). Los sedimentos disueltos se incubaron durante 5 minutos sobre hielo y después se centrifugaron (16 000 rcf, 25 min, 4 °C). Los sobrenadantes se recolectaron y se analizaron para el contenido en proteínas totales mediante el ensayo de Bradford BCA (Pierce) antes de una SDS-PAGE y una transferencia Western usando anticuerpos anti-Myc (Santa Cruz, 9E11) o anti-Ink4C (Cell Signaling).

#### Inmunofluorescencia.

Células sembradas en placas de 96 pocillos (Corning) se infectaron como se describió anteriormente y, después de una fijación con PFA al 4%, las células se lavaron tres veces con PBS. Los pocillos después se bloquearon usando suero de cabra al 5% en PBS, Triton X-100 al 0,3% durante 1 h a temperatura ambiente. El anticuerpo primario (anti-Myc, Santa Cruz, 1:100) se diluyó en PBS con BSA al 1% y Triton X-100 al 0,3%, y las células se incubaron durante la noche a 4 °C. Las células se lavaron 4 veces con PBS antes de añadir el anticuerpo secundario (AF 488 antirratón, Life Technologies, 1:250) diluido en PBS con BSA al 1% y Triton X-100 al 0,3%. Si fue necesario se incluyó tinción de ADN de Hoechst (Life Technologies, 1:2500) y/o tinción de actina (Dy647-faloidina, DyeOmics). En algunos casos solo el tinte de ADN y/o actina se aplicó directamente después de retirar el PFA mediante lavado. Las células se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS y se analizaron mediante un análisis de imágenes automático como se describe a continuación.

#### Microscopía y análisis de imágenes automático.

Las imágenes se adquirieron automáticamente con un ImageXpress Micro (Molecular Devices, Sunnyvale, EE. UU.). Se realizó la cuantificación de las intensidades de tinción de anti-Myc usando MetaXpress (Molecular Devices, Sunnyvale, EE. UU.). Se escogieron a mano regiones dentro de las células excluyendo las regiones nucleares y las regiones que contienen bacterias (círculos con un área de 40 píxeles) y se registró la intensidad promedio.

#### Estimulación con TNFα y transferencia Western de fosfo-p38.

Se infectaron células HeLa sembradas en placas de 6 pocillos a una MOI de 100 como se describió anteriormente. A los 30 min después de la infección se añadió gentamicina y a los 45 min después de la infección se añadió TNFα (10

ng/ml). A 1 h 15 min después de la infección, las células se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo y se añadió tampón de lisis Phospho-safe (Novagen) para lisar las células. Después de la incubación en hielo, las células se centrifugaron (16 000 rcf, 25 min, 4 °C). Los sobrenadantes se recolectaron y se analizaron para el contenido en proteínas totales mediante el ensayo de Bradford BCA (Pierce) antes de una SDS-PAGE y una transferencia Western usando anticuerpos anti-fosfo-p38, p38 total (Cell Signaling) y antiactina (Millipore).

5 Determinación del nivel de AMPc de células HeLa infectadas.

Se infectaron células HeLa sembradas en placas de 96 pocillos como se describió anteriormente. Treinta minutos antes de la infección se cambió el cDMEM a DMEM suplementado con HEPES 10 mM y L-glutamina 2 mM y 3-isobutil-1-metilxantina 100 uM (IBMX, Sigma Aldrich). A los 60 min después de la infección se añadió gentamicina y las células se volvieron a incubar a 37 °C durante 90 min más. Se realizó la determinación del AMPc usando un ELISA competitivo según las instrucciones del fabricante (Amersham, cAMP Biotrak, RPN225). Como control positivo se añadió la cantidad indicada de toxina del cólera (C8052, Sigma Aldrich) durante 1 h a células en DMEM suplementado con HEPES 10 mM y L-glutamina 2 mM e IBMX. 100 uM

10 Infecciones de embriones de pez cebra, formación de imágenes y cuantificación de imágenes automática.

15 Todos los experimentos con animales se realizaron según directrices aprobadas. Los peces cebra se mantuvieron en condiciones convencionales [52]. Los embriones se estadificaron según las horas posfertilización (hpf) a 28,5 °C [53]. Se usaron las siguientes líneas de pez cebra en este estudio: peces de tipo salvaje (AB/EK y EK/TL). El protocolo de infección siguió las directrices indicadas en [54]. Se mantuvieron embriones de 12 hpf en medio E3 que contenía N-feniltiourea (PTU) 0,2 mM para evitar la formación de pigmentos. Se anestesiaron embriones de 2 días posfertilización (dpf) con tricaina 0,2 mg/ml y se alinearon sobre placas de agar al 1% en E3 usando una herramienta de horquilla para el pelo [54]. Se cultivaron *Y. enterocolitica* en BHI suplementado con arabinosa al 0,4% y antibióticos y mDap durante la noche a temperatura ambiente, se diluyeron en BHI fresco con arabinosa al 0,5% y otros aditivos hasta una DO<sub>600</sub> de 0,2 y se cultivaron durante 2 h a temperatura ambiente antes de desplazar la temperatura hasta 37 °C en un agitador de baño de agua durante 45 min. Por último, las bacterias se recolectaron mediante centrifugación (6000 rcf, 30 seg) y se lavaron una vez con PBS. La DO<sub>600</sub> se ajustó a 2 en PBS que contenía mDAP. Se inyectaron 1-2 nl de esta suspensión en el rombencéfalo de embriones de pez cebra alineados usando un microinyector Femtojet (Eppendorf) empleando Femtotips II (Eppendorf), en los que la punta de la aguja se había quitado con unas pinzas finas. El tiempo de inyección se ajustó a 0,2 s y la presión de compensación a 15 hPa (Eppendorf, Femtojet), y la presión de inyección se ajustó entre 600 y 800 hPa. Se comprobó el tamaño de la gota y, por tanto, el inóculo mediante microscopía y cultivos control. Despues de la microinyección, los peces se recolectaron en E3 que contenía tricaina y PTU y se incubaron durante 30 min a 37 °C, y se incubaron durante 5 h más a 28 °C. Se usó un binocular fluorescente (Leica) para observar la fluorescencia de EGFP bacteriana 1 h después de la infección en rombencéfalos de pez cebra, y los embriones que no habían sido inyectados adecuadamente se rechazaron. Al final de la infección, los peces se fijaron con PFA enfriado en hielo al 2% durante 1 h en hielo y después con PFA enfriado en hielo fresco a 4 °C. La tinción de anticuerpos se realizó como se ha descrito previamente [55, 56]. Brevemente, los embriones se lavaron 4 veces con PBS y Tween al 0,1% durante 5 min por cada lavado y se permeabilizaron con PBS-T+Triton X-100 al 0,5% durante 30 min a temperatura ambiente. Los embriones se bloquearon en disolución de bloqueo (PBS, Tween al 0,1%, TritonX-100 al 0,1%, suero de cabra al 5% y BSA al 1%) a 4 °C durante la noche. El anticuerpo (caspasa-3 rota (Asp175), Cell Signaling) se diluyó 1:100 en disolución de bloqueo y se incubó con agitación a 4 °C en la oscuridad. Los peces se lavaron 7 veces con PBS y Tween al 0,1% durante 30 min antes de añadir el anticuerpo secundario (anticonejo de cabra AF647, Invitrogen, 1:500) diluido en disolución de bloqueo y se incubaron a 4 °C durante la noche. Las larvas se lavaron con PBS y Tween al 0,1% cuatro veces durante 30 min a 4 °C y una vez durante la noche, y después se lavaron 3-4 veces. Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal Leica TCS SP5 usando un objetivo de inmersión en agua de 40×.

20 45 Las imágenes se analizaron empleando los programas informáticos Imaris (Bitplane) e Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

50 El análisis de las imágenes (de n = 14 para pBad\_Si2 o n = 19 para z-BIM) se realizaron con un CellProfiler [57] de proyecciones z de intensidad máxima de imágenes apiladas-z registradas. Brevemente, las bacterias se detectaron a través del canal GFP. Alrededor de cada área de una mancha bacteriana se creó un radio de 10 píxeles. Las regiones solapantes se separaron por igual entre los miembros que se conectaban. En las áreas más cercanas que rodean a las bacterias se midió la intensidad de la tinción de caspasa 3 p17.

Preparación de muestras para fosfoproteómica.

55 Para cada condición se cultivaron dos placas de 6 pocillos de células HeLa CCL-2 hasta la confluencia. Las células se infectaron durante 30 min como se describió anteriormente. En los momentos indicados, las placas se colocaron en hielo y se lavaron dos veces con PBS enfriado en hielo. Despues las muestras se recolectaron en una disolución de urea [urea 8 M (AppliChem), bicarbonato de amonio 0,1 M (Sigma), RapiGest al 0,1% (Waters), 1× PhosSTOP (Roche)]. Las muestras se agitaron brevemente en vórtice, se sonicaron a 4 °C (Hielscher), se agitaron durante 5 min en un termomezclador (Eppendorf) y se centrifugaron durante 20 min a 4 °C y 16.000 g. Se recolectaron los sobrenadantes y se conservaron a -80 °C para su posterior procesamiento. Se usó el ensayo de proteínas BCA (Pierce) para medir la concentración de proteínas.

Enriquecimiento en fosfopéptidos.

Los enlaces disulfuro se redujeron con tris(2-carboxietil)fosfina a una concentración final de 10 mM a 37 °C durante 1 h. Los tioles libres se alquilaron con yodoacetamida 20 mM (Sigma) a temperatura ambiente durante 30 min en la oscuridad. El exceso de yodoacetamida se extinguíó con N-acetilcisteína a una concentración final de 25 mM durante 10 min a temperatura ambiente. Se añadió endopeptidasa Lys-C (Wako) hasta una proporción final de enzima/proteína de 1:200 (en p/p) y se incubó durante 4 h a 37 °C. La disolución después se diluyó con bicarbonato de amonio 0,1 M (Sigma) hasta una concentración final por debajo de 2 M de urea y se digirió durante la noche a 37 °C con tripsina modificada con calidad de secuenciación (Promega) a una proporción de proteína a enzima de 50:1. Los péptidos se desalaron en un cartucho C18 Sep-Pak (Waters) y se secaron al vacío. Los fosfopéptidos se aislaron a partir de 2 mg de la masa de péptidos totales con TiO<sub>2</sub>, tal como se ha descrito previamente [58]. Brevemente, los péptidos secados se disolvieron en una disolución de acetonitrilo al 80% (ACN)-ácido trifluoroacético al 2,5% (TFA) saturada con ácido ftálico. Se añadieron péptidos a la misma cantidad de TiO<sub>2</sub> equilibrado (tamaño de las esferas 5 µm, GL Sciences) en una columna de centrifugación Mobicol bloqueada (MoBiTec) que se incubó durante 30 min con rotación de un extremo a otro. La columna se lavó dos veces con la disolución de ácido ftálico saturada, dos veces con ACN al 80% y TFA al 0,1%, y por último dos veces con TFA al 0,1%. Los péptidos se eluyeron con una disolución de NH<sub>4</sub>OH 0,3 M. Se ajustó el pH de los eluatos hasta por debajo de 2,5 con una disolución de TFA al 5% y HCl 2 M. Los fosfopéptidos de nuevo se desalaron con cartuchos C18 de microcentrifuga (Harvard Apparatus).

Análisis de LC-MS/MS.

La separación cromatográfica de los péptidos se realizó usando un sistema nano-LC EASY (Thermo Fisher Scientific), equipado con una columna RP-HPLC calentada (75 µm×45 cm) cargada en el laboratorio con resina C18 de 1,9 µm (Reprosil-AQ Pur, Dr. Maisch). Se analizaron partes alícuotas de la muestra total de fosfopéptidos de 1 µg con un ensayo de LC-MS/MS usando un gradiente lineal que varía desde disolvente A al 98% A (ácido fórmico al 0,15%) y disolvente B al 2% (acetonitrilo al 98%, agua al 2%, ácido fórmico al 0,15%) hasta disolvente B al 30% a lo largo de 120 minutos a un caudal de 200 nL/min. El análisis de espectrometría de masas se realizó en un espectrómetro de masas de presión dual LTQ-Orbitrap equipado con una fuente de iones de nanoelectronebulización (ambos de Thermo Fisher Scientific). Cada barrido de MS1 (adquirido en el Orbitrap) fue seguido de una disociación inducida por colisión ("collision-induced dissociation", CID, adquirido en el LTQ) de los 20 iones precursores más abundantes con exclusión dinámica durante 30 segundos. Para el análisis de fosfopéptidos, los 10 iones precursores más abundantes se sometieron a CID con la activación de multiestadio encendida. El tiempo total del ciclo fue de aproximadamente 2 s. Para MS1, se acumularon 10<sup>6</sup> iones en la célula del Orbitrap a lo largo de un tiempo máximo de 300 ms y se realizó un barrido a una resolución de 60.000 FWHM (a 400 m/z). Los barridos de MS2 se adquirieron usando el modo de barrido normal, un ajuste diana de 10<sup>4</sup> iones, y un tiempo de acumulación de 25 ms. Los iones con una sola carga y los iones con un estado de carga no asignado se excluyeron de los acontecimientos de activación de MS2. La energía de colisión normalizada se ajustó al 32%, y se adquirió un microbarrido para cada espectro.

Cuantificación sin marcador y búsqueda en una base de datos.

Los archivos brutos adquiridos se importaron en la herramienta informática Progenesis (Nonlinear Dynamics, versión 4.0) para la cuantificación sin marcador usando los parámetros por defecto. Los espectros de MS2 se exportaron directamente de Progenesis en formato mgf y se realizó una búsqueda usando el algoritmo MASCOT (Matrix Science, versión 2.4) contra una base de datos señuelo [59] que contenía secuencias normales e inversas de las entradas predichas de SwissProt de *Homo sapiens* ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk), fecha de emisión: 16 de mayo de 2012) y contaminantes que se observan habitualmente (en 41.250 secuencias totales) generados usando la herramienta SequenceReverser del programa informático MaxQuant (versión 1.0.13.13). Para identificar las proteínas que se originan de *Y. enterocolitica*, las muestras no enriquecidas en fosfopéptidos se buscaron frente a la misma base de datos anterior que incluye las entradas predichas de SwissProt de *Y. enterocolitica* ([www.ebi.ac.uk](http://www.ebi.ac.uk), fecha de emisión: 15 de agosto de 2013). La tolerancia de los iones precursores se ajustó a 10 ppm y la tolerancia de fragmentos de iones se ajustó a 0,6 Da. Los criterios de búsqueda se ajustaron como sigue: se requiere especificidad tríptica completa (ruptura después de restos lisina o arginina a menos que les siga una prolina), se permiten 2 rupturas no detectadas, la carbamidometilación (C) se ajustó como una modificación fija, y la fosforilación (S,T,Y) o la oxidación (M) como una modificación variable para muestras enriquecidas con TiO<sub>2</sub> o no enriquecidas, respectivamente. Por último, los resultados de la búsqueda en la base de datos se exportaron como un archivo xml y se volvieron a importar al programa informático Progenesis para la asignación de características de MS1. Para la cuantificación de fosfopéptidos, se exportó un archivo csv que contiene las abundancias de picos de MS1 de todas las características detectadas y para las muestras no enriquecidas, y se creó un archivo csv que contiene todas las mediciones de proteínas basadas en las intensidades de las características sumadas de todos los péptidos identificados por proteína. De forma importante, el programa informático Progenesis se ajustó de modo que las proteínas identificadas por conjuntos similares de péptidos se agrupan y de modo que solo se emplean los péptidos que no están en conflicto con secuencias específicas para proteínas individuales en la base de datos para la cuantificación de proteínas. Ambos archivos se volvieron a procesar usando la secuencia de instrucciones desarrollada en el laboratorio de los inventores SafeQuant v1.0 R (datos no publicados, disponible en <https://github.com/ehrne/SafeQuant/>). Brevemente, el programa informático ajusta el nivel de identificación de Tasa

de Descubrimiento Falsos al 1% (basándose en el número de aciertos en la base de datos de secuencias de proteínas seño) y normaliza las abundancias de picos de MS1 identificadas (cromatograma de iones extraídos, XIC) a través de todas las muestras, es decir, el XIC sumado de todas las características de los péptidos identificados de modo fiable se escala hacia arriba para que sea igual para todos los ensayos de LC-MS. Despues, a 5 todas las proteínas/fosfopéptidos cuantificados se les asigna una proporción de abundancia para cada momento, basándose en la mediana de XIC por momento. La significancia estadística de cada proporción se obtiene por su valor de q (valores de p ajustados a la Tasa de Descubrimientos Falsos), obtenidos calculando los valores de p del estadístico t modificados [60] y ajustando para múltiples ensayos [61]. La localización de los restos fosforilados fue 10 asignada automáticamente por MASCOT (puntuación >10). Todos los espectros anotados, junto con los archivos brutos de MS y los parámetros de búsqueda empleados, se depositarán en ProteomeXchange Consortium (<http://proteomecentral.proteomexchange.org>) a través del depositario asociado PRIDE [62]. Se realizó el alineamiento de secuencias usando la herramienta de alineamiento de múltiples secuencias ClustalW2 con base en 15 la red EMBL-EBI en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

## B) Resultados

### 15 Sistema de transporte de proteínas basado en la secreción de tipo 3 de proteínas de fusión YopE

Mientras que el mismo extremo N-terminal de la YopE efectora de T3SS de *Y. enterocolitica* (SEQ ID NO:1) contiene 20 la suficiente señal de secreción para translocar proteínas heterólogas [10], el sitio de unión de chaperona ("chaperone-binding site", CBS) para su chaperona (SycE) no está incluido [63]. Los inventores seleccionaron los 138 aminoácidos N-terminales de YopE (SEQ ID NO:2) para condensarlos a las proteínas que se van a transportar, puesto que esto ha demostrado conseguir los mejores resultados para la translocación de otros sustratos de T3S 25 heterólogos [38]. Puesto que estos 138 aminoácidos N-terminales de YopE contienen el CBS, se decidió coexpresar SycE. El fragmento SycE-YopE<sub>1-138</sub> clonado a partir del plásmido de virulencia de *Y. enterocolitica* pYV40 contiene 30 los promotores endógenos de YopE y de su chaperona SycE (figura 10). Por tanto, SycE y cualquier proteína de fusión de YopE<sub>1-138</sub> son inducidas por un rápido desplazamiento de temperatura desde el cultivo a temperatura ambiente hasta 37 °C. El tiempo de cultivo a 37 °C afecta a la cantidad de proteína de fusión presente en las 35 bacterias. Se añadió un sitio de clonación múltiple ("multiple cloning site", MCS) en el extremo 3' de YopE<sub>1-138</sub> (figura 10 B), seguido de un Myc y un 6×marcador His y un codón de fin.

La cepa base se seleccionó cuidadosamente. En primer lugar, para limitar la translocación de efectores endógenos, 30 se usó una cepa de *Y. enterocolitica* de la que se habían delecionado todos los efectos conocidos, Yop H, O, P, E, M y T (denominada ΔHOPEMT) [64]. Además, se empleó un mutante auxótrofo que no puede crecer en ausencia de ácido meso-2,6-diaminopimélico exógeno [65]. A esta cepa se le delecionó el gen de aspartato-beta-semialdehído deshidrogenasa ( $\Delta$ asd), y fue clasificada como nivel de bioseguridad 1 por la agencia de seguridad suiza (modificación de A010088/2). Además, se delecionaron las proteínas de adhesión YadA y/o InvA para ofrecer una elección más amplia de cepas base. Aunque el uso de las cepas yadA o yadA/invA reduce la señalización de fondo 35 inducida [66], la cantidad de proteína transportada también se ve afectada [67].

### Caracterización del transporte de proteínas de fusión de YopE hacia el interior de células eucariotas

En un ensayo de secreción *in vitro* (véase la figura 1 A), la secreción de proteínas hacia el líquido circundante se induce de modo artificial. Despues de la precipitación de proteínas basada en TCA, se usó un análisis de la transferencia Western con un anticuerpo anti-YopE para determinar las cantidades de proteínas segregadas (figura 40 1 B). Aunque una cepa de tipo salvaje segregó la YopE de longitud completa, las cepas AHOPEMT  $\Delta$ asd no lo hicieron. Con la presencia de YopE<sub>1-18</sub>-Myc-His (denominado tambien YopE<sub>1-138</sub>-Myc; SEQ ID NO:3), una banda de 45 YopE más pequeña se hizo visible (figura 1 B). Por tanto, el fragmento YopE<sub>1-138</sub> es segregado en el conjunto descrito en la presente. Para analizar la homogeneidad de la translocación de proteínas hacia el interior de células eucariotas, los inventores infectaron células HeLa con la cepa codificadora de YopE<sub>1-138</sub>-Myc y tiñeron el marcador 50 Myc con IF (figuras 2 A y B). Aunque al principio solo se tiñeron las bacterias, a los 30 min despues de la infección empezaron a hacerse visibles los contornos de las células, viéndose mejor cuanto mayor era el tiempo de infección (figura 2 B). Esta tendencia se refleja muy bien en la intensidad de tinción del marcador Myc dentro de las células HeLa (figuras 2 A y B). El YopE<sub>1-138</sub>-Myc puede detectarse en cualquier lugar de las células (figura 2 A), excepto en los núcleos [68]. De forma notable, la mayoría, sino todas las células fueron alcanzadas con esta estrategia de una 55 manera comparable. Puesto que se sabe que *Y. enterocolitica* infesta muchos tipos celulares diferentes [69], se realizó un seguimiento del transporte de YopE<sub>1-138</sub>-Myc hacia el interior de diversas líneas celulares. Se observó la misma tinción homogénea de anti-Myc IF en fibroblastos murinos infectados, células Jurkat y HUVEC (figura 11). Más aún, ajustando la MOI hacia arriba o hacia abajo se puede modular la cantidad de proteína transportada (figura 2 C), y todavía la mayoría de las células siguen siendo dianas. Un bajo número bacteriano no produce pocas células con mucha proteína transportada, sino que la mayoría de las células contienen una cantidad baja de proteína 60 transportada (figura 2 C).

### Redirección de las proteínas transportadas con T3SS al núcleo

Puesto que la propia YopE se localiza en el citoplasma (figura 2 A), resulta de especial interés ensayar si el fragmento YopE<sub>1-138</sub> dificulta la localización de proteínas de fusión nucleares. Por tanto, se añadió NLS de SV40 al

extremo C-terminal (y N-terminal, con resultados similares) de YopE<sub>1-138</sub>-EGFP (SEQ ID NO:39 y SEQ ID NO:38, respectivamente). Mientras que YopE<sub>1-138</sub>-EGFP (SEQ ID NO:37) condujo a una tinción citoplásmica débil, YopE<sub>1-138</sub>-EGFP-NLS produjo una señal de EGFP nuclear más fuerte en células HeLa infectadas (figura 3). Esto indica que el fragmento YopE<sub>1-138</sub> es compatible con el uso de una NLS. Aunque mCherry ya se ha usado en patógenos vegetales [70], esto representa un transporte satisfactorio de una proteína similar a GFP a través de una bacteria patógena humana o animal que codifica un T3SS. Esto valida la estrategia dependiente de SycE y YopE<sub>1-138</sub> como muy prometedora para transportar muchas proteínas seleccionadas.

#### *Retirada del apéndice YopE<sub>1-138</sub> después de la translocación de la proteína de fusión hacia la célula eucariota*

Aunque para el transporte bacteriano, el fragmento YopE<sub>1-138</sub> es muy beneficioso, podría dificultar la función y/o la localización de proteínas de fusión. Por tanto, su retirada después del transporte de las proteínas sería óptima. Para este fin, se introdujeron dos sitios de ruptura de TEV (ENLYFQS) [71-73] entre YopE<sub>1-138</sub> y un compañero de fusión (el regulador transcripcional ET1-Myc (SEQ ID NO:36 y 41) [74] y INK4C humana (SEQ ID NO:40 y SEQ ID NO:43)). Para mantener las ventajas del método presentado, también se condensó la proteasa de TEV (variante S219V; [75]) a YopE<sub>1-138</sub> (SEQ ID NO:42) en otra cepa de *Y. enterocolitica*. Se infectaron células HeLa con ambas cepas a la vez. Para permitir el análisis solo de la fracción translocada de proteínas, las células HeLa infectadas se lisaron a las 2 h después de la infección (figura 4) con digitonina, que se sabe que no lisa las bacterias ([76]; véase la figura 12 para el control). Un análisis de la transferencia Western reveló la presencia de YopE<sub>1-138</sub>-2×sitio de ruptura de TEV-ET1-Myc o YopE<sub>1-138</sub>-2×sitio de ruptura de TEV-Flag-INK4C-Myc solo cuando las células habían sido infectadas con la cepa correspondiente (figuras 4 A y C). Tras una digestión durante la noche de este lisado de células con proteasa de TEV purificada, puede observarse una banda desplazada (figuras 4 A y C). Esta banda se corresponde con ET1-Myc (figura 4 C) o Flag-INK4C (figura 4 A) con los restos N-terminales del sitio de ruptura de TEV, muy probablemente solo una serina. Tras la coinfección de las células con la cepa que transporta la proteasa de TEV, el mismo fragmento escindido ET1-Myc o Flag-INK4C se hizo visible, lo cual indica que la proteasa de TEV transportada a través de T3SS es funcional y que células individuales han sido infectadas por ambas cepas bacterianas (figuras 4 A y C). Aunque la escisión no es completa, la mayoría de las proteínas translocadas ya están rotas aproximadamente 2 h después de la infección, e incluso una digestión durante la noche con proteasa de TEV purificada no produce unas mejores tasas de escisión (figura 4 B). Tal como se ha indicado, la escisión dependiente de proteasa de TEV puede requerir una optimización que depende de la proteína de fusión [77, 78]. Por tanto, la retirada dependiente de la proteasa de TEV del apéndice YopE<sub>1-138</sub> después de la translocación proporciona, por primera vez, un transporte de proteínas con T3SS de proteínas heterólogas casi nativas, cuya composición de aminoácidos cambia solo en un aminoácido N-terminal.

Una estrategia alternativa a la escisión dependiente de proteasa de TEV del fragmento YopE consiste en la incorporación de ubiquitina en la proteína de fusión de interés. En efecto, la ubiquitina es procesada en su extremo C-terminal por un grupo de proteasas C-terminales específicas de ubiquitina (enzimas desubiquitinantes, DUB). Puesto que se supone que la escisión se produce en el mismo extremo C-terminal de la ubiquitina (después de G76), la proteína de interés debe carecer de una secuencia de aminoácidos adicional. Este método se ensayó sobre la proteína de fusión YopE1-138-ubiquitina-Flag-INK4C-MycHis. En células control infectadas con bacterias que expresan YopE1-138-Flag-INK4C-MycHis, se descubrió una banda que se corresponde con YopE1-138-Flag-INK4C-MycHis, lo cual indica una translocación eficaz de la proteína de fusión (figura 24). Cuando las células se infectan durante 1 h con bacterias que expresan YopE1-138-ubiquitina-Flag-INK4C-MycHis, una banda adicional que se corresponde con el tamaño de Flag-INK4C-MycHis resulta visible, lo cual indica que parte de la proteína de fusión ha sido rota. Este resultado demuestra que la introducción de ubiquitina en la proteína de fusión permite escindir el fragmento YopE1-138 sin que sea necesaria una proteasa exógena.

#### *Translocación de efectores bacterianos de tipo III y de tipo IV*

SopE procedente de *Salmonella enterica* es un factor de intercambio de nucleótidos de guanina ("guanine nucleotide exchange factor", GEF) bien caracterizado que interacciona con Cdc42, estimulando la remodelación del citoesqueleto de actina [79]. Mientras que la translocación de YopE<sub>1-138</sub>-Myc hacia el interior de células HeLa no produce ningún efecto, el YopE<sub>1-138</sub>-SopE (SEQ ID NO:5 y 135) translocado induce cambios drásticos en la red de actina (figura 5 A). Se obtuvieron resultados similares con otra proteína efectora de GEF, IpgB1 procedente de *Shigella flexneri* (SEQ ID NO:4). De modo notable, los primeros cambios en el citoesqueleto de actina se observaron tan rápido como a los 2 min después de la infección (figura 5 A). Por tanto, se puede concluir que el transporte de proteínas dependiente de T3SS que se produce inmediatamente después de la infección es iniciado por centrifugación. Para probar un transporte dependiente de T3SS estricto, se delecionó una de las proteínas de T3SS que forma el poro de translocación en la membrana de la célula eucariota (YopB, véase [80]) (figura 12).

Durante una infección con *Salmonella*, la translocación de SopE es seguida de la translocación de SptP, que actúa como una proteína activadora de GTPasa (GAP) para Cdc42 [81]. Mientras que la translocación de YopE<sub>1-138</sub>-SopE-Myc (SEQ ID NO:135) por sí sola activa redistribuciones masivas de F-actina, la coinfección con bacterias que expresan YopE<sub>1-138</sub>-SptP (SEQ ID NO:8) abole este efecto de una manera dependiente de la dosis (figura 5 B). Una tinción anti-Myc indica que esta inhibición no es debida a un nivel reducido de translocación de YopE<sub>1-138</sub>-SopE-Myc (figura 5 B). Conjuntamente, estos resultados demuestran que la coinfección de células con dos cepas bacterianas es un método válido para transportar dos efectores diferentes hacia el interior de células individuales para lograr su

interacción funcional.

El efecto de tipo III OspF de *S. flexneri* actúa como una fosfotreonina liasa que desfosforila las MAP quinasas p38 y ERK [82]. Para ensayar la funcionalidad de YopE<sub>1-138</sub>-OspF translocada (SEQ ID NO:7), se controló la fosforilación de p38 después de una estimulación con TNF $\alpha$ . En células no infectadas o en células infectadas con bacterias que expresan YopE<sub>1-138</sub>-Myc, el TNF $\alpha$  induce la fosforilación de p38. Por contraste, después de la translocación de YopE<sub>1-138</sub>-OspF, la fosforilación inducida por TNF $\alpha$  fue abolida, demostrando que la OspF transportada es activa hacia p38 (figura 6 A).

Durante una infección con *Salmonella*, el efecto de tipo III SopB protege a las células epiteliales de la apoptosis mediante una activación sostenida de Akt [83]. Mientras que la translocación de YopE<sub>1-138</sub>-Myc o YopE<sub>1-138</sub>-SopE no produjo ningún efecto sobre Akt, la translocación de YopE<sub>1-138</sub>-SopB (SEQ ID NO:6) induce una fuerte fosforilación de Akt en T308 y S473, que refleja la forma activa (figura 6 B). Se obtuvieron resultados similares con el homólogo de SopB procedente de *S. flexneri* (IpgD, SEQ ID NO:9). Conjuntamente, los resultados de los inventores demuestran que los sistemas de transporte basados en YopE<sub>1-138</sub> funcionan para todos los efectores de T3S ensayados hasta la fecha, y permiten investigar proteínas implicadas en el control de funciones celulares fundamentales, que incluyen el citoesqueleto, la inflamación y la supervivencia celular.

Una serie de bacterias, que incluyen *Agrobacterium tumefaciens*, *Legionella pneumophila* y *Bartonella henselae*, usan la secreción de tipo IV para inyectar efectores en células. Se ensayó si el efecto de tipo IV BepA procedente de *B. henselae* puede translocarse hacia el interior de células HeLa usando la herramienta de los inventores. Se clonaron BepA de longitud completa (SEQ ID NO:10) y BepA<sub>E305-end</sub> (SEQ ID NO:11) que contiene el dominio Bid C-terminal, y se infectaron células con las respectivas cepas. Puesto que se ha demostrado que BepA induce la producción de AMP cíclico (AMPc) [84], se midió el nivel de AMPc en células HeLa después de la infección. Mientras que la translocación del dominio Bid del efecto BepG de *B. henselae* (SEQ ID NO:136) no indujo AMPc, BepA de longitud completa y BepA<sub>E305-end</sub> activaron la producción de AMPc en cantidades esperadas [84] (figura 6 C). Este resultado demuestra que los efectores de tipo IV también pueden ser transportados de forma eficaz por el sistema de transporte basado en YopE<sub>1-138</sub> hacia el interior de células diana y que son funcionales.

#### *Translocación de proteínas eucariotas hacia el interior de células epiteliales*

Para demostrar que pueden translocarse proteínas humanas a través de la secreción de tipo III, los inventores condensaron inductores de la apoptosis para su transporte por *Y. enterocolitica* a YopE<sub>1-138</sub> o para su transporte por *S. enterica* a SteA<sub>1-20</sub>, SteA, SopE<sub>1-81</sub> o SopE<sub>1-105</sub>. Después se controló la translocación del agonista del dominio de muerte que interacciona con BH3 humano (BID, SEQ ID NO:24), que es un miembro proapoptótico de la familia de proteínas Bcl-2. Es un mediador de los daños mitocondriales inducidos por caspasa-8 (CASP8). CASP8 rompe la BID, y la BID truncada (tBID, SEQ ID NO:25) se transloca a las mitocondrias en donde activa la liberación de citocromo c. Este último conduce al modo intrínseco de activación de la caspasa 3 (CASP3), durante el cual se escinde en subunidades de 17 y 12 kDa [85]. Mientras que una infección durante 1 h con *Y. enterocolitica* que expresa YopE<sub>1-138</sub>-Myc o YopE<sub>1-138</sub>-BID no indujo la apoptosis, la translocación de tBID humano activa la muerte celular en un grado mayor que el inductor de la apoptosis bien caracterizado staurosporina (figuras 7 A y C). Tal como se esperaba, la translocación de tBID conduce a la producción de la subunidad de CASP3 p17, incluso en cantidades mayores que con la staurosporina (figura 7 A). Para poder comparar las cantidades de proteínas translocadas con la Bid endógena, células HeLa fueron lisadas con digitonina y analizadas mediante transferencia Western usando un anticuerpo anti-Bid (figura 7 B). YopE<sub>1-138</sub>-tBID transportado por T3SS alcanzó unos niveles de Bid aproximadamente endógenos en células HeLa, mientras que YopE<sub>1-138</sub>-BID transportada estaba presente en cantidades aún mayores (en 2,5 veces) (figura 7 B). Un cartografiado del transcriptoma y proteoma profundo de células HeLa calculó un aumento de 4,4 veces de 10<sup>5</sup> copias de BID por célula individual [86]. Por tanto, se puede concluir que el transporte de proteínas humanas dependiente de T3SS alcanza de 10<sup>5</sup> a 10<sup>6</sup> proteínas por célula. Estos números se ajustan a las copias por célula de nanocuerpos translocados a través de T3SS de *E. coli* [19]. Suponiendo una nivelación de un factor de 10 para la MOI y para la duración de la infección, un factor de 3,2 para el momento de adición del antibiótico y para el tiempo de cultivo a 37 °C antes de la infección, las copias de proteína transportadas/célula pueden ajustarse desde aproximadamente 1000 copias/célula hasta aproximadamente 10<sup>6</sup> copias/células. Conjuntamente, estos resultados indican que la tBID translocada es funcional y es transportada a niveles pertinentes. Esto valida la herramienta de translocación para estudiar el papel de las proteínas en la regulación de la apoptosis, un aspecto fundamental de la biología celular.

Después se condensó la tBID murina (con codones optimizados para *Y. enterocolitica*; SEQ ID NO:194) o los dominios BH3 de tBID murina o BAX murina (en ambos casos con codones optimizados para *Y. enterocolitica*; SEQ ID NO:138 y 139) con YopE<sub>1-138</sub> para el transporte por *Y. enterocolitica*. Mientras que una infección durante 2,5 h con *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* no transporta proteínas o YopE<sub>1-138</sub>-Myc no induce la apoptosis, la translocación de tBID murina (con codones optimizados para *Y. enterocolitica*, SEQ ID NO:194) activa la muerte celular en células B16F10 (figura 16), D2A1 (figura 17), HeLa (figura 18) y 4T1 (figura 19). La translocación del dominio BH3 de BID murina con codones optimizados para *Y. enterocolitica* (SEQ ID 138) o BAX murina con codones optimizados para *Y. enterocolitica* (SEQ ID 139) también indujo una muerte celular masiva en células B16F10 (figura 16), D2A1 (figura 17), HeLa (figura 18) y 4T1 (figura 19).

Mientras que una infección durante 4 h con bacterias *S. enterica* aroA no indujo la apoptosis, la translocación de tBID murina activa la apoptosis, puesto que la translocación de la tBID murina conduce a la producción de la subunidad CASP3 p17 (figuras 20 y 21). El grado de inducción de la apoptosis para las proteínas de fusión de SopE fue mayor cuando se emplean condiciones inductoras de Spil T3SS (figura 20), lo cual refleja el transporte de SopE exclusivamente por Spil T3SS. SteA<sub>1-20</sub> condensado a tBID murina no indujo la apoptosis, muy probablemente debido a que la señal de secreción dentro de los 20 aminoácidos N-terminales de SteA no es suficiente para permitir el transporte de una proteína de fusión (figuras 20 y 21). La tBID murina condensada a SteA de longitud completa conduce a la inducción de la apoptosis en células HeLa (figuras 20 y 21), en condiciones inductoras de Spil y Spill T3SS, lo cual refleja la capacidad de SteA de ser transportada por ambos T3SS. Debe advertirse que incluso bajo condiciones inductoras de Spill T3SS, se espera una actividad parcial de Spil T3SS, como puede observarse por la actividad de las proteínas de fusión de SopE en condiciones inductoras de Spill T3SS (figura 21).

Además, de las proteínas eucariotas translocadas descritas funcionalmente en la presente, se han segregado varias proteínas eucariotas diferentes usando la herramienta descrita en la presente. Estas incluyen, para su transporte por *Y. enterocolitica* (figuras 13, 14 y 23), proteínas procedentes de la regulación del ciclo celular (Mad2 (SEQ ID NO:15), CDK1 (SEQ ID NO:14), INK4A (SEQ ID NO:16), INK4B (SEQ ID NO:17) e INK4C (SEQ ID NO:18)), así como sus partes (INK4A 84-103 (SEQ ID NO:158), p107 657-662 (SEQ ID NO:159), p21 141-160 (SEQ ID NO:160), p21 145-160 (SEQ ID NO:161), p21 17-33 (SEQ ID NO:162) y ciclina D2 139-147 (SEQ ID NO:163)), proteínas relacionadas con la apoptosis (Bad (SEQ ID NO:29), FADD (SEQ ID NO:28), y caspasa 3 p17 (SEQ ID NO:22) y p12 (SEQ ID NO:23), Bid del pez cebra (SEQ ID NO:19) y t-Bid (SEQ ID NO:20)), así como sus partes (tBid BH3 (SEQ ID NO:38), Bax BH3 (SEQ ID NO:139)), proteínas de señalización (TRAF6 murina (SEQ ID NO:12), TIFA (SEQ ID NO:13)), subunidad Gα de GPCR (GNA12, isoforma más corta (SEQ ID NO:30)), nanocuerpos (vhvGFP4, (SEQ ID NO:31)) y construcciones de fusión de nanocuerpos para la degradación de proteínas transportadas (Slmb-vhvGFP4; (SEQ ID NO: 32, 33, 34) [87]) (figuras 13 y 14), así como GTPasas pequeñas (Rac1 Q61E (SEQ ID NO:26 y 137) y RhoA Q63L (SEQ ID NO:27) y dominio de homología de pleckstrina procedente de Akt humana (SEQ ID NO:35). Además de las proteínas relacionadas con la apoptosis descritas funcionalmente (tBid murina, SEQ ID NO:144-147), también se incluyen, para el transporte por *S. enterica* (figura 22), proteínas procedentes de la regulación del ciclo celular (Mad2 (SEQ ID NO:168-169), CDK1 (SEQ ID NO:170-171), INK4A (SEQ ID NO:164-165) e INK4C (SEQ ID NO:166-167)). Aunque estas proteínas no han sido validadas funcionalmente, la posibilidad de una secreción dependiente de T3SS de diversas proteínas eucariotas en combinación con la posible escisión del apéndice YopE abre nuevas perspectivas a la aplicación amplia de T3SS en la biología celular.

#### *La translocación in vivo de Bid truncada en embriones de pez cebra induce la apoptosis*

Una característica interesante de esta herramienta bacteriana es el uso potencial en animales vivos. El pez cebra, en su estado embrionario, puede mantenerse transparente, lo cual permite la tinción y la microscopía fluorescentes [54, 88, 89]. Se han descrito pocos inductores de la apoptosis del pez cebra en detalle, siendo z-BIM el más potente [90]. Por tanto, los inventores decidieron clonar z-BIM en su sistema. Aunque es débilmente homólogo con BIM humana, se ensayó la potencia de la inducción de la apoptosis de YopE<sub>1-138</sub>-z-BIM (SEQ ID NO:21) en células epiteliales humanas. Células HeLa infectadas durante 1 h con la cepa que transloca YopE<sub>1-138</sub>-z-BIM muestran señales evidentes de muerte celular. Después se realizaron experimentos *in vivo* con embriones de pez cebra de 2 días postfertilización (dpf), usando un modelo de infección localizada mediante microinyección de bacterias en el rombencéfalo [54]. Después de una infección durante 5,5 h, los peces se fijaron, se permeabilizaron y se tiñeron para la presencia de CASP3 p17. Tras la infección con la cepa que expresan YopE<sub>1-138</sub>-Myc, las bacterias fueron visibles en la región del rombencéfalo (tinción "b", figura 8 A I), pero no se detectó inducción de la apoptosis alrededor de las bacterias (tinción "c", figura 8 A I). Por contraste, tras la infección con la cepa que transporta YopE<sub>1-138</sub>-z-BIM, se observó un fuerte aumento en la presencia de CASP3 rota en regiones que rodean a las bacterias (figura 8 A II). Un análisis de imágenes automático sobre proyecciones z de intensidad máxima confirma que las bacterias que translocan YopE<sub>1-138</sub>-z-BIM inducen la apoptosis en células cercanas en mucha mayor medida que las bacterias control (figura 8 B). Esto indica que z-BIM es funcional en el pez cebra después de la translocación bacteriana. Estos resultados validan aún más el uso de T3SS para el transporte de proteínas eucariotas en animales vivos.

#### *La fosfoproteómica revela el impacto global de las proteínas translocadas sobre la fosforilación de proteínas*

La fosforilación es una modificación postraduccional ampliamente difundida que puede activar o inactivar procesos biológicos y, por tanto, es una diana adecuada para estudiar acontecimientos de señalización [91, 92]. A pesar de ello, en la actualidad no existen análisis a nivel de sistemas de la fosforilación en la apoptosis. Para analizar el impacto de tBid humana transportada hacia el interior de células HeLa, se usó una estrategia de fosfoproteómica sin marcadores mediante LC-MS/MS. En tres experimentos independientes, las células no se trataron, se infectaron con ΔHOPEMT asd + YopE<sub>1-138</sub>-Myc o con ΔHOPEMT asd + YopE<sub>1-138</sub>-tBid durante 30 minutos. Las células se lisaron, seguido de una digestión enzimática, un Enriquecimiento en fosfopeptidos y una cuantificación e identificación de los fosfopeptidos individuales. Se compararon las células infectadas con ΔHOPEMT asd + YopE<sub>1-138</sub>-Myc con las células infectadas con ΔHOPEMT asd + YopE<sub>1-138</sub>-tBid, lo cual permitió identificar 363 acontecimientos de fosforilación dependientes de tBid. 286 fosfopeptidos mostraron un aumento en la fosforilación, mientras que 77 fueron menos fosforilados tras el transporte de tBid, que se corresponden con 243 proteínas diferentes, que los inventores definieron como el fosfoproteoma de tBid. Se usó la base de datos STRING para crear una red de interacciones

proteína-proteína del fosfoproteoma de tBid [93] (figura 9 A). Se añadieron a la red 27 proteínas conocidas por estar relacionadas con la apoptosis mitocondrial, construyendo un agrupamiento central. De modo interesante, solo unas pocas proteínas del fosfoproteoma de tBid estaban conectadas con este agrupamiento central, lo cual indica que muchas proteínas sufren un cambio en la fosforilación que, por lo que se sabe, no están directamente relacionadas con proteínas apoptóticas. Para caracterizar las funciones biológicas que cubre el fosfoproteoma de tBid, se realizó un análisis de ontología de genes usando la herramienta de anotación funcional de the Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery (DAVID, <http://david.abcc.ncifcrf.gov>) [94, 95]. Las funciones biológicas identificadas demuestran que diversos procesos celulares se ven afectados por tBid. Muchas proteínas implicadas en la redistribución de la cromatina y la regulación de la transcripción sufren un cambio en la fosforilación (concretamente, CBX3, CBX5, TRIM28, HDAC1). Por ejemplo, HDAC1 es una histona desacetilasa que desempeña un papel en la regulación de la transcripción. Se ha demostrado que HDAC1 puede modular la actividad transcripcional de NF- $\kappa$ B, una proteína que también participa en la apoptosis. Los inventores también identificaron un agrupamiento de proteínas implicadas en el procesamiento del ARN que previamente habían demostrado desempeñar un papel importante en la regulación de la apoptosis [96]. Por ejemplo, HNRPK media en una respuesta de p53/TP53 a daños en el ADN y es necesaria para la inducción de la apoptosis [97]. Además, la fosforilación de proteínas implicadas en la traducción de proteínas también se ve afectada. Varios factores de inicio eucariotas (concretamente, EIF4E2, EIF4B, EIF3A, EIF4G2) sufren un cambio en la fosforilación, lo cual está en línea con la observación de que la síntesis global de proteínas disminuye en células apoptóticas. De manera interesante, la fosforilación de muchas proteínas implicadas en la remodelación del citoesqueleto (por ejemplo, PXN, MAP1B9) se altera tras el transporte de tBid. Esto está en concordancia con la observación de que la morfología de las células cambia drásticamente tras el transporte de tBid (figura 9 B). El encogimiento de las células y la pérdida de contacto se reflejan en el hecho de que se observó fosforilación de proteínas relacionadas con la adhesión, tales como ZO2 y paxilina. De modo similar, el encogimiento de los núcleos viene acompañado de una fosforilación de proteínas laminares, tales como lamina A/C y lamina B1. En conjunto, el transporte de tBID induce una rápida respuesta apoptótica, lo cual también viene indicado por la ruptura de la integridad mitocondrial (figura 9 B). Los inventores han demostrado que la apoptosis inducida por tBid afecta a cientos de acontecimientos de fosforilación que participan en diversos procesos celulares. Aunque muchas proteínas identificadas se han relacionado con la apoptosis, solo se conocen unas pocas que son fosforiladas tras la inducción de la apoptosis. Por tanto, la estrategia fosfoproteómica proporciona un recurso útil para posteriores estudios sobre la apoptosis.

### 30 **Lista de referencias bibliográficas**

1. Gibson, T.J., M. Seiler, y R.A. Veitia (2013), The transience of transient overexpression, *Nat. Methods*, 10:715-721.
2. Inoue, T., W.D. Heo, J.S. Grimley, T.J. Wandless, y T. Meyer (2005), An inducible translocation strategy to rapidly activate and inhibit small GTPase signaling pathways, *Nat. Methods*, 2:415-418.
3. Pust, S., H. Hochmann, E. Kaiser, G. von Figura, K. Heine, et al. (2007), A cell- permeable fusion toxin as a tool to study the consequences of actin-ADP-ribosylation caused by the *Salmonella enterica* virulence factor SpvB in intact cells, *J. Biol. Chem.*, 282:10272-82.
4. Hayes, C.S., S.K. Aoki, y D.A. Low (2010), Bacterial contact-dependent delivery systems, *Annu. Rev. Genet.*, 44:71-90.
5. Cornells, G.R., (2006), The type III secretion injectisome, *Nat. Rev. Microbiol.*, 4:811-25.
6. Michiels, T., P. Wattiau, R. Brasseur, J.M. Ruysschaert, y G. Cornells (1990), Secretion of Yop proteins by *Yersinia*, *Infect. Immun.*, 58:2840-9.
7. Letzelter, M., I. Sorg, L.J. Mota, S. Meyer, J. Stalder, et al. (2006), The discovery of SycO highlights a new function for type III secretion effector chaperones, *EMBO J.*, 25:3223-33.
8. Gauthier, A., y B.B. Finlay (2003), Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, 185:6747-55.
9. Wattiau, P., y G.R. Cornells (1993), SycE, a chaperone-like protein of *Yersinia enterocolitica* involved in the secretion of YopE, *Mol. Microbiol.*, 8:123-31.
10. Feldman, M.F., S. Muller, E. Wuest, y G.R. Cornells (2002), SycE allows secretion of YopE-DHFR hybrids by the *Yersinia enterocolitica* type III Ysc system, *Mol. Microbiol.*, 46:1183-97.
11. Akeda, Y., y J.E. Galan (2005), Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion, *Nature*, 437:911-5.
12. Pais, S.V., C. Milho, F. Almeida, y L.J. Mota (2013), Identification of novel type III secretion chaperone-substrate complexes of *Chlamydia trachomatis*, *PLoS One*, 8: e56292.

13. Sory, M.P., y G.R. Cornells (1994), Translocation of a hybrid YopE-adenylate cyclase from *Yersinia enterocolitica* into HeLa cells, Mol. Microbiol., 14:583-94.
- 5 14. García, J.T., F. Ferracci, M.W. Jackson, S.S. Joseph, I. Patis, et al. (2006), Measurement of effector protein injection by type III and type IV secretion systems by using a 13-residue phosphorylatable glycogen synthase kinase tag, Infect. Immun., 74:5645-57.
- 10 15. Chen, L.M., G. Briones, R.O. Donis, y J.E. Galan (2006), Optimization of the delivery of heterologous proteins by the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* type III secretion system for vaccine development, Infect. Immun., 74:5826-33.
16. Russmann, H., H. Shams, F. Poblete, Y. Fu, J.E. Galan, et al. (1998), Delivery of epitopes by the *Salmonella* type III secretion system for vaccine development, Science, 281:565-8.
- 15 17. Russmann, H., U. Gerdemann, E.I. Igwe, K. Panthel, J. Heesemann, et al. (2003), Attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* carrier vaccine for simultaneous antigen-specific CD4 and CD8 T-cell induction, Infect. Immun., 71:3463-72.
18. Chaux, P., R. Luiten, N. Demotte, V. Vantomme, V. Stroobant, et al. (1999), Identification of five MAGE-A1 epitopes recognized by cytolytic T lymphocytes obtained by *in vitro* stimulation with dendritic cells transduced with MAGE-A1, J. Immunol., 163:2928-36.
19. Blanco-Toribio, A., S. Muyldermans, G. Frankel, y L.A. Fernández (2010), Direct injection of functional single-domain antibodies from *E. coli* into human cells, PLoS One, 5: e15227.
- 20 20. Bichsel, C, D. Neeld, T. Hamazaki, L.J. Chang, L.J. Yang, et al. (2013), Direct reprogramming of fibroblasts to myocytes via bacterial injection of MyoD protein, Cell Reprogram., 15:117-25.
21. Bichsel, C, D.K. Neeld, T. Hamazaki, D. Wu, L.J. Chang, et al. (2011), Bacterial delivery of nuclear proteins into pluripotent and differentiated cells, PLoS One, 6: e16465.
22. Chamekh, M., A. Phalipon, R. Quertainmont, I. Salmon, P. Sansonetti, et al. (2008), Delivery of biologically active anti-inflammatory cytokines IL-10 and IL-1ra *in vivo* by the *Shigella* type III secretion apparatus, J. Immunol., 180:4292-8.
23. Hoffman, R.M. (2011), Tumor-seeking *Salmonella* amino acid auxotrophs, Curr. Opin. Biotechnol., 22:917-23.
24. Hoang, T.T., S. Williams, H.P. Schweizer, y J.S. Lam (1997), Molecular genetic analysis of the region containing the essential *Pseudomonas aeruginosa* *asd* gene encoding aspartate-beta-semialdehyde dehydrogenase, Microbiology, 143 (pt. 3):899-907.
- 30 25. Skurnik, M., y H. Wolf-Watz (1989), Analysis of the *yopA* gene encoding the Yopl virulence determinants of *Yersinia* spp, Mol. Microbiol., 3:517-29.
26. Tertti, R., M. Skurnik, T. Vartio, y P. Kuusela (1992), Adhesion protein YadA of *Yersinia* species mediates binding of bacteria to fibronectin, Infect. Immun., 60:3021-4.
- 35 27. Isberg, R.R., y J.M. Leong (1990), Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells, Cell, 60:861-71.
28. Isberg, R.R., D.L. Voorhis, y S. Falkow (1987), Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells, Cell, 50:769-78.
29. Leong, J.M., R.S. Fournier, y R.R. Isberg (1990), Identification of the integrin binding domain of the *Yersinia pseudotuberculosis* invasin protein, EMBO J., 9:1979-89.
- 40 30. Mota, L.J., y G.R. Cornells (2005), The bacterial injection kit: type III secretion systems, Ann Med., 37:234-49.
31. Trosky, J.E., A.D. Liverman, y K. Orth (2008), *Yersinia* outer proteins: Yops, Cell Microbiol., 10:557-65.
32. Brenner, D., y T.W. Mak (2009), Mitochondrial cell death effectors, Curr. Opin. Cell. Biol., 21:871-77.
33. Chalah, A., y R. Khosravi-Far (2008), The mitochondrial death pathway, Adv. Exp. Med. Biol., 615:25-45.
34. Fuchs, Y., y H. Steller (2011), Programmed cell death in animal development and disease, Cell, 147:742-58.
- 45 35. Waugh, D.S. (2011), An overview of enzymatic reagents for the removal of affinity tags, Protein Expr. Purif., 80:283-93.
36. Sarker, M.R., C. Neyt, I. Stainier, y G.R. Cornells (1998), The *Yersinia* Yop virulon: LcrV is required for extrusion

- of the translocators YopB and YopD, *J. Bacteriol.*, 180:1207-14.
37. Ramamurthi, K.S., y O. Schneewind (2005), A synonymous mutation in *Yersinia enterocolitica* yopE affects the function of the YopE type III secretion signal, *J. Bacteriol.*, 187:707-15.
38. Wo Ike, S., N. Ackermann, y J. Heesemann (2011), The *Yersinia enterocolitica* type 3 secretion system (T3SS) as toolbox for studying the cell biological effects of bacterial Rho GTPase modulating T3SS effector proteins, *Cell Microbiol.*, 13:1339-1357.
39. Forsberg, A., y H. Wolf-Watz (1990), Genetic analysis of the yopE region of *Yersinia* spp.: identification of a novel conserved locus, yerA, regulating yopE expression, *J. Bacteriol.*, 172:1547-55.
40. Sambrook, J., 2001, Molecular cloning: a laboratory manual, D.W. Russell, editor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
41. Alto, N.M., y J.E. Dixon (2008), Analysis of Rho-GTPase mimicry by a family of bacterial type III effector proteins, *Methods Enzymol.*, 439:131-43.
42. Alto, N.M., F. Shao, C.S. Lazar, R.L. Brost, G. Chua, *et al.* (2006), Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions, *Cell*, 124:133-45.
43. Kaniga, K., I. Delor, y G.R. Cornells (1991), A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the blaA gene of *Yersinia enterocolitica*, *Gene*, 109:137-41.
44. Yoneda, Y., T. Semba, Y. Kaneda, R.L. Noble, Y. Matsuoka, *et al.* (1992), A long synthetic peptide containing a nuclear localization signal and its flanking sequences of SV40 T-antigen directs the transport of IgM into the nucleus efficiently, *Exp. Cell. Res.*, 201:313-20.
45. Cornells, G.R., 1997, Cross talk between *Yersinia* and eukaryotic cells, en Molecular aspects of host-pathogen interactions, S. MoCRAE, SMYTH, STOW, editor, Cambridge University Press.
46. Metcalf, W.W., W. Jiang, y B.L. Wanner (1994), Use of the rep technique for allele replacement to construct new *Escherichia coli* hosts for maintenance of R6K gamma origin plasmids at different copy numbers, *Gene*, 138:1-7.
47. Diepold, A., M. Amstutz, S. Abel, I. Sorg, U. Jenal, *et al.* (2010), Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome, *EMBO J.*, 29:1928-1940.
48. Iriarte, M., I. Stainier, y G.R. Cornells (1995), The rpoS gene from *Yersinia enterocolitica* and its influence on expression of virulence factors, *Infect. Immun.*, 63:1840-1847.
49. Cornells, G., J.C. Vanootegem, y C. Sluiters (1987), Transcription of the yop regulon from *Y. enterocolitica* requires trans acting pYV and chromosomal genes, *Microb. Pathog.*, 2:367-379.
50. Grosdent, N., I. Maridonneau-Parini, M.P. Sory, y G.R. Cornells (2002), Role of Yops and adhesins in resistance of *Yersinia enterocolitica* to phagocytosis, *Infect. Immun.*, 70:4165-4176.
51. Dehio, C., M. Meyer, J. Berger, H. Schwarz, y C. Lanz (1997), Interaction of *Bartonella henselae* with endothelial cells results in bacterial aggregation on the cell surface and the subsequent engulfment and internalisation of the bacterial aggregate by a unique structure, the invasome, *J. Cell. Sci.*, 110 (pt. 18):2141-2154.
52. Westerfield, M. (2000), The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish *Danio rerio* University of Oregon Press, Eugene, OR.
53. Kimmel, C.B., W.W. Ballard, S.R. Kimmel, B. Ullmann, y T.F. Schilling (1995), Stages of embryonic development of the zebrafish, *Dev. Dyn.*, 203:253-310.
54. Benard, E.X., A.M. van der Sar, F. Ellett, G.J. Lieschke, H.P. Spaink, *et al.* (2012), Infection of zebrafish embryos with intracellular bacterial pathogens, *J. Vis. Exp.*
55. Blum, Y., H.G. Belting, E. EUertsdottir, L. Herwig, F. Luders, *et al.* (2008), Complex cell rearrangements during intersegmental vessel sprouting and vessel fusion in the zebrafish embryo, *Dev. Biol.*, 316:312-322.
56. Herwig, L., Y. Blum, A. Krudewig, E. EUertsdottir, A. Lenard, *et al.* (2011), Distinct cellular mechanisms of blood vessel fusion in the zebrafish embryo, *Curr. Biol.*, 21:1942-1948.
57. Carpenter, A.E., T.R. Jones, M.R. Lamprecht, C. Clarke, I.H. Kang, *et al.* (2006), CellProfiler: image analysis software for identifying and quantifying cell phenotypes, *Genome Biol.*, 7: R100.
58. Bensimon, A., A. Schmidt, Y. Ziv, R. Elkon, S.Y. Wang, *et al.* (2010), ATM-dependent and -independent dynamics of the nuclear phosphoproteome after DNA damage, *Sci. Signal.*, 3: rs3.

59. Perkins, D.N., D.J. Pappin, D.M. Creasy, y J.S. Cottrell (1999), Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data, *Electrophoresis*, 20:3551-3567.
60. Smyth, G.K. (2004), Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments, *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol.*, 3: artículo3.
- 5 61. Ting, L., M.J. Cowley, S.L. Hoon, M. Guilhaus, M.J. Raftery, et al. (2009), Normalization and statistical analysis of quantitative proteomics data generated by metabolic labeling, *Mol. Cell. Proteomics*, 8:2227-2242.
62. Vizcaino, J.A., R.G. Cote, A. Csordas, J.A. Dianes, A. Fabregat, et al. (2013), The PRoteomics IDEntifications (PRIDE) database and associated tools: status in 2013, *Nucleic Acids Res.*, 41:D1063-1069.
- 10 63. Boyd, A.P., I. Lamermont, y G.R. Cornells (2000), Competition between the Yops of *Yersinia enterocolitica* for delivery into eukaryotic cells: role of the SycE chaperone binding domain of YopE, *J. Bacteriol.*, 182:4811-4821.
64. Iriarte, M., y G.R. Cornells (1998), YopT, a new *Yersinia* Yop effector protein, affects the cytoskeleton of host cells, *Mol. Microbiol.*, 29:915-929.
- 15 65. Kudryashev, M., M. Stenta, S. Schmelz, M. Amstutz, U. Wiesand, et al. (2013), In situ structural analysis of the *Yersinia enterocolitica* injectisome, *Elife*, 2: e00792.
66. Schulte, R., G.A. Grassl, S. Preger, S. Fessele, C.A. Jacobi, et al. (2000), *Yersinia enterocolitica* invasin protein triggers IL-8 production in epithelial cells via activation of Rel p65-p65 homodimers, *FASEB J.*, 14:1471-1484.
- 20 67. Mota, L.J., L. Journet, I. Sorg, C. Agrain, y G.R. Cornells (2005), Bacterial injectisomes: needle length does matter, *Science*, 307:1278.
68. Isaksson, EX., M. Aili, A. Fahlgren, S.E. Carlsson, R. Rosqvist, et al. (2009), The membrane localization domain is required for intracellular localization and autoregulation of YopE in *Yersinia pseudotuberculosis*, *Infect. Immun.*, 77:4740-4749.
- 25 69. Denecker, G., S. Totemeyer, L.J. Mota, P. Troisfontaines, I. Lamermont, et al. (2002), Effect of low- and high-virulence *Yersinia enterocolitica* strains on the inflammatory response of human umbilical vein endothelial cells, *Infect. Immun.*, 70:3510-3520.
70. Sharma, S., A. Hirabuchi, K. Yoshida, K. Fujisaki, A. Ito, et al. (2013), Deployment of the *Burkholderia glumae* type III secretion system as an efficient tool for translocating pathogen effectors to monocot cells, *Plant J.*, 74:701-712.
- 25 71. Carrington, J.C., y W.G. Dougherty (1988), A viral cleavage site cassette: identification of amino acid sequences required for tobacco etch virus polyprotein processing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85:3391-3395.
72. Kapust, R.B., J. Tozser, T.D. Copeland, y D.S. Waugh (2002), The PE specificity of tobacco etch virus protease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294:949-955.
- 30 73. Liang, H., H. Gao, C.A. Maynard, y W.A. Powell (2005), Expression of a self-processing, pathogen resistance-enhancing gene construct in *Arabidopsis*, *Biotechnol. Lett.*, 27:435-442.
74. Weber, W., C. Fux, M. Daoud-el Baba, B. Keller, C.C. Weber, et al. (2002), Macrolide- based transgene control in mammalian cells and mice, *Nat. Biotechnol.*, 20:901-907.
- 35 75. Kapust, R.B., J. Tozser, J.D. Fox, D.E. Anderson, S. Cherry, et al. (2001), Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild-type catalytic proficiency, *Protein Eng.*, 14:993-1000.
76. Lee, V.T., D.M. Anderson, y O. Schneewind (1998), Targeting of *Yersinia* Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one-step translocation of YopE across bacterial and eukaryotic membranes is dependent on SycE chaperone, *Mol. Microbiol.*, 28:593- 601.
- 40 77. Gray, D.C., S. Mahrus, y J. A. Wells (2010), Activation of specific apoptotic caspases with an engineered small-molecule-activated protease, *Cell*, 142:637-646.
78. Henrichs, T., N. Mikhaleva, C. Conz, E. Deuerling, D. Boyd, et al. (2005), Target-directed proteolysis at the ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 102:4246-4251.
- 45 79. Hardt, W.D., L.M. Chen, K.E. Schuebel, X.R. Bustelo, y J.E. Galan (1998), *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells, *Cell*, 93:815-826.
80. Hakansson, S., K. Schesser, C. Persson, E.E. Galyov, R. Rosqvist, et al. (1996), The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane

- and displays a contact-dependent membrane disrupting activity, EMBO J., 15:5812-5823.
81. Stebbins, C.E., y J.E. Galan (2001), Structural mimicry in bacterial virulence, Nature, 412:701-705.
82. Li, FL, H. Xu, Y. Zhou, J. Zhang, C. Long, *et al.* (2007), The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family, Science, 315:1000-1003.
- 5 83. Norris, F.A., M.P. Wilson, T.S. Wallis, E.E. Galyov, y P.W. Majerus (1998), SopB, a protein required for virulence of *Salmonella dublin*, is an inositol phosphate phosphatase, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 95:14057-14059.
84. Pulliainen, A.T., K. Pieles, C.S. Brand, B. Hauert, A. Bohm, *et al.* (2012). Bacterial effector binds host cell adenylyl cyclase to potentiate Galphas-dependent cAMP production, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 109:9581-9586.
- 10 85. Li, FL, H. Zhu, C.J. Xu, y J. Yuan (1998), Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, Cell, 94:491-501.
86. Nagaraj, N., J.R. Wisniewski, T. Geiger, J. Cox, M. Kircher, *et al.* (2011), Deep proteome and transcriptome mapping of a human cancer cell line, Mol. Syst. Biol., 7:548.
87. Caussinus, E., O. Kanca, y M. Affolter (2011), Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody, Nat. Struct. Mol. Biol., 19:117-121.
- 15 88. Cosma, C.L., L.E. Swaim, H. Volkman, L. Ramakrishnan, y J.M. Davis (2006), Zebrafish and frog models of *Mycobacterium marinum* infection, Curr. Protoc. Microbiol., capítulo 10: unidad 10B 2.
89. Mathias, J.R., M.E. Dodd, K.B. Walters, S.K. Yoo, E.A. Ranheim, *et al.* (2009), Characterization of zebrafish larval inflammatory macrophages, Dev. Comp. Immunol., 33:1212-1217.
- 20 90. Jette, C.A., A.M. Flanagan, J. Ryan, U.J. Pyati, S. Carboneau, *et al.* (2008), BIM and other BCL-2 family proteins exhibit cross-species conservation of function between zebrafish and mammals, Cell Death Differ., 15:1063-1072.
91. Olsen, J.V., B. Blagoev, F. Gnad, B. Macek, C. Kumar, *et al.* (2006), Global, *in vivo*, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks, Cell, 127:635-648.
- 25 92. Schmutz, C, E. Ahne, C.A. Kasper, T. Tschon, I. Sorg, *et al.* (2013), Systems-Level Overview of Host Protein Phosphorylation During *Shigella flexneri* Infection Revealed by Phosphoproteomics, Mol. Cell. Proteomics, 12:2952-2968.
93. Szklarczyk, D., A. Franceschini, M. Kuhn, M. Simonovic, A. Roth, *et al.* (2011), The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored, Nucleic Acids Res., 39: D561-568.
- 30 94. Huang da, W., B.T. Sherman, y R.A. Lempicki (2009), Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists, Nucleic Acids Res., 37:1-13.
95. Huang da, W., B.T. Sherman, R. Stephens, M.W. Baseler, H.C. Lane, *et al.* (2008), DAVID gene ID conversion tool, Bioinformation, 2:428-430.
96. Schwerk, C, y K. Schulze-Osthoff (2005), Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing, Mol. Cell., 19:1-13.
- 35 97. Papagiannakopoulos, T., A. Shapiro, y K.S. Kosik (2008), MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells, Cancer Res., 68:8164-8172.
98. Hoiseth, S.K., B.A. Stocker (1981), Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and effective as live vaccines, Nature, 291:238-239.

#### Listado de secuencias

- 40 <110> Universidad de Basilea  
<120> Transporte de proteínas basado en bacterias  
<130> P3119PC00
- 45 <160> 199  
<170> PatentIn versión 3.5

ES 2 754 508 T3

<210> 1  
<211> 219  
<212> PRT  
<213> Yersinia enterocolitica

5

<400> 1  
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Gly Ser Gly Pro Leu Arg  
130 135 140

Gly Ser Ile Thr Gln Cys Gln Gly Leu Met Gln Phe Cys Gly Gly Glu  
145 150 155 160

Leu Gln Ala Glu Ala Ser Ala Ile Leu Asn Thr Pro Val Cys Gly Ile  
165 170 175

Pro Phe Ser Gln Trp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Ser Ala Tyr Val  
180 185 190

Ala Ser Gly Val Asp Leu Thr Gln Ala Ala Asn Glu Ile Lys Gly Leu  
195 200 205

Gly Gln Gln Met Gln Gln Leu Leu Ser Leu Met  
210 215

10

<210> 2  
<211> 138  
<212> PRT  
<213> Yersinia enterocolitica

15

<400> 2

ES 2 754 508 T3

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr  
130 135

<210> 3

<211> 169

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138-Mychis

10 <400> 3

ES 2 754 508 T3

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Phe Glu  
130 135 140

Lys Leu Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser  
145 150 155 160

Ala Val Asp His His His His His  
165

<210> 4

<211> 348

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - lpgB1

10

<400> 4

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

ES 2 754 508 T3

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Met Gln Ile Leu  
130 135 140

Asn Lys Ile Leu Pro Gln Val Glu Phe Ala Ile Pro Arg Pro Ser Phe  
145 150 155 160

Asp Ser Leu Ser Arg Asn Lys Leu Val Lys Lys Ile Leu Ser Val Phe  
165 170 175

Asn Leu Lys Gln Arg Phe Pro Gln Lys Asn Phe Gly Cys Pro Val Asn  
180 185 190

Ile Asn Lys Ile Arg Asp Ser Val Ile Asp Lys Ile Lys Asp Ser Asn  
195 200 205

Ser Gly Asn Gln Leu Phe Cys Trp Met Ser Gln Glu Arg Thr Thr Tyr  
210 215 220

Val Ser Ser Met Ile Asn Arg Ser Ile Asp Glu Met Ala Ile His Asn  
225 230 235 240

Gly Val Val Leu Thr Ser Asp Asn Lys Arg Asn Ile Phe Ala Ala Ile  
245 250 255

Glu Lys Lys Phe Pro Asp Ile Lys Leu Asp Glu Lys Ser Ala Gln Thr  
260 265 270

Ser Ile Ser His Thr Ala Leu Asn Glu Ile Ala Ser Ser Gly Leu Arg  
275 280 285

ES 2 754 508 T3

Ala Lys Ile Leu Lys Arg Tyr Ser Ser Asp Met Asp Leu Phe Asn Thr  
290 295 300

Gln Met Lys Asp Leu Thr Asn Leu Val Ser Ser Ser Val Tyr Asp Lys  
305 310 315 320

Ile Phe Asn Glu Ser Thr Lys Val Leu Gln Ile Glu Ile Ser Ala Glu  
325 330 335

Val Leu Lys Ala Val Tyr Arg Gln Ser Asn Thr Asn  
340 345

<210> 5

<211> 380

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - SopE

10

<400> 5

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Val Thr Asn Ile  
130 135 140

ES 2 754 508 T3

Thr Leu Ser Thr Gln His Tyr Arg Ile His Arg Ser Asp Val Glu Pro  
145 150 155 160

Val Lys Glu Lys Thr Thr Glu Lys Asp Ile Phe Ala Lys Ser Ile Thr  
165 170 175

Ala Val Arg Asn Ser Phe Ile Ser Leu Ser Thr Ser Leu Ser Asp Arg  
180 185 190

Phe Ser Leu His Gln Gln Thr Asp Ile Pro Thr Thr His Phe His Arg  
195 200 205

Gly Asn Ala Ser Glu Gly Arg Ala Val Leu Thr Ser Lys Thr Val Lys  
210 215 220

Asp Phe Met Leu Gln Lys Leu Asn Ser Leu Asp Ile Lys Gly Asn Ala  
225 230 235 240

Ser Lys Asp Pro Ala Tyr Ala Arg Gln Thr Cys Glu Ala Ile Leu Ser  
245 250 255

Ala Val Tyr Ser Asn Asn Lys Asp Gln Cys Cys Lys Leu Ile Ser  
260 265 270

Lys Gly Val Ser Ile Thr Pro Phe Leu Lys Glu Ile Gly Glu Ala Ala  
275 280 285

Gln Asn Ala Gly Leu Pro Gly Glu Ile Lys Asn Gly Val Phe Thr Pro  
290 295 300

Gly Gly Ala Gly Ala Asn Pro Phe Val Val Pro Leu Ile Ala Ser Ala  
305 310 315 320

Ser Ile Lys Tyr Pro His Met Phe Ile Asn His Asn Gln Gln Val Ser  
325 330 335

Phe Lys Ala Tyr Ala Glu Lys Ile Val Met Lys Glu Val Thr Pro Leu  
340 345 350

Phe Asn Lys Gly Thr Met Pro Thr Pro Gln Gln Phe Gln Leu Thr Ile  
355 360 365

Glu Asn Ile Ala Asn Lys Tyr Leu Gln Asn Ala Ser  
370 375 380

<210> 6

<211> 701

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - SopB

10 <400> 6

ES 2 754 508 T3

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Met Gln Ile Gln  
130 135 140

Ser Phe Tyr His Ser Ala Ser Leu Lys Thr Gln Glu Ala Phe Lys Ser  
145 150 155 160

Leu Gln Lys Thr Leu Tyr Asn Gly Met Gln Ile Leu Ser Gly Gln Gly  
165 170 175

Lys Ala Pro Ala Lys Ala Pro Asp Ala Arg Pro Glu Ile Ile Val Leu  
180 185 190

Arg Glu Pro Gly Ala Thr Trp Gly Asn Tyr Leu Gln His Gln Lys Ala  
195 200 205

Ser Asn His Ser Leu His Asn Leu Tyr Asn Leu Gln Arg Asp Leu Leu  
210 215 220

ES 2 754 508 T3

Thr Val Ala Ala Thr Val Leu Gly Lys Gln Asp Pro Val Leu Thr Ser  
225 230 235 240

Met Ala Asn Gln Met Glu Leu Ala Lys Val Lys Ala Asp Arg Pro Ala  
245 250 255

Thr Lys Gln Glu Glu Ala Ala Lys Ala Leu Lys Lys Asn Leu Ile  
260 265 270

Glu Leu Ile Ala Ala Arg Thr Gln Gln Gln Asp Gly Leu Pro Ala Lys  
275 280 285

Glu Ala His Arg Phe Ala Ala Val Ala Phe Arg Asp Ala Gln Val Lys  
290 295 300

Gln Leu Asn Asn Gln Pro Trp Gln Thr Ile Lys Asn Thr Leu Thr His  
305 310 315 320

Asn Gly His His Tyr Thr Asn Thr Gln Leu Pro Ala Ala Glu Met Lys  
325 330 335

Ile Gly Ala Lys Asp Ile Phe Pro Ser Ala Tyr Glu Gly Lys Gly Val  
340 345 350

Cys Ser Trp Asp Thr Lys Asn Ile His His Ala Asn Asn Leu Trp Met  
355 360 365

Ser Thr Val Ser Val His Glu Asp Gly Lys Asp Lys Thr Leu Phe Cys  
370 375 380

Gly Ile Arg His Gly Val Leu Ser Pro Tyr His Glu Lys Asp Pro Leu  
385 390 395 400

Leu Arg His Val Gly Ala Glu Asn Lys Ala Lys Glu Val Leu Thr Ala  
405 410 415

Ala Leu Phe Ser Lys Pro Glu Leu Leu Asn Lys Ala Leu Ala Gly Glu  
420 425 430

Ala Val Ser Leu Lys Leu Val Ser Val Gly Leu Leu Thr Ala Ser Asn  
435 440 445

Ile Phe Gly Lys Glu Gly Thr Met Val Glu Asp Gln Met Arg Ala Trp  
450 455 460

Gln Ser Leu Thr Gln Pro Gly Lys Met Ile His Leu Lys Ile Arg Asn  
465 470 475 480

ES 2 754 508 T3

Lys Asp Gly Asp Leu Gln Thr Val Lys Ile Lys Pro Asp Val Ala Ala  
485 490 495

Phe Asn Val Gly Val Asn Glu Leu Ala Leu Lys Leu Gly Phe Gly Leu  
500 505 510

Lys Ala Ser Asp Ser Tyr Asn Ala Glu Ala Leu His Gln Leu Leu Gly  
515 520 525

Asn Asp Leu Arg Pro Glu Ala Arg Pro Gly Gly Trp Val Gly Glu Trp  
530 535 540

Leu Ala Gln Tyr Pro Asp Asn Tyr Glu Val Val Asn Thr Leu Ala Arg  
545 550 555 560

Gln Ile Lys Asp Ile Trp Lys Asn Asn Gln His His Lys Asp Gly Gly  
565 570 575

Glu Pro Tyr Lys Leu Ala Gln Arg Leu Ala Met Leu Ala His Glu Ile  
580 585 590

Asp Ala Val Pro Ala Trp Asn Cys Lys Ser Gly Lys Asp Arg Thr Gly  
595 600 605

Met Met Asp Ser Glu Ile Lys Arg Glu Ile Ile Ser Leu His Gln Thr  
610 615 620

His Met Leu Ser Ala Pro Gly Ser Leu Pro Asp Ser Gly Gly Gln Lys  
625 630 635 640

Ile Phe Gln Lys Val Leu Leu Asn Ser Gly Asn Leu Glu Ile Gln Lys  
645 650 655

Gln Asn Thr Gly Gly Ala Gly Asn Lys Val Met Lys Asn Leu Ser Pro  
660 665 670

Glu Val Leu Asn Leu Ser Tyr Gln Lys Arg Val Gly Asp Glu Asn Ile  
675 680 685

Trp Gln Ser Val Lys Gly Ile Ser Ser Leu Ile Thr Ser  
690 695 700

<210> 7

<211> 383

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - OspF

10 <400> 7

ES 2 754 508 T3

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Phe Glu  
130 135 140

Met Pro Ile Lys Lys Pro Cys Leu Lys Leu Asn Leu Asp Ser Leu Asn  
145 150 155 160

Val Val Arg Ser Glu Ile Pro Gln Met Leu Ser Ala Asn Glu Arg Leu  
165 170 175

Lys Asn Asn Phe Asn Ile Leu Tyr Asn Gln Ile Arg Gln Tyr Pro Ala  
180 185 190

Tyr Tyr Phe Lys Val Ala Ser Asn Val Pro Thr Tyr Ser Asp Ile Cys  
195 200 205

Gln Ser Phe Ser Val Met Tyr Gln Gly Phe Gln Ile Val Asn His Ser  
210 215 220

Gly Asp Val Phe Ile His Ala Cys Arg Glu Asn Pro Gln Ser Lys Gly  
225 230 235 240

ES 2 754 508 T3

Asp Phe Val Gly Asp Lys Phe His Ile Ser Ile Ala Arg Glu Gln Val  
245 250 255

Pro Leu Ala Phe Gln Ile Leu Ser Gly Leu Leu Phe Ser Glu Asp Ser  
260 265 270

Pro Ile Asp Lys Trp Lys Ile Thr Asp Met Asn Arg Val Ser Gln Gln  
275 280 285

Ser Arg Val Gly Ile Gly Ala Gln Phe Thr Leu Tyr Val Lys Ser Asp  
290 295 300

Gln Glu Cys Ser Gln Tyr Ser Ala Leu Leu Leu His Lys Ile Arg Gln  
305 310 315 320

Phe Ile Met Cys Leu Glu Ser Asn Leu Leu Arg Ser Lys Ile Ala Pro  
325 330 335

Gly Glu Tyr Pro Ala Ser Asp Val Arg Pro Glu Asp Trp Lys Tyr Val  
340 345 350

Ser Tyr Arg Asn Glu Leu Arg Ser Asp Arg Asp Gly Ser Glu Arg Gln  
355 360 365

Glu Gln Met Leu Arg Glu Glu Pro Phe Tyr Arg Leu Met Ile Glu  
370 375 380

<210> 8

<211> 685

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - SptP

10

<400> 8

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

ES 2 754 508 T3

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Leu  
130 135 140

Lys Tyr Glu Glu Arg Lys Leu Asn Asn Leu Thr Leu Ser Ser Phe Ser  
145 150 155 160

Lys Val Gly Val Ser Asn Asp Ala Arg Leu Tyr Ile Ala Lys Glu Asn  
165 170 175

Thr Asp Lys Ala Tyr Val Ala Pro Glu Lys Phe Ser Ser Lys Val Leu  
180 185 190

Thr Trp Leu Gly Lys Met Pro Leu Phe Lys Asn Thr Glu Val Val Gln  
195 200 205

Lys His Thr Glu Asn Ile Arg Val Gln Asp Gln Lys Ile Leu Gln Thr  
210 215 220

Phe Leu His Ala Leu Thr Glu Lys Tyr Gly Glu Thr Ala Val Asn Asp  
225 230 235 240

Ala Leu Leu Met Ser Arg Ile Asn Met Asn Lys Pro Leu Thr Gln Arg  
245 250 255

Leu Ala Val Gln Ile Thr Glu Cys Val Lys Ala Ala Asp Glu Gly Phe  
260 265 270

Ile Asn Leu Ile Lys Ser Lys Asp Asn Val Gly Val Arg Asn Ala Ala  
275 280 285

Leu Val Ile Lys Gly Gly Asp Thr Lys Val Ala Glu Lys Asn Asn Asp  
290 295 300

Val Gly Ala Glu Ser Lys Gln Pro Leu Leu Asp Ile Ala Leu Lys Gly  
305 310 315 320

ES 2 754 508 T3

Leu Lys Arg Thr Leu Pro Gln Leu Glu Gln Met Asp Gly Asn Ser Leu  
325 330 335

Arg Glu Asn Phe Gln Glu Met Ala Ser Gly Asn Gly Pro Leu Arg Ser  
340 345 350

Leu Met Thr Asn Leu Gln Asn Leu Asn Lys Ile Pro Glu Ala Lys Gln  
355 360 365

Leu Asn Asp Tyr Val Thr Thr Leu Thr Asn Ile Gln Val Gly Val Ala  
370 375 380

Arg Phe Ser Gln Trp Gly Thr Cys Gly Gly Glu Val Glu Arg Trp Val  
385 390 395 400

Asp Lys Ala Ser Thr His Glu Leu Thr Gln Ala Val Lys Lys Ile His  
405 410 415

Val Ile Ala Lys Glu Leu Lys Asn Val Thr Ala Glu Leu Glu Lys Ile  
420 425 430

Glu Ala Gly Ala Pro Met Pro Gln Thr Met Ser Gly Pro Thr Leu Gly  
435 440 445

Leu Ala Arg Phe Ala Val Ser Ser Ile Pro Ile Asn Gln Gln Thr Gln  
450 455 460

Val Lys Leu Ser Asp Gly Met Pro Val Pro Val Asn Thr Leu Thr Phe  
465 470 475 480

Asp Gly Lys Pro Val Ala Leu Ala Gly Ser Tyr Pro Lys Asn Thr Pro  
485 490 495

Asp Ala Leu Glu Ala His Met Lys Met Leu Leu Glu Lys Glu Cys Ser  
500 505 510

Cys Leu Val Val Leu Thr Ser Glu Asp Gln Met Gln Ala Lys Gln Leu  
515 520 525

Pro Pro Tyr Phe Arg Gly Ser Tyr Thr Phe Gly Glu Val His Thr Asn  
530 535 540

Ser Gln Lys Val Ser Ser Ala Ser Gln Gly Glu Ala Ile Asp Gln Tyr  
545 550 555 560

Asn Met Gln Leu Ser Cys Gly Glu Lys Arg Tyr Thr Ile Pro Val Leu

## ES 2 754 508 T3

565

570

575

His Val Lys Asn Trp Pro Asp His Gln Pro Leu Pro Ser Thr Asp Gln  
 580 585 590

Leu Glu Tyr Leu Ala Asp Arg Val Lys Asn Ser Asn Gln Asn Gly Ala  
 595 600 605

Pro Gly Arg Ser Ser Ser Asp Lys His Leu Pro Met Ile His Cys Leu  
 610 615 620

Gly Gly Val Gly Arg Thr Gly Thr Met Ala Ala Ala Leu Val Leu Lys  
 625 630 635 640

Asp Asn Pro His Ser Asn Leu Glu Gln Val Arg Ala Asp Phe Arg Asp  
 645 650 655

Ser Arg Asn Asn Arg Met Leu Glu Asp Ala Ser Gln Phe Val Gln Leu  
 660 665 670

Lys Ala Met Gln Ala Gln Leu Leu Met Thr Thr Ala Ser  
 675 680 685

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 678

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; YopE1-138 - lpgD

10

&lt;400&gt; 9

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
 1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
 20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
 35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
 50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
 65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
 85 90 95

ES 2 754 508 T3

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Met His Ile Thr  
130 135 140

Asn Leu Gly Leu His Gln Val Ser Phe Gln Ser Gly Asp Ser Tyr Lys  
145 150 155 160

Gly Ala Glu Glu Thr Gly Lys His Lys Gly Val Ser Val Ile Ser Tyr  
165 170 175

Gln Arg Val Lys Asn Gly Glu Arg Asn Lys Gly Ile Glu Ala Leu Asn  
180 185 190

Arg Leu Tyr Leu Gln Asn Gln Thr Ser Leu Thr Gly Lys Ser Leu Leu  
195 200 205

Phe Ala Arg Asp Lys Ala Glu Val Phe Cys Glu Ala Ile Lys Leu Ala  
210 215 220

Gly Gly Asp Thr Ser Lys Ile Lys Ala Met Met Glu Arg Leu Asp Thr  
225 230 235 240

Tyr Lys Leu Gly Glu Val Asn Lys Arg His Ile Asn Glu Leu Asn Lys  
245 250 255

Val Ile Ser Glu Glu Ile Arg Ala Gln Leu Gly Ile Lys Asn Lys Lys  
260 265 270

Glu Leu Gln Thr Lys Ile Lys Gln Ile Phe Thr Asp Tyr Leu Asn Asn  
275 280 285

Lys Asn Trp Gly Pro Val Asn Lys Asn Ile Ser His His Gly Lys Asn  
290 295 300

Tyr Ser Phe Gln Leu Thr Pro Ala Ser His Met Lys Ile Gly Asn Lys  
305 310 315 320

Asn Ile Phe Val Lys Glu Tyr Asn Gly Lys Gly Ile Cys Cys Ala Ser  
325 330 335

Thr Arg Glu Arg Asp His Ile Ala Asn Met Trp Leu Ser Lys Val Val

ES 2 754 508 T3

340

345

350

Asp Asp Glu Gly Lys Glu Ile Phe Ser Gly Ile Arg His Gly Val Ile  
355 360 365

Ser Ala Tyr Gly Leu Lys Lys Asn Ser Ser Glu Arg Ala Val Ala Ala  
370 375 380

Arg Asn Lys Ala Glu Glu Leu Val Ser Ala Ala Leu Tyr Ser Arg Pro  
385 390 395 400

Glu Leu Leu Ser Gln Ala Leu Ser Gly Lys Thr Val Asp Leu Lys Ile  
405 410 415

Val Ser Thr Ser Leu Leu Thr Pro Thr Ser Leu Thr Gly Gly Glu Glu  
420 425 430

Ser Met Leu Lys Asp Gln Val Ser Ala Leu Lys Gly Leu Asn Ser Lys  
435 440 445

Arg Gly Gly Pro Thr Lys Leu Leu Ile Arg Asn Ser Asp Gly Leu Leu  
450 455 460

Lys Glu Val Ser Val Asn Leu Lys Val Val Thr Phe Asn Phe Gly Val  
465 470 475 480

Asn Glu Leu Ala Leu Lys Met Gly Leu Gly Trp Arg Asn Val Asp Lys  
485 490 495

Leu Asn Asp Glu Ser Ile Cys Ser Leu Leu Gly Asp Asn Phe Leu Lys  
500 505 510

Asn Gly Val Ile Gly Gly Trp Ala Ala Glu Ala Ile Glu Lys Asn Pro  
515 520 525

Pro Cys Lys Asn Asp Val Ile Tyr Leu Ala Asn Gln Ile Lys Glu Ile  
530 535 540

Val Asn Asn Lys Leu Gln Lys Asn Asp Asn Gly Glu Pro Tyr Lys Leu  
545 550 555 560

Ser Gln Arg Val Thr Leu Leu Ala Tyr Thr Ile Gly Ala Val Pro Cys  
565 570 575

Trp Asn Cys Lys Ser Gly Lys Asp Arg Thr Gly Met Gln Asp Ala Glu  
580 585 590

ES 2 754 508 T3

Ile Lys Arg Glu Ile Ile Arg Lys His Glu Thr Gly Gln Phe Ser Gln  
595 600 605

Leu Asn Ser Lys Leu Ser Ser Glu Glu Lys Arg Leu Phe Ser Thr Ile  
610 615 620

Leu Met Asn Ser Gly Asn Met Glu Ile Gln Glu Met Asn Thr Gly Val  
625 630 635 640

Pro Gly Asn Lys Val Met Lys Lys Leu Pro Leu Ser Ser Leu Glu Leu  
645 650 655

Ser Tyr Ser Glu Arg Ile Gly Asp Pro Lys Ile Trp Asn Met Val Lys  
660 665 670

Gly Tyr Ser Ser Phe Val  
675

<210> 10

<211> 446

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - BepA

10

<400> 10

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr

ES 2 754 508 T3

115                    120                    125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Pro  
130                    135                    140

Lys Ala Lys Ala Lys Thr Lys Asn Thr Glu Ile Ile Ser Pro His His  
145                    150                    155                    160

Tyr Val Tyr Pro Asn Thr Thr Thr Leu Lys Asn Lys Tyr Gly Ile Lys  
165                    170                    175

Asn Leu Asn Ala Phe Leu Glu Lys Cys Ser His Asp Thr Ala Lys Ala  
180                    185                    190

Met Ile Asn Leu Arg Glu Glu Ser Leu Pro Glu Tyr Phe Asp Thr Ala  
195                    200                    205

Tyr Leu Cys His Ile His Gln Gln Leu Phe Lys Asn Thr Phe Glu Trp  
210                    215                    220

Ala Gly Tyr Leu Arg His Ile Pro Phe Thr Phe Ala Asp Gly Thr Thr  
225                    230                    235                    240

Ala Ala Met Pro Glu Met Lys Arg Thr Gly Trp Lys Asn Ala Phe Ala  
245                    250                    255

Ile Gly Asp Glu Ile Gln Glu Gly Leu Gln Arg Leu Asp Gln Thr Leu  
260                    265                    270

Ala Glu Lys Asn Asn Leu Gln Gly Leu Thr Arg Glu Glu Phe Asn Ser  
275                    280                    285

Glu Ala Ile Glu Leu Phe Asn Ser Leu Asn Gln Leu His Pro Phe Arg  
290                    295                    300

Glu Gly Asn Gly Arg Thr Gln Arg Leu Phe Phe Glu Asn Leu Ala Lys  
305                    310                    315                    320

Ala Ala Gly His Gln Leu Asn Phe Ser Leu Ile Thr Lys Glu Arg Met  
325                    330                    335

Met Val Ala Ser Val Ala Val Ala Glu Asn Gly Asp Leu Glu Pro Met  
340                    345                    350

Gln His Leu Phe Glu Asp Ile Ser Asn Pro Glu Lys Ile Arg Leu Leu  
355                    360                    365

ES 2 754 508 T3

Lys Glu Phe Met His Thr Met Lys Asn Thr Gly Arg Asn Val Asn Asp  
370 375 380

Arg Pro Val Met Val Ala Lys Glu Gly Glu Thr Tyr Thr Gly Thr Tyr  
385 390 395 400

Arg Gly Ala Gly Leu Glu Gly Phe Ala Leu Asn Val Lys Gly Ala Tyr  
405 410 415

Ile Ile Gly Asn Ile Asp His Leu Pro Pro Glu Gln Leu Lys Ile Leu  
420 425 430

Lys Pro Gly Asp Lys Ile Thr Phe Thr Ala Pro Lys Ala Glu  
435 440 445

<210> 11

<211> 284

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - BepA E305-end

10

<400> 11

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Glu Gly

## ES 2 754 508 T3

130

135

140

Asn Gly Arg Thr Gln Arg Leu Phe Phe Glu Asn Leu Ala Lys Ala Ala  
 145 150 155 160

Gly His Gln Leu Asn Phe Ser Leu Ile Thr Lys Glu Arg Met Met Val  
 165 170 175

Ala Ser Val Ala Val Ala Glu Asn Gly Asp Leu Glu Pro Met Gln His  
 180 185 190

Leu Phe Glu Asp Ile Ser Asn Pro Glu Lys Ile Arg Leu Leu Lys Glu  
 195 200 205

Phe Met His Thr Met Lys Asn Thr Gly Arg Asn Val Asn Asp Arg Pro  
 210 215 220

Val Met Val Ala Lys Glu Gly Glu Thr Tyr Thr Gly Thr Tyr Arg Gly  
 225 230 235 240

Ala Gly Leu Glu Gly Phe Ala Leu Asn Val Lys Gly Ala Tyr Ile Ile  
 245 250 255

Gly Asn Ile Asp His Leu Pro Pro Glu Gln Leu Lys Ile Leu Lys Pro  
 260 265 270

Gly Asp Lys Ile Thr Phe Thr Ala Pro Lys Ala Glu  
 275 280

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 672

5 &lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Secuencia artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; YopE1-138 - Traf6 murino

10

&lt;400&gt; 12

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
 1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
 20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
 35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
 50 55 60

ES 2 754 508 T3

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Ser  
130 135 140

Leu Leu Asn Cys Glu Asn Ser Cys Gly Ser Ser Gln Ser Ser Ser Asp  
145 150 155 160

Cys Cys Ala Ala Met Ala Ala Ser Cys Ser Ala Ala Val Lys Asp Asp  
165 170 175

Ser Val Ser Gly Ser Ala Ser Thr Gly Asn Leu Ser Ser Ser Phe Met  
180 185 190

Glu Glu Ile Gln Gly Tyr Asp Val Glu Phe Asp Pro Pro Leu Glu Ser  
195 200 205

Lys Tyr Glu Cys Pro Ile Cys Leu Met Ala Leu Arg Glu Ala Val Gln  
210 215 220

Thr Pro Cys Gly His Arg Phe Cys Lys Ala Cys Ile Ile Lys Ser Ile  
225 230 235 240

Arg Asp Ala Gly His Lys Cys Pro Val Asp Asn Glu Ile Leu Leu Glu  
245 250 255

Asn Gln Leu Phe Pro Asp Asn Phe Ala Lys Arg Glu Ile Leu Ser Leu  
260 265 270

Thr Val Lys Cys Pro Asn Lys Gly Cys Leu Gln Lys Met Glu Leu Arg  
275 280 285

His Leu Glu Asp His Gln Val His Cys Glu Phe Ala Leu Val Asn Cys  
290 295 300

Pro Gln Cys Gln Arg Pro Phe Gln Lys Cys Gln Val Asn Thr His Ile

ES 2 754 508 T3

305

310

315

320

Ile Glu Asp Cys Pro Arg Arg Gln Val Ser Cys Val Asn Cys Ala Val  
325 330 335

Ser Met Ala Tyr Glu Glu Lys Glu Ile His Asp Gln Ser Cys Pro Leu  
340 345 350

Ala Asn Ile Ile Cys Glu Tyr Cys Gly Thr Ile Leu Ile Arg Glu Gln  
355 360 365

Met Pro Asn His Tyr Asp Leu Asp Cys Pro Thr Ala Pro Ile Pro Cys  
370 375 380

Thr Phe Ser Val Phe Gly Cys His Gln Lys Met Gln Arg Asn His Leu  
385 390 395 400

Ala Arg His Leu Gln Glu Asn Thr Gln Leu His Met Arg Leu Leu Ala  
405 410 415

Gln Ala Val His Asn Val Asn Leu Ala Leu Arg Pro Cys Asp Ala Ala  
420 425 430

Ser Pro Ser Arg Gly Cys Arg Pro Glu Asp Pro Asn Tyr Glu Glu Thr  
435 440 445

Ile Lys Gln Leu Glu Ser Arg Leu Val Arg Gln Asp His Gln Ile Arg  
450 455 460

Glu Leu Thr Ala Lys Met Glu Thr Gln Ser Met Tyr Val Gly Glu Leu  
465 470 475 480

Lys Arg Thr Ile Arg Thr Leu Glu Asp Lys Val Ala Glu Met Glu Ala  
485 490 495

Gln Gln Cys Asn Gly Ile Tyr Ile Trp Lys Ile Gly Lys Phe Gly Met  
500 505 510

His Leu Lys Ser Gln Glu Glu Arg Pro Val Val Ile His Ser Pro  
515 520 525

Gly Phe Tyr Thr Gly Arg Pro Gly Tyr Lys Leu Cys Met Arg Leu His  
530 535 540

Leu Gln Leu Pro Thr Ala Gln Arg Cys Ala Asn Tyr Ile Ser Leu Phe  
545 550 555 560

ES 2 754 508 T3

Val His Thr Met Gln Gly Glu Tyr Asp Ser His Leu Pro Trp Pro Phe  
565 570 575

Gln Gly Thr Ile Arg Leu Thr Ile Leu Asp Gln Ser Glu Ala Leu Ile  
580 585 590

Arg Gln Asn His Glu Glu Val Met Asp Ala Lys Pro Glu Leu Leu Ala  
595 600 605

Phe Gln Arg Pro Thr Ile Pro Arg Asn Pro Lys Gly Phe Gly Tyr Val  
610 615 620

Thr Phe Met His Leu Glu Ala Leu Arg Gln Gly Thr Phe Ile Lys Asp  
625 630 635 640

Asp Thr Leu Leu Val Arg Cys Glu Val Ser Thr Arg Phe Asp Met Gly  
645 650 655

Gly Leu Arg Lys Glu Gly Phe Gln Pro Arg Ser Thr Asp Ala Gly Val  
660 665 670

<210> 13

<211> 326

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - TIFA

10

<400> 13

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu

ES 2 754 508 T3

100

105

110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Thr  
130 135 140

Ser Phe Glu Asp Ala Asp Thr Glu Glu Thr Val Thr Cys Leu Gln Met  
145 150 155 160

Thr Val Tyr His Pro Gly Gln Leu Gln Cys Gly Ile Phe Gln Ser Ile  
165 170 175

Ser Phe Asn Arg Glu Lys Leu Pro Ser Ser Glu Val Val Lys Phe Gly  
180 185 190

Arg Asn Ser Asn Ile Cys His Tyr Thr Phe Gln Asp Lys Gln Val Ser  
195 200 205

Arg Val Gln Phe Ser Leu Gln Leu Phe Lys Lys Phe Asn Ser Ser Val  
210 215 220

Leu Ser Phe Glu Ile Lys Asn Met Ser Lys Lys Thr Asn Leu Ile Val  
225 230 235 240

Asp Ser Arg Glu Leu Gly Tyr Leu Asn Lys Met Asp Leu Pro Tyr Arg  
245 250 255

Cys Met Val Arg Phe Gly Glu Tyr Gln Phe Leu Met Glu Lys Glu Asp  
260 265 270

Gly Glu Ser Leu Glu Phe Phe Glu Thr Gln Phe Ile Leu Ser Pro Arg  
275 280 285

Ser Leu Leu Gln Glu Asn Asn Trp Pro Pro His Arg Pro Ile Pro Glu  
290 295 300

Tyr Gly Thr Tyr Ser Leu Cys Ser Ser Gln Ser Ser Ser Pro Thr Glu  
305 310 315 320

Met Asp Glu Asn Glu Ser  
325

<210> 14

<211> 437

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - Cdk1

10 <400> 14

ES 2 754 508 T3

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Met Glu Asp Tyr  
130 135 140

Thr Lys Ile Glu Lys Ile Gly Glu Gly Thr Tyr Gly Val Val Tyr Lys  
145 150 155 160

Gly Arg His Lys Thr Thr Gly Gln Val Val Ala Met Lys Lys Ile Arg  
165 170 175

Leu Glu Ser Glu Glu Glu Gly Val Pro Ser Thr Ala Ile Arg Glu Ile  
180 185 190

Ser Leu Leu Lys Glu Leu Arg His Pro Asn Ile Val Ser Leu Gln Asp  
195 200 205

Val Leu Met Gln Asp Ser Arg Leu Tyr Leu Ile Phe Glu Phe Leu Ser  
210 215 220

Met Asp Leu Lys Lys Tyr Leu Asp Ser Ile Pro Pro Gly Gln Tyr Met

ES 2 754 508 T3

225

230

235

240

Asp Ser Ser Leu Val Lys Ser Tyr Leu Tyr Gln Ile Leu Gln Gly Ile  
245 250 255

Val Phe Cys His Ser Arg Arg Val Leu His Arg Asp Leu Lys Pro Gln  
260 265 270

Asn Leu Leu Ile Asp Asp Lys Gly Thr Ile Lys Leu Ala Asp Phe Gly  
275 280 285

Leu Ala Arg Ala Phe Gly Ile Pro Ile Arg Val Tyr Thr His Glu Val  
290 295 300

Val Thr Leu Trp Tyr Arg Ser Pro Glu Val Leu Leu Gly Ser Ala Arg  
305 310 315 320

Tyr Ser Thr Pro Val Asp Ile Trp Ser Ile Gly Thr Ile Phe Ala Glu  
325 330 335

Leu Ala Thr Lys Lys Pro Leu Phe His Gly Asp Ser Glu Ile Asp Gln  
340 345 350

Leu Phe Arg Ile Phe Arg Ala Leu Gly Thr Pro Asn Asn Glu Val Trp  
355 360 365

Pro Glu Val Glu Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Asn Thr Phe Pro Lys Trp  
370 375 380

Lys Pro Gly Ser Leu Ala Ser His Val Lys Asn Leu Asp Glu Asn Gly  
385 390 395 400

Leu Asp Leu Leu Ser Lys Met Leu Ile Tyr Asp Pro Ala Lys Arg Ile  
405 410 415

Ser Gly Lys Met Ala Leu Asn His Pro Tyr Phe Asn Asp Leu Asp Asn  
420 425 430

Gln Ile Lys Lys Met  
435

<210> 15

<211> 347

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - Mad2

10 <400> 15

ES 2 754 508 T3

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Ala  
130 135 140

Leu Gln Leu Ser Arg Glu Gln Gly Ile Thr Leu Arg Gly Ser Ala Glu  
145 150 155 160

Ile Val Ala Glu Phe Phe Ser Phe Gly Ile Asn Ser Ile Leu Tyr Gln  
165 170 175

Arg Gly Ile Tyr Pro Ser Glu Thr Phe Thr Arg Val Gln Lys Tyr Gly  
180 185 190

Leu Thr Leu Leu Val Thr Thr Asp Leu Glu Leu Ile Lys Tyr Leu Asn  
195 200 205

Asn Val Val Glu Gln Leu Lys Asp Trp Leu Tyr Lys Cys Ser Val Gln  
210 215 220

Lys Leu Val Val Val Ile Ser Asn Ile Glu Ser Gly Glu Val Leu Glu  
225 230 235 240

Arg Trp Gln Phe Asp Ile Glu Cys Asp Lys Thr Ala Lys Asp Asp Ser

# ES 2 754 508 T3

245

250

255

Ala Pro Arg Glu Lys Ser Gln Lys Ala Ile Gln Asp Glu Ile Arg Ser  
 260                            265                            270

Val Ile Arg Gln Ile Thr Ala Thr Val Thr Phe Leu Pro Leu Leu Glu  
 275                            280                            285

Val Ser Cys Ser Phe Asp Leu Leu Ile Tyr Thr Asp Lys Asp Leu Val  
 290                            295                            300

Val Pro Glu Lys Trp Glu Glu Ser Gly Pro Gln Phe Ile Thr Asn Ser  
 305                            310                            315                            320

Glu Glu Val Arg Leu Arg Ser Phe Thr Thr Ile His Lys Val Asn  
 325                            330                            335

Ser Met Val Ala Tyr Lys Ile Pro Val Asn Asp  
 340                            345

<210> 16

<211> 298

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - Ink4A

10

<400> 16

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
 1                            5                                    10                            15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
 20                            25                                    30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
 35                            40                                    45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
 50                            55                                    60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
 65                            70                                    75                            80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
 85                            90                                    95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
 100                            105                                    110

ES 2 754 508 T3

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Glu  
130 135 140

Pro Ala Ala Gly Ser Ser Met Glu Pro Ser Ala Asp Trp Leu Ala Thr  
145 150 155 160

Ala Ala Ala Arg Gly Arg Val Glu Glu Val Arg Ala Leu Leu Glu Ala  
165 170 175

Gly Ala Leu Pro Asn Ala Pro Asn Ser Tyr Gly Arg Arg Pro Ile Gln  
180 185 190

Val Met Met Met Gly Ser Ala Arg Val Ala Glu Leu Leu Leu His  
195 200 205

Gly Ala Glu Pro Asn Cys Ala Asp Pro Ala Thr Leu Thr Arg Pro Val  
210 215 220

His Asp Ala Ala Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr Leu Val Val Leu His  
225 230 235 240

Arg Ala Gly Ala Arg Leu Asp Val Arg Asp Ala Trp Gly Arg Leu Pro  
245 250 255

Val Asp Leu Ala Glu Glu Leu Gly His Arg Asp Val Ala Arg Tyr Leu  
260 265 270

Arg Ala Ala Ala Gly Gly Thr Arg Gly Ser Asn His Ala Arg Ile Asp  
275 280 285

Ala Ala Glu Gly Pro Ser Asp Ile Pro Asp  
290 295

<210> 17

<211> 280

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - Ink4B

10 <400> 17

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

ES 2 754 508 T3

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
 35                    40                    45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser	Met	Ala	His	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Ile	Gln	Arg	Met	Phe	Ser	Glu
65					70					75					80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro	Ser	Pro	Thr	Ser	Phe	Ser	Asp	Ser	Ile	Lys	Gln	Leu	Ala	Ala	Glut
100								105					110		

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
           115                   120                   125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Arg  
130 135 140

Glu Glu Asn Lys Gly Met Pro Ser Gly Gly Gly Ser Asp Glu Gly Leu  
145 150 155 160

Ala Ser Ala Ala Ala Arg Gly Leu Val Glu Lys Val Arg Gln Leu Leu  
165 170 175

Glu Ala Gly Ala Asp Pro Asn Gly Val Asn Arg Phe Gly Arg Arg Ala  
180 185 190

Ile Gln Val Met Met Met Gly Ser Ala Arg Val Ala Glu Leu Leu Leu  
195 200 205

Leu	His	Gly	Ala	Glu	Pro	Asn	Cys	Ala	Asp	Pro	Ala	Thr	Leu	Thr	Arg
210						215					220				

Pro	Val	His	Asp	Ala	Ala	Arg	Glu	Gly	Phe	Leu	Asp	Thr	Leu	Val	Val
225				230					235					240	

Leu His Arg Ala Gly Ala Arg Leu Asp Val Arg Asp Ala Trp Gly Arg  
245 250 255

Leu Pro Val Asp Leu Ala Glu Glu Arg Gly His Arg Asp Val Ala Gly  
260 265 270

275 280

<210> 18  
<211> 310

6

5 <210> 18

<211> 310

<212> PRI  
<212> S...

<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223>

<223>

ES 2 754 508 T3

<400> 18

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Ala  
130 135 140

Glu Pro Trp Gly Asn Glu Leu Ala Ser Ala Ala Ala Arg Gly Asp Leu  
145 150 155 160

Glu Gln Leu Thr Ser Leu Leu Gln Asn Asn Val Asn Val Asn Ala Gln  
165 170 175

Asn Gly Phe Gly Arg Thr Ala Leu Gln Val Met Lys Leu Gly Asn Pro  
180 185 190

ES 2 754 508 T3

Glu Ile Ala Arg Arg Leu Leu Leu Arg Gly Ala Asn Pro Asp Leu Lys  
195 200 205

Asp Arg Thr Gly Phe Ala Val Ile His Asp Ala Ala Arg Ala Gly Phe  
210 215 220

Leu Asp Thr Leu Gln Ala Leu Pro Glu Phe Gln Ala Asp Val Asn Ile  
225 230 235 240

Glu Asp Asn Glu Gly Asn Leu Pro Leu His Leu Ala Ala Lys Glu Gly  
245 250 255

His Leu Arg Val Val Glu Phe Leu Val Lys His Thr Ala Ser Asn Val  
260 265 270

Gly His Arg Asn His Lys Gly Asp Thr Ala Cys Asp Leu Ala Arg Leu  
275 280 285

Tyr Gly Arg Asn Glu Val Val Ser Leu Met Gln Ala Asn Gly Ala Gly  
290 295 300

Gly Ala Thr Asn Leu Gln  
305 310

<210> 19

<211> 329

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - z-Bid

10

<400> 19

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80



ES 2 754 508 T3

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Gly His  
130 135 140

Ser Pro Pro Ala Thr Tyr Arg Asp Leu Leu His Glu Leu Gln His Glu  
145 150 155 160

Val Gln Pro Gly Leu Ser Val Asn Ala Glu Glu Ala Arg Ala Ala Arg  
165 170 175

Glu Met Ala Ala Glu Leu Ile Arg Ile Ala Asp Leu Leu Glu Gln Ser  
180 185 190

Val Leu Ser Gln Ala Ala Glu Ser Leu Thr Lys Lys Leu Arg Ser Phe  
195 200 205

Gln Glu Gln Val Trp Ala Ser His Leu Ser Lys Gly Val Gln Thr Leu  
210 215 220

Leu Gln His Val Ala Ala Lys Glu Phe Lys Lys Glu Leu Val Glu  
225 230 235 240

Met Ala Phe Thr Phe Met Leu Met Lys Thr Val Cys Glu Arg Thr Pro  
245 250 255

Asp Phe Leu Phe Gly Leu Tyr Gly Thr Val Val Gln Phe Phe Gly Ser  
260 265 270

Asn

5 <210> 21  
<211> 318

ES 2 754 508 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> YopE1-138 - z-BIM

<400> 21  
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Ser

ES 2 754 508 T3

130

135

140

Asp Thr Ser Arg Glu Gln Thr Leu Ala Asn Gly Pro Ala Ser Gln Gly  
145 150 155 160

Ser Gly Glu Ser Thr Gly Gly Val Val Leu Pro Ala Gly His Phe  
165 170 175

Asp Phe Pro Gln Pro Gly Glu Gly Asp Pro Leu Arg Gly Gly Ile Ser  
180 185 190

Met Ser Asn Asn Gln Ser Arg Ser Pro Met Asn Arg Thr Phe Ser Arg  
195 200 205

Ser Ser Ser Gly Tyr Phe Ser Val Asp Ser Asp Ser Val Pro Gly Ser  
210 215 220

Pro Leu Met Pro Asn Ile Ser Glu Ala Gln Asp Gly Gln Asn Asp Glu  
225 230 235 240

Val Trp Leu Ser Glu His Ser His Gln His Leu Gln Met Ala Ala Pro  
245 250 255

Val Ala Ala Leu Pro Pro Glu Met Val Val Ala Arg Glu Leu Arg Arg  
260 265 270

Ile Gly Asp Glu Phe Asn Arg Leu Tyr Cys Glu Ala Gly Ala Gly Val  
275 280 285

Asn Gln Leu Arg Ala Pro Asn Glu His Ala Ile Val Leu Trp Met Asn  
290 295 300

Val Ile Ile Gly Arg Leu Val His Phe Phe Leu Arg Arg Arg  
305 310 315

<210> 22

<211> 289

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - Caspasa3 p17

10

<400> 22

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

ES 2 754 508 T3

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Ser Gly  
130 135 140

Ile Ser Leu Asp Asn Ser Tyr Lys Met Asp Tyr Pro Glu Met Gly Leu  
145 150 155 160

Cys Ile Ile Ile Asn Asn Lys Asn Phe His Lys Ser Thr Gly Met Thr  
165 170 175

Ser Arg Ser Gly Thr Asp Val Asp Ala Ala Asn Leu Arg Glu Thr Phe  
180 185 190

Arg Asn Leu Lys Tyr Glu Val Arg Asn Lys Asn Asp Leu Thr Arg Glu  
195 200 205

Glu Ile Val Glu Leu Met Arg Asp Val Ser Lys Glu Asp His Ser Lys  
210 215 220

Arg Ser Ser Phe Val Cys Val Leu Leu Ser His Gly Glu Glu Gly Ile  
225 230 235 240

Ile Phe Gly Thr Asn Gly Pro Val Asp Leu Lys Lys Ile Thr Asn Phe  
245 250 255

Phe Arg Gly Asp Arg Cys Arg Ser Leu Thr Gly Lys Pro Lys Leu Phe  
260 265 270

Ile Ile Gln Ala Cys Arg Gly Thr Glu Leu Asp Cys Gly Ile Glu Thr  
275 280 285

Asp

- 5 <210> 23  
<211> 242  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

ES 2 754 508 T3

<220>

<223> YopE1-138 - Caspasa3 p10 /12

<400> 23

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Gly Val Asp  
130 135 140

Asp Asp Met Ala Cys His Lys Ile Pro Val Glu Ala Asp Phe Leu Tyr  
145 150 155 160

Ala Tyr Ser Thr Ala Pro Gly Tyr Tyr Ser Trp Arg Asn Ser Lys Asp  
165 170 175

5

Gly Ser Trp Phe Ile Gln Ser Leu Cys Ala Met Leu Lys Gln Tyr Ala  
180 185 190

Asp Lys Leu Glu Phe Met His Ile Leu Thr Arg Val Asn Arg Lys Val  
195 200 205

Ala Thr Glu Phe Glu Ser Phe Asp Ala Thr Phe His Ala Lys  
210 215 220

Lys Gln Ile Pro Cys Ile Val Ser Met Leu Thr Lys Glu Leu Tyr Phe  
225 230 235 240

Tyr His

<210> 24

<211> 337

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 754 508 T3

<223> YopE1-138 - Bid humana

<400> 24

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Asp  
130 135 140

ES 2 754 508 T3

Cys Glu Val Asn Asn Gly Ser Ser Leu Arg Asp Glu Cys Ile Thr Asn  
145 150 155 160

Leu Leu Val Phe Gly Phe Leu Gln Ser Cys Ser Asp Asn Ser Phe Arg  
165 170 175

Arg Glu Leu Asp Ala Leu Gly His Glu Leu Pro Val Leu Ala Pro Gln  
180 185 190

Trp Glu Gly Tyr Asp Glu Leu Gln Thr Asp Gly Asn Arg Ser Ser His  
195 200 205

Ser Arg Leu Gly Arg Ile Glu Ala Asp Ser Glu Ser Gln Glu Asp Ile  
210 215 220

Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly Asp Ser Met Asp  
225 230 235 240

Arg Ser Ile Pro Pro Gly Leu Val Asn Gly Leu Ala Leu Gln Leu Arg  
245 250 255

Asn Thr Ser Arg Ser Glu Glu Asp Arg Asn Arg Asp Leu Ala Thr Ala  
260 265 270

Leu Glu Gln Leu Leu Gln Ala Tyr Pro Arg Asp Met Glu Lys Glu Lys  
275 280 285

Thr Met Leu Val Leu Ala Leu Leu Ala Lys Lys Val Ala Ser His  
290 295 300

Thr Pro Ser Leu Leu Arg Asp Val Phe His Thr Thr Val Asn Phe Ile  
305 310 315 320

Asn Gln Asn Leu Arg Thr Tyr Val Arg Ser Leu Ala Arg Asn Gly Met  
325 330 335

Asp

<210> 25

<211> 277

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - t-Bid humana

10 <400> 25

ES 2 754 508 T3

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Gly Asn  
130 135 140

Arg Ser Ser His Ser Arg Leu Gly Arg Ile Glu Ala Asp Ser Glu Ser  
145 150 155 160

Gln Glu Asp Ile Ile Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly  
165 170 175

Asp Ser Met Asp Arg Ser Ile Pro Pro Gly Leu Val Asn Gly Leu Ala  
180 185 190

Leu Gln Leu Arg Asn Thr Ser Arg Ser Glu Glu Asp Arg Asn Arg Asp  
195 200 205

Leu Ala Thr Ala Leu Glu Gln Leu Leu Gln Ala Tyr Pro Arg Asp Met  
210 215 220

Glu Lys Glu Lys Thr Met Leu Val Leu Ala Leu Leu Leu Ala Lys Lys  
225 230 235 240

Val Ala Ser His Thr Pro Ser Leu Leu Arg Asp Val Phe His Thr Thr  
245 250 255

Val Asn Phe Ile Asn Gln Asn Leu Arg Thr Tyr Val Arg Ser Leu Ala  
260 265 270

Arg Asn Gly Met Asp  
275

5 <210> 26  
<211> 327  
<212> PRT

ES 2 754 508 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - Rac1 Q61E

5

<400> 26

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1                   5                   10                   15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20                   25                   30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35                   40                   45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50                   55                   60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65                   70                   75                   80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85                   90                   95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100               105               110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115               120               125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Gln Ala Ile Lys  
130               135               140

Cys Val Val Val Gly Asp Gly Ala Val Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile  
145               150               155               160

Ser Tyr Thr Thr Asn Ala Phe Pro Gly Glu Tyr Ile Pro Thr Val Phe  
165               170               175

ES 2 754 508 T3

Asp Asn Tyr Ser Ala Asn Val Met Val Asp Gly Lys Pro Val Asn Leu  
180 185 190

Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Glu Glu Asp Tyr Asp Arg Leu Arg Pro  
195 200 205

Leu Ser Tyr Pro Gln Thr Asp Val Phe Leu Ile Cys Phe Ser Leu Val  
210 215 220

Ser Pro Ala Ser Phe Glu Asn Val Arg Ala Lys Trp Tyr Pro Glu Val  
225 230 235 240

Arg His His Cys Pro Asn Thr Pro Ile Ile Leu Val Gly Thr Lys Leu  
245 250 255

Asp Leu Arg Asp Asp Lys Asp Thr Ile Glu Lys Leu Lys Glu Lys Lys  
260 265 270

Leu Thr Pro Ile Thr Tyr Pro Gln Gly Leu Ala Met Ala Lys Glu Ile  
275 280 285

Gly Ala Val Lys Tyr Leu Glu Cys Ser Ala Leu Thr Gln Arg Gly Leu  
290 295 300

Lys Thr Val Phe Asp Glu Ala Ile Arg Ala Val Leu Cys Pro Pro Pro  
305 310 315 320

Val Lys Lys Arg Lys Arg Lys  
325

<210> 27

<211> 333

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - RhoA Q63L

10

<400> 27

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser

## ES 2 754 508 T3

50	55	60
Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu		
65	70	75
Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met		
85	90	95
Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu		
100	105	110
Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr		
115	120	125
Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Met Ala Ala Ile		
130	135	140
Arg Lys Lys Leu Val Ile Val Gly Asp Gly Ala Cys Gly Lys Thr Cys		
145	150	155
Leu Leu Ile Val Phe Ser Lys Asp Gln Phe Pro Glu Val Tyr Val Pro		
165	170	175
Thr Val Phe Glu Asn Tyr Val Ala Asp Ile Glu Val Asp Gly Lys Gln		
180	185	190
Val Glu Leu Ala Leu Trp Asp Thr Ala Gly Leu Glu Asp Tyr Asp Arg		
195	200	205
Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Asp Thr Asp Val Ile Leu Met Cys Phe		
210	215	220
Ser Ile Asp Ser Pro Asp Ser Leu Glu Asn Ile Pro Glu Lys Trp Thr		
225	230	235
Pro Glu Val Lys His Phe Cys Pro Asn Val Pro Ile Ile Leu Val Gly		
245	250	255
Asn Lys Lys Asp Leu Arg Asn Asp Glu His Thr Arg Arg Glu Leu Ala		
260	265	270
Lys Met Lys Gln Glu Pro Val Lys Pro Glu Glu Gly Arg Asp Met Ala		
275	280	285
Asn Arg Ile Gly Ala Phe Gly Tyr Met Glu Cys Ser Ala Lys Thr Lys		
290	295	300
Asp Gly Val Arg Glu Val Phe Glu Met Ala Thr Arg Ala Ala Leu Gln		
305	310	315
Ala Arg Arg Gly Lys Lys Ser Gly Cys Leu Val Leu		
325	330	

5 <210> 28  
 <211> 350  
 <212> PRT

ES 2 754 508 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - FADD

5

<400> 28

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Asp  
130 135 140

Pro Phe Leu Val Leu Leu His Ser Val Ser Ser Ser Leu Ser Ser Ser  
145 150 155 160

Glu Leu Thr Glu Leu Lys Phe Leu Cys Leu Gly Arg Val Gly Lys Arg  
165 170 175

Lys Leu Glu Arg Val Gln Ser Gly Leu Asp Leu Phe Ser Met Leu Leu

ES 2 754 508 T3

180

185

190

Glu Gln Asn Asp Leu Glu Pro Gly His Thr Glu Leu Leu Arg Glu Leu  
195 200 205

Leu Ala Ser Leu Arg Arg His Asp Leu Leu Arg Arg Val Asp Asp Phe  
210 215 220

Glu Ala Gly Ala Ala Ala Gly Ala Ala Pro Gly Glu Glu Asp Leu Cys  
225 230 235 240

Ala Ala Phe Asn Val Ile Cys Asp Asn Val Gly Lys Asp Trp Arg Arg  
245 250 255

Leu Ala Arg Gln Leu Lys Val Ser Asp Thr Lys Ile Asp Ser Ile Glu  
260 265 270

Asp Arg Tyr Pro Arg Asn Leu Thr Glu Arg Val Arg Glu Ser Leu Arg  
275 280 285

Ile Trp Lys Asn Thr Glu Lys Glu Asn Ala Thr Val Ala His Leu Val  
290 295 300

Gly Ala Leu Arg Ser Cys Gln Met Asn Leu Val Ala Asp Leu Val Gln  
305 310 315 320

Glu Val Gln Gln Ala Arg Asp Leu Gln Asn Arg Ser Gly Ala Met Ser  
325 330 335

Pro Met Ser Trp Asn Ser Asp Ala Ser Thr Ser Glu Ala Ser  
340 345 350

<210> 29

<211> 308

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - Bad

10

<400> 29

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

# ES 2 754 508 T3

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
 50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
 65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
 85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
 100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
 115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Met Phe Gln Ile  
 130 135 140

Pro Glu Phe Glu Pro Ser Glu Gln Glu Asp Ser Ser Ser Ala Glu Arg  
 145 150 155 160

Gly Leu Gly Pro Ser Pro Ala Gly Asp Gly Pro Ser Gly Ser Gly Lys  
 165 170 175

His His Arg Gln Ala Pro Gly Leu Leu Trp Asp Ala Ser His Gln Gln  
 180 185 190

Glu Gln Pro Thr Ser Ser His His Gly Gly Ala Gly Ala Val Glu  
 195 200 205

Ile Arg Ser Arg His Ser Ser Tyr Pro Ala Gly Thr Glu Asp Asp Glu  
 210 215 220

Gly Met Gly Glu Glu Pro Ser Pro Phe Arg Gly Arg Ser Arg Ser Ala  
 225 230 235 240

Pro Pro Asn Leu Trp Ala Ala Gln Arg Tyr Gly Arg Glu Leu Arg Arg  
 245 250 255

Met Ser Asp Glu Phe Val Asp Ser Phe Lys Lys Gly Leu Pro Arg Pro  
 260 265 270

Lys Ser Ala Gly Thr Ala Thr Gln Met Arg Gln Ser Ser Ser Trp Thr  
 275 280 285

Arg Val Phe Gln Ser Trp Trp Asp Arg Asn Leu Gly Arg Gly Ser Thr  
 290 295 300

Ala Pro Ser Gln  
 305

5 <210> 30  
 <211> 309  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 754 508 T3

<220>

<223> YopE1-138 - GPCR GNA12

5 <400> 30  
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Met Ser Gly Val  
130 135 140

Val Gly Pro Met Gln Glu Pro Gly Ala Leu Asp Val Gly Gly Leu Arg  
145 150 155 160

Ser Gln Arg Gln Lys Trp Phe Gln Cys Phe Asp Gly Ile Thr Ser Ile  
165 170 175

Leu Phe Met Val Ser Ser Ser Glu Tyr Asp Gln Val Leu Met Glu Asp  
180 185 190

ES 2 754 508 T3

Arg Arg Thr Asn Arg Leu Val Glu Ser Met Asn Ile Phe Glu Thr Ile  
195 200 205

Val Asn Asn Lys Leu Phe Phe Asn Val Ser Ile Ile Leu Phe Leu Asn  
210 215 220

Lys Met Asp Leu Leu Val Glu Lys Val Lys Thr Val Ser Ile Lys Lys  
225 230 235 240

His Phe Pro Asp Phe Arg Gly Asp Pro His Arg Leu Glu Asp Val Gln  
245 250 255

Arg Tyr Leu Val Gln Cys Phe Asp Arg Lys Arg Arg Asn Arg Ser Lys  
260 265 270

Pro Leu Phe His His Phe Thr Thr Ala Ile Asp Thr Glu Asn Val Arg  
275 280 285

Phe Val Phe His Ala Val Lys Asp Thr Ile Leu Gln Glu Asn Leu Lys  
290 295 300

Asp Ile Met Leu Gln  
305

<210> 31

<211> 259

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - nanocuerpo VhH4 que reconoce EGFP

10

<400> 31

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

ES 2 754 508 T3

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Asp  
130 135 140

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Gln Pro Gly Gly  
145 150 155 160

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Val Asn Arg Tyr  
165 170 175

Ser Met Arg Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val  
180 185 190

Ala Gly Met Ser Ser Ala Gly Asp Arg Ser Ser Tyr Glu Asp Ser Val  
195 200 205

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Arg Asn Thr Val Tyr  
210 215 220

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
225 230 235 240

Asn Val Asn Val Gly Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
245 250 255

Val Ser Ser

<210> 32

<211> 458

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - Slmb1-VhH4

10

<400> 32

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

ES 2 754 508 T3

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Lys Met  
130 135 140

Met Lys Met Glu Thr Asp Lys Ile Met Asp Glu Thr Asn Ser Asn Ala  
145 150 155 160

Gln Ala Phe Thr Thr Met Leu Tyr Asp Pro Val Arg Lys Lys Asp  
165 170 175

Ser Ser Pro Thr Tyr Gln Thr Glu Arg Glu Leu Cys Phe Gln Tyr Phe  
180 185 190

Thr Gln Trp Ser Glu Ser Gly Gln Val Asp Phe Val Glu His Leu Leu  
195 200 205

Ser Arg Met Cys His Tyr Gln His Gly Gln Ile Asn Ala Tyr Leu Lys  
210 215 220

Pro Met Leu Gln Arg Asp Phe Ile Thr Leu Leu Pro Ile Lys Gly Leu  
225 230 235 240

Asp His Ile Ala Glu Asn Ile Leu Ser Tyr Leu Asp Ala Glu Ser Leu  
245 250 255

Lys Ser Ser Glu Leu Val Cys Lys Glu Trp Leu Arg Val Ile Ser Glu  
260 265 270

ES 2 754 508 T3

Gly Met Leu Trp Lys Lys Leu Ile Glu Arg Lys Val Arg Thr Asp Ser  
275 280 285

Leu Trp Arg Gly Leu Ala Glu Arg Arg Asn Trp Met Gln Tyr Leu Phe  
290 295 300

Lys Pro Arg Pro Gly Gln Thr Gln Arg Pro His Ser Phe His Arg Glu  
305 310 315 320

Leu Phe Pro Lys Ile Met Asn Asp Ile Asp Ser Ile Glu Asn Asn Trp  
325 330 335

Arg Thr Gly Arg His Met Asp Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly  
340 345 350

Ala Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
355 360 365

Gly Phe Pro Val Asn Arg Tyr Ser Met Arg Trp Tyr Arg Gln Ala Pro  
370 375 380

Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val Ala Gly Met Ser Ser Ala Gly Asp Arg  
385 390 395 400

Ser Ser Tyr Glu Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
405 410 415

Asp Ala Arg Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu  
420 425 430

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Val Asn Val Gly Phe Glu Tyr Trp  
435 440 445

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
450 455

<210> 33

<211> 470

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - NLS-Slmb1-VhH4

10 <400> 33

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

ES 2 754 508 T3

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Pro Pro  
130 135 140

Lys Lys Lys Arg Lys Val Gln Phe Lys Met Met Lys Met Glu Thr Asp  
145 150 155 160

Lys Ile Met Asp Glu Thr Asn Ser Asn Ala Gln Ala Phe Thr Thr Thr  
165 170 175

Met Leu Tyr Asp Pro Val Arg Lys Lys Asp Ser Ser Pro Thr Tyr Gln  
180 185 190

Thr Glu Arg Glu Leu Cys Phe Gln Tyr Phe Thr Gln Trp Ser Glu Ser  
195 200 205

Gly Gln Val Asp Phe Val Glu His Leu Leu Ser Arg Met Cys His Tyr  
210 215 220

Gln His Gly Gln Ile Asn Ala Tyr Leu Lys Pro Met Leu Gln Arg Asp  
225 230 235 240

Phe Ile Thr Leu Leu Pro Ile Lys Gly Leu Asp His Ile Ala Glu Asn  
245 250 255

Ile Leu Ser Tyr Leu Asp Ala Glu Ser Leu Lys Ser Ser Glu Leu Val  
260 265 270

ES 2 754 508 T3

Cys Lys Glu Trp Leu Arg Val Ile Ser Glu Gly Met Leu Trp Lys Lys  
275 280 285

Leu Ile Glu Arg Lys Val Arg Thr Asp Ser Leu Trp Arg Gly Leu Ala  
290 295 300

Glu Arg Arg Asn Trp Met Gln Tyr Leu Phe Lys Pro Arg Pro Gly Gln  
305 310 315 320

Thr Gln Arg Pro His Ser Phe His Arg Glu Leu Phe Pro Lys Ile Met  
325 330 335

Asn Asp Ile Asp Ser Ile Glu Asn Asn Trp Arg Thr Gly Arg His Leu  
340 345 350

Glu Met Asp Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Gln  
355 360 365

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Pro Val  
370 375 380

Asn Arg Tyr Ser Met Arg Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg  
385 390 395 400

Glu Trp Val Ala Gly Met Ser Ser Ala Gly Asp Arg Ser Ser Tyr Glu  
405 410 415

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Arg Asn  
420 425 430

Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val  
435 440 445

Tyr Tyr Cys Asn Val Asn Val Gly Phe Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
450 455 460

Gln Val Thr Val Ser Ser  
465 470

<210> 34

<211> 466

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - Slmb1-VhH4-NLS

10 <400> 34

ES 2 754 508 T3

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Lys Met  
130 135 140

Met Lys Met Glu Thr Asp Lys Ile Met Asp Glu Thr Asn Ser Asn Ala  
145 150 155 160

Gln Ala Phe Thr Thr Met Leu Tyr Asp Pro Val Arg Lys Lys Asp  
165 170 175

Ser Ser Pro Thr Tyr Gln Thr Glu Arg Glu Leu Cys Phe Gln Tyr Phe  
180 185 190

Thr Gln Trp Ser Glu Ser Gly Gln Val Asp Phe Val Glu His Leu Leu  
195 200 205

Ser Arg Met Cys His Tyr Gln His Gly Gln Ile Asn Ala Tyr Leu Lys  
210 215 220

Pro Met Leu Gln Arg Asp Phe Ile Thr Leu Leu Pro Ile Lys Gly Leu  
225 230 235 240

Asp His Ile Ala Glu Asn Ile Leu Ser Tyr Leu Asp Ala Glu Ser Leu  
245 250 255

ES 2 754 508 T3

Lys Ser Ser Glu Leu Val Cys Lys Glu Trp Leu Arg Val Ile Ser Glu  
260 265 270

Gly Met Leu Trp Lys Lys Leu Ile Glu Arg Lys Val Arg Thr Asp Ser  
275 280 285

Leu Trp Arg Gly Leu Ala Glu Arg Arg Asn Trp Met Gln Tyr Leu Phe  
290 295 300

Lys Pro Arg Pro Gly Gln Thr Gln Arg Pro His Ser Phe His Arg Glu  
305 310 315 320

Leu Phe Pro Lys Ile Met Asn Asp Ile Asp Ser Ile Glu Asn Asn Trp  
325 330 335

Arg Thr Gly Arg His Met Asp Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly  
340 345 350

Ala Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser  
355 360 365

Gly Phe Pro Val Asn Arg Tyr Ser Met Arg Trp Tyr Arg Gln Ala Pro  
370 375 380

Gly Lys Glu Arg Glu Trp Val Ala Gly Met Ser Ser Ala Gly Asp Arg  
385 390 395 400

Ser Ser Tyr Glu Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
405 410 415

Asp Ala Arg Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu  
420 425 430

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Val Asn Val Gly Phe Glu Tyr Trp  
435 440 445

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Pro Pro Lys Lys Lys Arg  
450 455 460

Lys Val  
465

<210> 35  
<211> 246

5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> YopE1-138 - Dominio PH Akt

10 <400> 35

# ES 2 754 508 T3

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
 1                5                10                15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
 20                25                30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
 35                40                45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
 50                55                60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
 65                70                75                80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
 85                90                95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
 100                105                110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
 115                120                125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Ala Ile  
 130                135                140

Val Lys Glu Gly Trp Leu His Lys Arg Gly Glu Tyr Ile Lys Thr Trp  
 145                150                155                160

Arg Pro Arg Tyr Phe Leu Leu Lys Asn Asp Gly Thr Phe Ile Gly Tyr  
 165                170                175

Lys Glu Arg Pro Gln Asp Val Asp Gln Arg Glu Ala Pro Leu Asn Asn  
 180                185                190

Phe Ser Val Ala Gln Cys Gln Leu Met Lys Thr Glu Arg Pro Arg Pro  
 195                200                205

Asn Thr Phe Ile Ile Arg Cys Leu Gln Trp Thr Thr Val Ile Glu Arg  
 210                215                220

Thr Phe His Val Glu Thr Pro Glu Glu Arg Glu Glu Trp Thr Thr Ala  
 225                230                235                240

Ile Gln Thr Val Ala Asp  
 245

5    <210> 36  
 <211> 465  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10   <220>  
 <223> YopE1-138 - ET1  
 <400> 36

ES 2 754 508 T3

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Pro  
130 135 140

Arg Pro Lys Leu Lys Ser Asp Asp Glu Val Leu Glu Ala Ala Thr Val  
145 150 155 160

Val Leu Lys Arg Cys Gly Pro Ile Glu Phe Thr Leu Ser Gly Val Ala  
165 170 175

Lys Glu Val Gly Leu Ser Arg Ala Ala Leu Ile Gln Arg Phe Thr Asn  
180 185 190

ES 2 754 508 T3

Arg Asp Thr Leu Leu Val Arg Met Met Glu Arg Gly Val Glu Gln Val  
195 200 205

Arg His Tyr Leu Asn Ala Ile Pro Ile Gly Ala Gly Pro Gln Gly Leu  
210 215 220

Trp Glu Phe Leu Gln Val Leu Val Arg Ser Met Asn Thr Arg Asn Asp  
225 230 235 240

Phe Ser Val Asn Tyr Leu Ile Ser Trp Tyr Glu Leu Gln Val Pro Glu  
245 250 255

Leu Arg Thr Leu Ala Ile Gln Arg Asn Arg Ala Val Val Glu Gly Ile  
260 265 270

Arg Lys Arg Leu Pro Pro Gly Ala Pro Ala Ala Ala Glu Leu Leu Leu  
275 280 285

His Ser Val Ile Ala Gly Ala Thr Met Gln Trp Ala Val Asp Pro Asp  
290 295 300

Gly Glu Leu Ala Asp His Val Leu Ala Gln Ile Ala Ala Ile Leu Cys  
305 310 315 320

Leu Met Phe Pro Glu His Asp Asp Phe Gln Leu Leu Gln Ala His Ala  
325 330 335

Ser Ala Tyr Ser Arg Ala Arg Thr Lys Asn Asn Tyr Gly Ser Thr Ile  
340 345 350

Glu Gly Leu Leu Asp Leu Pro Asp Asp Asp Ala Pro Glu Glu Ala Gly  
355 360 365

Leu Ala Ala Pro Arg Leu Ser Phe Leu Pro Ala Gly His Thr Arg Arg  
370 375 380

Leu Ser Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His  
385 390 395 400

Leu Asp Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp  
405 410 415

Phe Asp Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe  
420 425 430

Thr Pro His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe  
435 440 445

Glu Phe Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly  
450 455 460

Gly  
465

5 <210> 37  
<211> 381  
<212> PRT

ES 2 754 508 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - EGFP

5

<400> 37

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1                   5                   10                   15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20                   25                   30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35                   40                   45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50                   55                   60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65                   70                   75                   80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85                   90                   95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100                105                110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115                120                125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Met Val  
130                135                140

Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu  
145                150                155                160

Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly  
165                170                175

ES 2 754 508 T3

Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr  
180 185 190

Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr  
195 200 205

Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His  
210 215 220

Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr  
225 230 235 240

Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys  
245 250 255

Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp  
260 265 270

Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr  
275 280 285

Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile  
290 295 300

Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln  
305 310 315 320

Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val  
325 330 335

Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys  
340 345 350

Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr  
355 360 365

Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys  
370 375 380

<210> 38

<211> 402

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - 2xTEVsitio - NLS - EGFP

10 <400> 38

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser

## ES 2 754 508 T3

1

5

10

15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
 20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
 35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
 50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
 65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
 85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
 100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
 115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Glu Asn  
 130 135 140

Leu Tyr Phe Gln Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Pro Pro Lys Lys  
 145 150 155 160

Lys Arg Lys Val Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val  
 165 170 175

Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser  
 180 185 190

Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu  
 195 200 205

Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu  
 210 215 220

Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp  
 225 230 235 240

His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr  
 245 250 255

ES 2 754 508 T3

Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr  
260 265 270

Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu  
275 280 285

Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys  
290 295 300

Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys  
305 310 315 320

Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu  
325 330 335

Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile  
340 345 350

Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln  
355 360 365

Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu  
370 375 380

Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu  
385 390 395 400

Tyr Lys

<210> 39

<211> 402

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - 2xTEVsitio - EGFP - NLS

10

<400> 39

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser

## ES 2 754 508 T3

50

55

60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
 65                   70                   75                   80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
 85                   90                   95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
 100               105               110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
 115               120               125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Glu Asn  
 130               135               140

Leu Tyr Phe Gln Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Val Ser Lys Gly  
 145               150               155               160

Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly  
 165               170               175

Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp  
 180               185               190

Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys  
 195               200               205

Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val  
 210               215               220

Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe  
 225               230               235               240

Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe  
 245               250               255

Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly  
 260               265               270

Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu  
 275               280               285

Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His  
 290               295               300

ES 2 754 508 T3

Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn  
305 310 315 320

Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp  
325 330 335

His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro  
340 345 350

Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn  
355 360 365

Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly  
370 375 380

Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys Pro Pro Lys Lys Lys Arg  
385 390 395 400

Lys Val

<210> 40

<211> 324

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - 2x TEVsitio - INK4C

10

<400> 40

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu

# ES 2 754 508 T3

100

105

110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
 115                    120                    125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Glu Asn  
 130                    135                    140

Leu Tyr Phe Gln Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Met Ala Glu Pro  
 145                    150                    155                    160

Trp Gly Asn Glu Leu Ala Ser Ala Ala Arg Gly Asp Leu Glu Gln  
 165                    170                    175

Leu Thr Ser Leu Leu Gln Asn Asn Val Asn Val Asn Ala Gln Asn Gly  
 180                    185                    190

Phe Gly Arg Thr Ala Leu Gln Val Met Lys Leu Gly Asn Pro Glu Ile  
 195                    200                    205

Ala Arg Arg Leu Leu Leu Arg Gly Ala Asn Pro Asp Leu Lys Asp Arg  
 210                    215                    220

Thr Gly Phe Ala Val Ile His Asp Ala Ala Arg Ala Gly Phe Leu Asp  
 225                    230                    235                    240

Thr Leu Gln Ala Leu Pro Glu Phe Gln Ala Asp Val Asn Ile Glu Asp  
 245                    250                    255

Asn Glu Gly Asn Leu Pro Leu His Leu Ala Ala Lys Glu Gly His Leu  
 260                    265                    270

Arg Val Val Glu Phe Leu Val Lys His Thr Ala Ser Asn Val Gly His  
 275                    280                    285

Arg Asn His Lys Gly Asp Thr Ala Cys Asp Leu Ala Arg Leu Tyr Gly  
 290                    295                    300

Arg Asn Glu Val Val Ser Leu Met Gln Ala Asn Gly Ala Gly Gly Ala  
 305                    310                    315                    320

Thr Asn Leu Gln

<210> 41

<211> 479

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - 2x TEVsitio - ET1

10 <400> 41

ES 2 754 508 T3

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Glu Asn  
130 135 140

Leu Tyr Phe Gln Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Met Pro Arg Pro  
145 150 155 160

Lys Leu Lys Ser Asp Asp Glu Val Leu Glu Ala Ala Thr Val Val Leu  
165 170 175

Lys Arg Cys Gly Pro Ile Glu Phe Thr Leu Ser Gly Val Ala Lys Glu  
180 185 190

Val Gly Leu Ser Arg Ala Ala Leu Ile Gln Arg Phe Thr Asn Arg Asp  
195 200 205

Thr Leu Leu Val Arg Met Met Glu Arg Gly Val Glu Gln Val Arg His  
210 215 220

Tyr Leu Asn Ala Ile Pro Ile Gly Ala Gly Pro Gln Gly Leu Trp Glu

# ES 2 754 508 T3

225	230	235	240
Phe Leu Gln Val Leu Val Arg Ser Met Asn Thr Arg Asn Asp Phe Ser			
245		250	255
Val Asn Tyr Leu Ile Ser Trp Tyr Glu Leu Gln Val Pro Glu Leu Arg			
260		265	270
Thr Leu Ala Ile Gln Arg Asn Arg Ala Val Val Glu Gly Ile Arg Lys			
275		280	285
Arg Leu Pro Pro Gly Ala Pro Ala Ala Ala Glu Leu Leu Leu His Ser			
290		295	300
Val Ile Ala Gly Ala Thr Met Gln Trp Ala Val Asp Pro Asp Gly Glu			
305		310	315
Leu Ala Asp His Val Leu Ala Gln Ile Ala Ala Ile Leu Cys Leu Met			
325		330	335
Phe Pro Glu His Asp Asp Phe Gln Leu Leu Gln Ala His Ala Ser Ala			
340		345	350
Tyr Ser Arg Ala Arg Thr Lys Asn Asn Tyr Gly Ser Thr Ile Glu Gly			
355		360	365
Leu Leu Asp Leu Pro Asp Asp Ala Pro Glu Glu Ala Gly Leu Ala			
370		375	380
Ala Pro Arg Leu Ser Phe Leu Pro Ala Gly His Thr Arg Arg Leu Ser			
385		390	395
Thr Ala Pro Pro Thr Asp Val Ser Leu Gly Asp Glu Leu His Leu Asp			
405		410	415
Gly Glu Asp Val Ala Met Ala His Ala Asp Ala Leu Asp Asp Phe Asp			
420		425	430
Leu Asp Met Leu Gly Asp Gly Asp Ser Pro Gly Pro Gly Phe Thr Pro			
435		440	445
His Asp Ser Ala Pro Tyr Gly Ala Leu Asp Met Ala Asp Phe Glu Phe			
450		455	460
Glu Gln Met Phe Thr Asp Ala Leu Gly Ile Asp Glu Tyr Gly Gly			
465		470	475
<210> 42			
<211> 380			
5	<212> PRT		
	<213> Secuencia artificial		
<220>			
<223> YopE1-138 - TEV proteasa S219V			
10	<400> 42		

ES 2 754 508 T3

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Glu Ser Leu Phe  
130 135 140

Lys Gly Pro Arg Asp Tyr Asn Pro Ile Ser Ser Thr Ile Cys His Leu  
145 150 155 160

Thr Asn Glu Ser Asp Gly His Thr Thr Ser Leu Tyr Gly Ile Gly Phe  
165 170 175

Gly Pro Phe Ile Ile Thr Asn Lys His Leu Phe Arg Arg Asn Asn Gly  
180 185 190

Thr Leu Leu Val Gln Ser Leu His Gly Val Phe Lys Val Lys Asn Thr  
195 200 205

Thr Thr Leu Gln Gln His Leu Ile Asp Gly Arg Asp Met Ile Ile Ile

ES 2 754 508 T3

210

215

220

Arg Met Pro Lys Asp Phe Pro Pro Phe Pro Gln Lys Leu Lys Phe Arg  
225 230 235 240

Glu Pro Gln Arg Glu Glu Arg Ile Cys Leu Val Thr Thr Asn Phe Gln  
245 250 255

Thr Lys Ser Met Ser Ser Met Val Ser Asp Thr Ser Cys Thr Phe Pro  
260 265 270

Ser Ser Asp Gly Ile Phe Trp Lys His Trp Ile Gln Thr Lys Asp Gly  
275 280 285

Gln Cys Gly Ser Pro Leu Val Ser Thr Arg Asp Gly Phe Ile Val Gly  
290 295 300

Ile	His	Ser	Ala	Ser	Asn	Phe	Thr	Asn	Thr	Asn	Asn	Tyr	Phe	Thr	Ser
305				310					315					320	

Val Pro Lys Asn Phe Met Glu Leu Leu Thr Asn Gln Glu Ala Gln Gln  
325 330 335

Trp Val Ser Gly Trp Arg Leu Asn Ala Asp Ser Val Leu Trp Gly Gly  
                  340                   345                   350

His Lys Val Phe Met Val Lys Pro Glu Glu Pro Phe Gln Pro Val Lys  
355 360 365

Glu	Ala	Thr	Gln	Leu	Met	Asn	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg	Arg
370						375						380

<210> 43

<211> 332

5 <212> PRT

### <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Yop

10

<400> 43

Val Ser G

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

ES 2 754 508 T3

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
 50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
 65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
 85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
 100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
 115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Glu Asn  
 130 135 140

Leu Tyr Phe Gln Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Asp Tyr Lys Asp  
 145 150 155 160

Asp Asp Asp Lys Met Ala Glu Pro Trp Gly Asn Glu Leu Ala Ser Ala  
 165 170 175

Ala Ala Arg Gly Asp Leu Glu Gln Leu Thr Ser Leu Leu Gln Asn Asn  
 180 185 190

Val Asn Val Asn Ala Gln Asn Gly Phe Gly Arg Thr Ala Leu Gln Val  
 195 200 205

Met Lys Leu Gly Asn Pro Glu Ile Ala Arg Arg Leu Leu Leu Arg Gly  
 210 215 220

Ala Asn Pro Asp Leu Lys Asp Arg Thr Gly Phe Ala Val Ile His Asp  
 225 230 235 240

Ala Ala Arg Ala Gly Phe Leu Asp Thr Leu Gln Ala Leu Pro Glu Phe  
 245 250 255

Gln Ala Asp Val Asn Ile Glu Asp Asn Glu Gly Asn Leu Pro Leu His  
 260 265 270

Leu Ala Ala Lys Glu Gly His Leu Arg Val Val Glu Phe Leu Val Lys  
 275 280 285

His Thr Ala Ser Asn Val Gly His Arg Asn His Lys Gly Asp Thr Ala  
 290 295 300

Cys Asp Leu Ala Arg Leu Tyr Gly Arg Asn Glu Val Val Ser Leu Met  
 305 310 315 320

Gln Ala Asn Gly Ala Gly Gly Ala Thr Asn Leu Gln  
 325 330

<211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_285  
 <400> 44  
 cataccatgg gagtgagcaa gggcgag 27  
 10 <210> 45  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_286  
 <400> 45  
 20 ggaagatctt tacttgtaca gctcgccat 30  
 <210> 46  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_287  
 30 <400> 46  
 cgggtacct caactaaatg accgtggtg 29  
 <210> 47  
 <211> 43  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_288  
 40 <400> 47  
 gttaaagctt ttcaaatcta gactcgacg tggcgaactg gtc 43  
 <210> 48  
 45 <211> 35  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> Cebador No.: Si\_292  
 <400> 48  
 cagtctcgag caaattctaa acaaaatact tccac 35  
 55 <210> 49  
 <211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_293  
 <400> 49  
 cagttcgaa ttaatttcta ttgcgttgac gg 32  
 65 <210> 50

<211> 34  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_296

<400> 50  
cagtctcgag actaacataa cactatccac ccag 34

10 <210> 51  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_297

<400> 51  
gttaaagctt tcaggaggca ttctgaag 28

20 <210> 52  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_299

25 <400> 52  
cagtctcgag caggccatca agtgttg 28

<210> 53  
<211> 33

30 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_300

35 <400> 53  
cagtttcgaa tcattttctc ttcctttctc tca 33

<210> 54  
<211> 24

40 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_301

<400> 54  
cagtctcgag gctgccatcc ggaa 24

45 <210> 55  
<211> 28

50 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_302

<400> 55  
cagtttcgaa tcacaagaca aggcaccc 28

55 <210> 56

<211> 34  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_306

<400> 56  
gttaaagctt ggaggcattc tgaagatact tatt 34

10 <210> 57  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_307

<400> 57  
cagtctcgag caaatacaga gcttctatca ctcag 35

20 <210> 58  
<211> 35  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_308

25 <400> 58  
gttaaagctt tcaagatgtg attaatgaag aaatg 35

<210> 59  
<211> 29

30 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_317

35 <400> 59  
cagtttcgaa cccataaaaa agccctgtc 29

<210> 60  
<211> 37

40 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_318

<400> 60  
gttaaagctt ctactctatc atcaaacgtt aaaaatgg 37

45 <210> 61  
<211> 29

50 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_318

<400> 60  
gttaaagctt ctactctatc atcaaacgtt aaaaatgg 37

55 <210> 61  
<211> 29

60 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_324

<400> 61  
cagtctcgag ttcaactcaag aaacgcgg 29

65 <210> 62

<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_339

<400> 62  
cagttcgaa ttttctcttc ctcttctca cg 32

10 <210> 63  
<211> 32  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_341

<400> 63  
cgtatctaga aaaaatgatga aaatggagac tg 32

20 <210> 64  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_342

25 <400> 64  
gttaaaggctt ttagctggag acggtgac 28

<210> 65  
<211> 29

30 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_346

35 <400> 65  
cagtctcgag ttccagatcc cagagttt 29

<210> 66

40 <211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_347

<400> 66  
gttaaaggctt tcactggag gggg 24

45 <210> 67  
<211> 45  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

50 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_351

<400> 67  
cagtctcgag ctcgagttat ctactcatag aaactacttt tgtag 45

55 <210> 68

<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_352

<400> 68  
cgccgatcct cagtgtctct gcggcatta 29

10 <210> 69  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_353

<400> 69  
catttattcc tccttagttac tcacagcaac tgctgctcct ttc 43

20 <210> 70  
<211> 43  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_354

30 <400> 70  
gaaaggagca gcagttgctg tgactaacta ggaggaataa atg 43

<210> 71  
<211> 41

35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_355

40 <400> 71  
cgattcacgg attgctttct cattattcccc tccaggtact a 41

<210> 72  
<211> 41

45 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_356

<400> 72  
tagtacctgg aggaaataat gagaaagcaa tccgtgaatc g 41

55 <210> 73  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

60 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_357

<400> 73  
cgatatctaga cggcttaag tgcgacattc 30

65 <210> 74

<211> 36  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_364  
 <400> 74  
 cgtatctaga ctaaagtatg aggagagaaa attgaa 36  
 10 <210> 75  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_365  
 <400> 75  
 20 gttaaagctt tcagcttgcc gtcgt 25  
 <210> 76  
 <211> 26  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_367  
 30 <400> 76  
 cgtatctaga gacccgttcc tggtgc 26  
 <210> 77  
 <211> 26  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_369  
 40 <400> 77  
 cgtatctaga ccccccaaga agaagc 26  
 <210> 78  
 45 <211> 26  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> Cebador No.: Si\_373  
 <400> 78  
 gttaaagctt gctggagacg gtgacc 26  
 55 <210> 79  
 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_386  
 <400> 79  
 cgtatctaga tcaggacgct tcggaggtag 30  
 65 <210> 80

<211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_387  
 <400> 80  
 cgtatctaga atggactgtg aggtcaacaa 30  
 10 <210> 81  
 <211> 23  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_389  
 <400> 81  
 20 cgtatctaga ggcaaccgca gca 23  
 <210> 82  
 <211> 29  
 <212> ADN  
 25 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_391  
 30 <400> 82  
 gttaaagctt tcagtccatc ccattctg 29  
 <210> 83  
 <211> 29  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_403  
 40 <400> 83  
 cgtatctaga tctggaatat ccctggaca 29  
 <210> 84  
 45 <211> 30  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> Cebador No.: Si\_406  
 <400> 84  
 gttaaagctt gtctgtctca atgccacagt 30  
 55 <210> 85  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_410  
 <400> 85  
 65 cagtctcgag atgtccgggg tggtg 25  
 <210> 86

<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_413

<400> 86  
cagttcgaa tcaactgcagc atgatgtc 28

10 <210> 87  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_417

<400> 87  
cagtctcgag agtgggttg atgatgacat g 31

20 <210> 88  
<211> 40  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_420

25 <400> 88  
cagttcgaa tttagtataa aaatagagtt ctttgtgag 40

<210> 89  
<211> 33

30 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_423

35 <400> 89  
cagtctcgag atgcacataa ctaattggg att 33

<210> 90  
<211> 34

40 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_424

<400> 90  
cagttcgaa ttataccaaat gacgaatacc cttt 34

45 <210> 91  
<211> 52

50 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_425

<400> 91  
gttaaagctt ttacaccctt cgcttcttct tgggcgggct ggagacggtg ac 52

55 <210> 92

<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_428

<400> 92  
cgtatctaga atggacttca acaggaacctt t 31

10 <210> 93  
<211> 28  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_429

<400> 93  
cgtatctaga ggacatagtc caccagcg 28

20 <210> 94  
<211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_430

25 <400> 94  
gttaaagctt tcagttggat ccgaaaaac 29

<210> 95  
<211> 34

30 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_433

35 <400> 95  
cgtatctaga gaattaaaaaa aaacactcat ccc 34

<210> 96  
<211> 29

40 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_434

<400> 96  
cgtatctaga ccaaaggcaa aagcaaaaa 29

45 <210> 97  
<211> 29

50 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_435

<400> 97  
gttaaagctt ttagctagcc atggcaagc 29

55 <210> 98

<211> 22  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_436

<400> 98  
cgtatctaga atgccccgcc cc 22

10 <210> 99  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_437

<400> 99  
gttaaagctt ctacccaccc tactcgtaa t 31

20 <210> 100  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_438

25 <400> 100  
cgtatctaga atgtctgaca cgtccagaga g 31

<210> 101  
<211> 32

30 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_439

35 <400> 101  
gttaaagctt tcattttttt cgccggaaaa ag 32

<210> 102  
<211> 30

40 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_445

<400> 102  
cgccggatcct tatgggtct cacagcaaaa 30

45 <210> 103  
<211> 43

50 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_446

<400> 103  
catttattcc tccttagttag tcaaggcaac agccaatcaa gag 43

55 <210> 104

<211> 43  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_447

<400> 104  
ctcttgattg gctgtgcct tgactaacta ggaggaataa atg 43

10 <210> 105  
<211> 41  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_448

<400> 105  
ttgattgcag tgacatggtg cattattccc tccaggtact a 41

20 <210> 106  
<211> 41  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_449

25 <400> 106  
tagtacctgg aggaaataat gcaccatgtc actgcaatca a 41

<210> 107  
<211> 30

30 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_450

35 <400> 107  
cgatatctaga tagccgcaga tgggtatg 30

<210> 108  
<211> 29

40 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_451

<400> 108  
cgatatctaga gatcaagtcc aactgggtgg 29

45 <210> 109  
<211> 29

50 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_452

<400> 109  
cagtctcgag gaaaagcttgtttaaggggc 29

55 <210> 110

60 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_463

<400> 109  
cagtctcgag gaaaagcttgtttaaggggc 29

65 <210> 110

<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_464

<400> 110  
cagttcgaa ttagcgacgg cgacg 25

10 <210> 111  
<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_476

<400> 111  
gttaaagctt ttacttgtac agctcgcca t 31

20 <210> 112  
<211> 25  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_477

25 <400> 112  
cgtatctaga gtgagcaagg gcgag 25

<210> 113  
<211> 37

30 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_478

35 <400> 113  
cagtctcgag atggaagatt atacaaaaat agagaaa 37

<210> 114  
<211> 36

40 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_479

<400> 114  
gttaaagctt ctacatcttc ttaatctgat tgtcca 36

45 <210> 115  
<211> 24

50 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_482

<400> 115  
cgtatctaga atggcgctgc agct 24

55 <210> 116

<211> 32  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 5 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_483  
 <400> 116  
 gttaaagctt tcagtcattg acaggaattt tg 32  
 10 <210> 117  
 <211> 25  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_486  
 <400> 117  
 cgtatctaga atggagccgg cgccg 25  
 20 <210> 118  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 25 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_487  
 30 <400> 118  
 gttaaagctt tcaatcgaaa atgtctg 27  
 <210> 119  
 <211> 30  
 35 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_492  
 40 <400> 119  
 cgtatctaga atgcgcgagg agaacaagg 30  
 <210> 120  
 <211> 30  
 45 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 50 <223> Cebador No.: Si\_493  
 <400> 120  
 gttaaagctt tcagtcctt gtggctgtgc 30  
 55 <210> 121  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 60 <220>  
 <223> Cebador No.: Si\_494  
 <400> 121  
 cgtatctaga atggccgagc ctgg 24  
 65 <210> 122

<211> 31  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_495

<400> 122  
gttaaagctt ttatgaaga ttgtggctc c 31

10 <210> 123  
<211> 64  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_504

<400> 123  
cgtatctaga gaaaatctgt attttcaaag tgaaaatctg tattttcaaa gtatgccccg 60

20 cccc 64

<210> 124  
<211> 30  
<212> ADN

25 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_505

30 <400> 124  
gttaaagctt ccaccgtac tcgtcaattc 30

<210> 125  
<211> 66

35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_508

40 <400> 125  
cgtatctaga gaaaatctgt attttcaaag tgaaaatctg tattttcaaa gtatggccga 60

gccttg 66

<210> 126

45 <211> 29  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Cebador No.: Si\_509

<400> 126  
gttaaagctt ttgaagattt gtggctccc 29

55 <210> 127  
<211> 67  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

60 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_511

	<400> 127		
	cgtatctaga gaaaatctgt attttcaaag tgaaaatctg tattttcaaa gtgtgagcaa		60
	gggcgag		67
	<210> 128		
5	<211> 91		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
10	<223> Cebador No.: Si_512		
	<400> 128		
	cgtatctaga gaaaatctgt attttcaaag tgaaaatctg tattttcaaa gtccgcccga		60
	aaaaaaacgt aaagttgtga gcaagggcga g		91
15	<210> 129		
	<211> 55		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
20	<220>		
	<223> Cebador No.: Si_513		
	<400> 129		
	gttaaagctt ttAAACTTtA cgTTTTTT tcggccgctt gtacagctcg tccat 55		
25	<210> 130		
	<211> 90		
	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
30	<220>		
	<223> Cebador No.: Si_515		
	<400> 130		
	cgtatctaga gaaaatctgt attttcaaag tgaaaatctg tattttcaaa gtgattataa		60
35	agatgatgat gataaaatgg ccgagccttg		90
	<210> 131		
	<211> 30		
	<212> ADN		
40	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador No.: Si_558		
45	<400> 131		
	cgtatctaga atgaccagt ttaagatgc 30		
	<210> 132		
	<211> 31		
50	<212> ADN		
	<213> Secuencia artificial		
	<220>		
	<223> Cebador No.: Si_559		
55	<400> 132		
	gttaaagctt tcatgactca tttcatcca t 31		
	<210> 133		
60	<211> 36		

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_561

<400> 133  
cgtatctaga atgagtctct taaactgtga gaacag 36

10 <210> 134  
<211> 26  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_562

<400> 134  
gttaaagctt ctacacccccc gcatca 26

20 <210> 135  
<211> 405  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

25 <220>  
<223> YopE1-138 - SopE - MycHis

<400> 135  
**Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser**  
1               5               10               15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20               25               30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35               40               45

ES 2 754 508 T3

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Val Thr Asn Ile  
130 135 140

Thr Leu Ser Thr Gln His Tyr Arg Ile His Arg Ser Asp Val Glu Pro  
145 150 155 160

Val Lys Glu Lys Thr Thr Glu Lys Asp Ile Phe Ala Lys Ser Ile Thr  
165 170 175

Ala Val Arg Asn Ser Phe Ile Ser Leu Ser Thr Ser Leu Ser Asp Arg  
180 185 190

Phe Ser Leu His Gln Gln Thr Asp Ile Pro Thr Thr His Phe His Arg  
195 200 205

Gly Asn Ala Ser Glu Gly Arg Ala Val Leu Thr Ser Lys Thr Val Lys  
210 215 220

Asp Phe Met Leu Gln Lys Leu Asn Ser Leu Asp Ile Lys Gly Asn Ala  
225 230 235 240

Ser Lys Asp Pro Ala Tyr Ala Arg Gln Thr Cys Glu Ala Ile Leu Ser  
245 250 255

Ala Val Tyr Ser Asn Asn Lys Asp Gln Cys Cys Lys Leu Leu Ile Ser  
260 265 270

Lys Gly Val Ser Ile Thr Pro Phe Leu Lys Glu Ile Gly Glu Ala Ala  
275 280 285

Gln Asn Ala Gly Leu Pro Gly Glu Ile Lys Asn Gly Val Phe Thr Pro  
290 295 300

ES 2 754 508 T3

Gly Gly Ala Gly Ala Asn Pro Phe Val Val Pro Leu Ile Ala Ser Ala  
305 310 315 320

Ser Ile Lys Tyr Pro His Met Phe Ile Asn His Asn Gln Gln Val Ser  
325 330 335

Phe Lys Ala Tyr Ala Glu Lys Ile Val Met Lys Glu Val Thr Pro Leu  
340 345 350

Phe Asn Lys Gly Thr Met Pro Thr Pro Gln Gln Phe Gln Leu Thr Ile  
355 360 365

Glu Asn Ile Ala Asn Lys Tyr Leu Gln Asn Ala Ser Lys Leu Gly Pro  
370 375 380

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His  
385 390 395 400

His His His His His  
405

<210> 136

<211> 435

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - BepG 715-end

10

<400> 136  
Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

ES 2 754 508 T3

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Phe Thr Gln Glu  
130 135 140

Thr Gln Lys Met Leu Ile Glu Lys Glu Ile Ile Pro Pro Leu Ser Tyr  
145 150 155 160

Val Asp Val Ala Ser Lys Ile Arg Glu Ser Glu Val Val Lys Ser Ser  
165 170 175

Met Gln Lys Ile Lys Thr Leu Cys Gly Val Val Tyr Gly Asn Pro Asp  
180 185 190

Ile Leu Glu Gly Lys Met Pro Lys Met Gly Ile Pro Val Thr Asn Lys  
195 200 205

Asn Val Glu Glu Leu Glu Lys Phe Ala Arg Gln Val Gly Asn Phe Pro  
210 215 220

Ser Ser Cys Gly Lys Ile Val Gly Phe Ser Phe Leu Gly Ile Lys Ser  
225 230 235 240

Glu Ala Arg Ala His Ala Glu Glu Asn Phe Leu Pro Leu Ser His Ala  
245 250 255

Ile Phe Ser Tyr Ala His Asn Val Lys Gln Ala Glu Lys Asp Ile Leu  
260 265 270

Glu Ala Tyr Phe Lys Glu Gln Glu Arg Cys Ala Gln Ser Val Glu Thr  
275 280 285

Pro Ser Glu Glu Ile Thr Asn Leu Leu Ser Phe Thr Gln Glu Gln Gln  
290 295 300

Lys Glu Ile Leu Ser Asn Ser Pro Lys Leu Arg Thr Gln Val Lys Ala  
305 310 315 320

Tyr Ser Gln Lys Leu His Asn Arg Leu Ser Pro Asn Asp Leu Gln Ala  
325 330 335

Ile Ser Glu Arg Ser His Thr Lys Leu Ala Glu Ser Leu Gly Thr Ser  
340 345 350

ES 2 754 508 T3

Val Asn Gln Ala Glu Lys Ile Ala Gln Ile Leu Thr Gln Thr Lys Asp  
355 360 365

Val Val Gln Ile Leu Gln Gln Glu Lys Leu Gly Leu Tyr Gln Ser  
370 375 380

Ile Met Lys Gly Asp Gly Arg Glu Thr Ala Lys Val Asn Met Ser Ala  
385 390 395 400

Ile Lys Ala Thr Gln Met Thr Thr Lys Val Thr Ser Leu Lys Ala Val  
405 410 415

Glu Gln Ile Val Arg Pro Pro Lys Val Glu Thr Ala Lys Val Val Ser  
420 425 430

Met Ser Arg  
435

<210> 137

<211> 354

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - Rac1 Q61E - MycHis

10

<400> 137

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

ES 2 754 508 T3

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Gln Ala Ile Lys  
130 135 140

Cys Val Val Val Gly Asp Gly Ala Val Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile  
145 150 155 160

Ser Tyr Thr Thr Asn Ala Phe Pro Gly Glu Tyr Ile Pro Thr Val Phe  
165 170 175

Asp Asn Tyr Ser Ala Asn Val Met Val Asp Gly Lys Pro Val Asn Leu  
180 185 190

Gly Leu Trp Asp Thr Ala Gly Glu Glu Asp Tyr Asp Arg Leu Arg Pro  
195 200 205

Leu Ser Tyr Pro Gln Thr Asp Val Phe Leu Ile Cys Phe Ser Leu Val  
210 215 220

Ser Pro Ala Ser Phe Glu Asn Val Arg Ala Lys Trp Tyr Pro Glu Val  
225 230 235 240

Arg His His Cys Pro Asn Thr Pro Ile Ile Leu Val Gly Thr Lys Leu  
245 250 255

Asp Leu Arg Asp Asp Lys Asp Thr Ile Glu Lys Leu Lys Glu Lys Lys  
260 265 270

Leu Thr Pro Ile Thr Tyr Pro Gln Gly Leu Ala Met Ala Lys Glu Ile  
275 280 285

Gly Ala Val Lys Tyr Leu Glu Cys Ser Ala Leu Thr Gln Arg Gly Leu  
290 295 300

Lys Thr Val Phe Asp Glu Ala Ile Arg Ala Val Leu Cys Pro Pro Pro  
305 310 315 320

Val Lys Lys Arg Lys Arg Lys Phe Glu Lys Leu Gly Pro Glu Gln Lys  
325 330 335

Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His  
340 345 350

His His

<210> 138  
<211> 163  
5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> YopE1-138 - Parte de Y. enterocolitica con codones optimizados para BID BH3 murina  
10 <400> 138

ES 2 754 508 T3

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Phe Glu  
130 135 140

Glu Ile Ile His Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Ile Gly Asp Glu  
145 150 155 160

Met Asp His

<210> 139

<211> 156

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - Parte de Y. enterocolitica con codones optimizados para Bax BH3 murina

10 <400> 139

ES 2 754 508 T3

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
 1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
 20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
 35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
 50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
 65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
 85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
 100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
 115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Lys Lys Leu Ser  
 130 135 140

Glu Cys Leu Arg Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp Ser  
 145 150 155

<210> 140

<211> 20

5 <212> PRT

<213> Salmonella entérica

<220>

<223> SteA1-20

10

<400> 140

Met Pro Tyr Thr Ser Val Ser Thr Tyr Ala Arg Ala Leu Ser Gly Asn  
 1 5 10 15

Lys Leu Pro His  
 20

15 <210> 141

<211> 210

<212> PRT

<213> Salmonella entérica

20 <220>

<223> SteA

<400> 141

ES 2 754 508 T3

Met Pro Tyr Thr Ser Val Ser Thr Tyr Ala Arg Ala Leu Ser Gly Asn  
1 5 10 15

Lys Leu Pro His Val Ala Ala Gly Asp Tyr Glu Asn Lys Leu Ser Thr  
20 25 30

Lys Ile Met Lys Gly Ile Leu Tyr Val Leu Thr Ala Gly Leu Ala Tyr  
35 40 45

Gly Phe Thr Arg Val Ile Glu His Tyr Cys Asn Val Thr Pro Lys Val  
50 55 60

Ala Glu Phe Cys Ala Asn Ala Gly Asn Ile His Asn His Leu Ala Asp  
65 70 75 80

Ala Val Arg Asp Gly Leu Phe Thr Ile Asp Val Glu Leu Ser Asp Gly  
85 90 95

Arg Met Leu Thr Phe Glu Gln Leu Ser Leu Ile Ala Glu Gly Lys Pro  
100 105 110

Ile Val Arg Ile Ser Asp Gly Glu His Thr Val Glu Val Glu Gly Thr  
115 120 125

Phe Glu Glu Ile Cys Met Arg Leu Glu Glu Gly Phe Phe Glu Ala Pro  
130 135 140

Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Ile Asp Glu Lys Tyr Lys Thr Val Arg Glu  
145 150 155 160

Arg Met Ala Ala Tyr Asn Ala Leu Pro Gln Ala Leu Gly Ala Ile Pro  
165 170 175

Cys Leu Glu Tyr Tyr Ile Ala Arg Ala Ser Asn Met Gln Glu Ala Lys  
180 185 190

Ala Gln Trp Ala Ala Asp Ile Lys Ala Arg Tyr His Asn Tyr Leu Asp  
195 200 205

Asn Tyr  
210

<210> 142  
<211> 81

5 <212> PRT  
<213> Salmonella enterica

<220>  
<223> SopE1-81

10 <400> 142

ES 2 754 508 T3

Val Thr Lys Ile Thr Leu Ser Pro Gln Asn Phe Arg Ile Gln Lys Gln  
1 5 10 15

Glu Thr Thr Leu Leu Lys Glu Lys Ser Thr Glu Lys Asn Ser Leu Ala  
20 25 30

Lys Ser Ile Leu Ala Val Lys Asn His Phe Ile Glu Leu Arg Ser Lys  
35 40 45

Leu Ser Glu Arg Phe Ile Ser His Lys Asn Thr Glu Ser Ser Ala Thr  
50 55 60

His Phe His Arg Gly Ser Ala Ser Glu Gly Arg Ala Val Leu Thr Asn  
65 70 75 80

Lys

<210> 143

<211> 105

5 <212> PRT

<213> Salmonella entérica

<220>

<223> SopE1-105

10

<400> 143

Val Thr Lys Ile Thr Leu Ser Pro Gln Asn Phe Arg Ile Gln Lys Gln  
1 5 10 15

Glu Thr Thr Leu Leu Lys Glu Lys Ser Thr Glu Lys Asn Ser Leu Ala  
20 25 30

Lys Ser Ile Leu Ala Val Lys Asn His Phe Ile Glu Leu Arg Ser Lys  
35 40 45

Leu Ser Glu Arg Phe Ile Ser His Lys Asn Thr Glu Ser Ser Ala Thr  
50 55 60

His Phe His Arg Gly Ser Ala Ser Glu Gly Arg Ala Val Leu Thr Asn  
65 70 75 80

Lys Val Val Lys Asp Phe Met Leu Gln Thr Leu Asn Asp Ile Asp Ile  
85 90 95

Arg Gly Ser Ala Ser Lys Asp Pro Ala  
100 105

15

<210> 144

<211> 158

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

<220>

<223> SteA1-20 murina con codones optimizados para *S. enterica*

<400> 144

ES 2 754 508 T3

Met Pro Tyr Thr Ser Val Ser Thr Tyr Ala Arg Ala Leu Ser Gly Asn  
1 5 10 15

Lys Leu Pro His Gly Thr Gly Ser Gln Ala Ser Arg Ser Phe Asn Gln  
20 25 30

Gly Arg Ile Glu Pro Asp Ser Glu Ser Gln Glu Glu Ile Ile His Asn  
35 40 45

Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Ile Gly Asp Glu Met Asp His Asn Ile  
50 55 60

Gln Pro Thr Leu Val Arg Gln Leu Ala Ala Gln Phe Met Asn Gly Ser  
65 70 75 80

Leu Ser Glu Glu Asp Lys Arg Asn Cys Leu Ala Lys Ala Leu Asp Glu  
85 90 95

Val Lys Thr Ala Phe Pro Arg Asp Met Glu Asn Asp Lys Ala Met Leu  
100 105 110

Ile Met Thr Met Leu Leu Ala Lys Lys Val Ala Ser His Ala Pro Ser  
115 120 125

Leu Leu Arg Asp Val Phe His Thr Thr Val Asn Phe Ile Asn Gln Asn  
130 135 140

Leu Phe Ser Tyr Val Arg Asn Leu Val Arg Asn Glu Met Asp  
145 150 155

<210> 145

<211> 348

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SteA tBid murina con codones optimizados para *S. enterica*

10 <400> 145

ES 2 754 508 T3

Met Pro Tyr Thr Ser Val Ser Thr Tyr Ala Arg Ala Leu Ser Gly Asn  
1 5 10 15

Lys Leu Pro His Val Ala Ala Gly Asp Tyr Glu Asn Lys Leu Ser Thr  
20 25 30

Lys Ile Met Lys Gly Ile Leu Tyr Val Leu Thr Ala Gly Leu Ala Tyr  
35 40 45

Gly Phe Thr Arg Val Ile Glu His Tyr Cys Asn Val Thr Pro Lys Val  
50 55 60

Ala Glu Phe Cys Ala Asn Ala Gly Asn Ile His Asn His Leu Ala Asp  
65 70 75 80

Ala Val Arg Asp Gly Leu Phe Thr Ile Asp Val Glu Leu Ser Asp Gly  
85 90 95

Arg Met Leu Thr Phe Glu Gln Leu Ser Leu Ile Ala Glu Gly Lys Pro  
100 105 110

Ile Val Arg Ile Ser Asp Gly Glu His Thr Val Glu Val Glu Gly Thr  
115 120 125

Phe Glu Glu Ile Cys Met Arg Leu Glu Glu Gly Phe Phe Glu Ala Pro  
130 135 140

Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Ile Asp Glu Lys Tyr Lys Thr Val Arg Glu  
145 150 155 160

Arg Met Ala Ala Tyr Asn Ala Leu Pro Gln Ala Leu Gly Ala Ile Pro  
165 170 175

Cys Leu Glu Tyr Tyr Ile Ala Arg Ala Ser Asn Met Gln Glu Ala Lys  
180 185 190

Ala Gln Trp Ala Ala Asp Ile Lys Ala Arg Tyr His Asn Tyr Leu Asp  
195 200 205

Asn Tyr Gly Thr Gly Ser Gln Ala Ser Arg Ser Phe Asn Gln Gly Arg  
210 215 220

Ile Glu Pro Asp Ser Glu Ser Gln Glu Glu Ile Ile His Asn Ile Ala  
225 230 235 240

ES 2 754 508 T3

Arg His Leu Ala Gln Ile Gly Asp Glu Met Asp His Asn Ile Gln Pro  
245 250 255

Thr Leu Val Arg Gln Leu Ala Ala Gln Phe Met Asn Gly Ser Leu Ser  
260 265 270

Glu Glu Asp Lys Arg Asn Cys Leu Ala Lys Ala Leu Asp Glu Val Lys  
275 280 285

Thr Ala Phe Pro Arg Asp Met Glu Asn Asp Lys Ala Met Leu Ile Met  
290 295 300

Thr Met Leu Leu Ala Lys Lys Val Ala Ser His Ala Pro Ser Leu Leu  
305 310 315 320

Arg Asp Val Phe His Thr Thr Val Asn Phe Ile Asn Gln Asn Leu Phe  
325 330 335

Ser Tyr Val Arg Asn Leu Val Arg Asn Glu Met Asp  
340 345

<210> 146

<211> 219

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SopE1-81 tBid murina con codones optimizados para *S. enterica*

10

<400> 146

Val Thr Lys Ile Thr Leu Ser Pro Gln Asn Phe Arg Ile Gln Lys Gln  
1 5 10 15

Glu Thr Thr Leu Leu Lys Glu Lys Ser Thr Glu Lys Asn Ser Leu Ala  
20 25 30

Lys Ser Ile Leu Ala Val Lys Asn His Phe Ile Glu Leu Arg Ser Lys  
35 40 45

Leu Ser Glu Arg Phe Ile Ser His Lys Asn Thr Glu Ser Ser Ala Thr  
50 55 60

His Phe His Arg Gly Ser Ala Ser Glu Gly Arg Ala Val Leu Thr Asn  
65 70 75 80

Lys Gly Thr Gly Ser Gln Ala Ser Arg Ser Phe Asn Gln Gly Arg Ile  
85 90 95

ES 2 754 508 T3

Glu Pro Asp Ser Glu Ser Gln Glu Glu Ile Ile His Asn Ile Ala Arg  
100 105 110

His Leu Ala Gln Ile Gly Asp Glu Met Asp His Asn Ile Gln Pro Thr  
115 120 125

Leu Val Arg Gln Leu Ala Ala Gln Phe Met Asn Gly Ser Leu Ser Glu  
130 135 140

Glu Asp Lys Arg Asn Cys Leu Ala Lys Ala Leu Asp Glu Val Lys Thr  
145 150 155 160

Ala Phe Pro Arg Asp Met Glu Asn Asp Lys Ala Met Leu Ile Met Thr  
165 170 175

Met Leu Leu Ala Lys Lys Val Ala Ser His Ala Pro Ser Leu Leu Arg  
180 185 190

Asp Val Phe His Thr Thr Val Asn Phe Ile Asn Gln Asn Leu Phe Ser  
195 200 205

Tyr Val Arg Asn Leu Val Arg Asn Glu Met Asp  
210 215

<210> 147

<211> 243

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SopE1-105 - tBid murina con codones optimizados para *S. enterica*

10

<400> 147

Val Thr Lys Ile Thr Leu Ser Pro Gln Asn Phe Arg Ile Gln Lys Gln  
1 5 10 15

Glu Thr Thr Leu Leu Lys Glu Lys Ser Thr Glu Lys Asn Ser Leu Ala  
20 25 30

Lys Ser Ile Leu Ala Val Lys Asn His Phe Ile Glu Leu Arg Ser Lys  
35 40 45

Leu Ser Glu Arg Phe Ile Ser His Lys Asn Thr Glu Ser Ser Ala Thr  
50 55 60

His Phe His Arg Gly Ser Ala Ser Glu Gly Arg Ala Val Leu Thr Asn  
65 70 75 80



<211> 73  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_682

<400> 150  
ttactactcg agaaaaaaact gagcgaatgt ctgcgcccga ttgggtatga actggatagc 60  
taagcttggta gta 73

10 <210> 151  
<211> 73  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_683

<400> 151  
tactccaagc ttagctatcc agttcatcac caatgcggcg cagacattcg ctcagtttt 60  
tctcgagtag taa 73

20 <210> 152  
<211> 34  
<212> ADN  
25 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_580

30 <400> 152  
catgccatgg atttatggtc atagatatga cctc 34  
<210> 153  
<211> 35

35 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_612

40 <400> 153  
cgggtacca tgaggtagct tatttcctga taaaag 35  
<210> 154  
45 <211> 35  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
50 <223> Cebador No.: Si\_613

<400> 154  
cgggtacca taattgtcca aatagttatg gtacg 35

55 <210> 155  
<211> 24  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

60 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_614



ES 2 754 508 T3

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Gly Ala Ile Asp  
130 135 140

Asp Ala Ala Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr Leu Val Val Leu His Arg  
145 150 155 160

Ala Gly Ala Arg

<210> 159

<211> 164

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138-Y. codón enterocolítico optimizado p107/RBL1 657-662 (AAA02489.1)

10

<400> 159

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

ES 2 754 508 T3

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Gly Ala Ile Asp  
130 135 140

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Pro Val Lys Arg  
145 150 155 160

Arg Leu Phe Gly

<210> 160

<211> 164

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138-Y. codón enterocolítico optimizado p21 141-160 (AAH13967.1)

10

<400> 160

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

ES 2 754 508 T3

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Gly Ala Ile Asp  
130 135 140

Lys Arg Arg Gln Thr Ser Met Thr Ala Phe Tyr His Ser Lys Arg Arg  
145 150 155 160

Leu Ile Phe Ser

<210> 161

<211> 160

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138-Y. codón enterocolítico optimizado p21 145-160 (AAH13967.1)

10

<400> 161

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Gly Ala Ile Asp  
130 135 140

Thr Ser Met Thr Ala Phe Tyr His Ser Lys Arg Arg Leu Ile Phe Ser  
145 150 155 160

15

<210> 162

<211> 161

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20

ES 2 754 508 T3

<220>

<223> YopE1-138-Y. codón enterocolítico optimizado p21 17-33 (AAH13967.1)

<400> 162

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1               5                           10                           15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20   25                                   30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35   40                                   45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50   55                                   60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65   70                                   75                                   80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85   90                                   95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100   105                                   110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115   120                                   125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Gly Ala Ile Asp  
130   135                                   140

Ala Cys Arg Arg Leu Phe Gly Pro Val Asp Ser Glu Gln Leu Ser Arg  
145   150                                   155                                   160

5      Asp

<210> 163

<211> 153

<212> PRT

10     <213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138-Y. codón enterocolítico optimizado ciclina D2 139-147 (CAA48493.1)

15     <400> 163

ES 2 754 508 T3

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Gly Ala Ile Asp  
130 135 140

Trp Glu Leu Val Val Leu Gly Lys Leu  
145 150

<210> 164

<211> 397

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SteA-Ink4a-Mychis

10 <400> 164

Met Pro Tyr Thr Ser Val Ser Thr Tyr Ala Arg Ala Leu Ser Gly Asn

## ES 2 754 508 T3

1

5

10

15

Lys Leu Pro His Val Ala Ala Gly Asp Tyr Glu Asn Lys Leu Ser Thr  
 20 25 30

Lys Ile Met Lys Gly Ile Leu Tyr Val Leu Thr Ala Gly Leu Ala Tyr  
 35 40 45

Gly Phe Thr Arg Val Ile Glu His Tyr Cys Asn Val Thr Pro Lys Val  
 50 55 60

Ala Glu Phe Cys Ala Asn Ala Gly Asn Ile His Asn His Leu Ala Asp  
 65 70 75 80

Ala Val Arg Asp Gly Leu Phe Thr Ile Asp Val Glu Leu Ser Asp Gly  
 85 90 95

Arg Met Leu Thr Phe Glu Gln Leu Ser Leu Ile Ala Glu Gly Lys Pro  
 100 105 110

Ile Val Arg Ile Ser Asp Gly Glu His Thr Val Glu Val Glu Gly Thr  
 115 120 125

Phe Glu Glu Ile Cys Met Arg Leu Glu Glu Gly Phe Phe Glu Ala Pro  
 130 135 140

Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Ile Asp Glu Lys Tyr Lys Thr Val Arg Glu  
 145 150 155 160

Arg Met Ala Ala Tyr Asn Ala Leu Pro Gln Ala Leu Gly Ala Ile Pro  
 165 170 175

Cys Leu Glu Tyr Tyr Ile Ala Arg Ala Ser Asn Met Gln Glu Ala Lys  
 180 185 190

Ala Gln Trp Ala Ala Asp Ile Lys Ala Arg Tyr His Asn Tyr Leu Asp  
 195 200 205

Asn Tyr Gly Thr Ile Trp Glu Phe Met Glu Pro Ala Ala Gly Ser Ser  
 210 215 220

Met Glu Pro Ser Ala Asp Trp Leu Ala Thr Ala Ala Ala Arg Gly Arg  
 225 230 235 240

Val Glu Glu Val Arg Ala Leu Leu Glu Ala Gly Ala Leu Pro Asn Ala  
 245 250 255

ES 2 754 508 T3

Pro Asn Ser Tyr Gly Arg Arg Pro Ile Gln Val Met Met Met Gly Ser  
260 265 270

Ala Arg Val Ala Glu Leu Leu Leu His Gly Ala Glu Pro Asn Cys  
275 280 285

Ala Asp Pro Ala Thr Leu Thr Arg Pro Val His Asp Ala Ala Arg Glu  
290 295 300

Gly Phe Leu Asp Thr Leu Val Val Leu His Arg Ala Gly Ala Arg Leu  
305 310 315 320

Asp Val Arg Asp Ala Trp Gly Arg Leu Pro Val Asp Leu Ala Glu Glu  
325 330 335

Leu Gly His Arg Asp Val Ala Arg Tyr Leu Arg Ala Ala Gly Gly  
340 345 350

Thr Arg Gly Ser Asn His Ala Arg Ile Asp Ala Ala Glu Gly Pro Ser  
355 360 365

Asp Ile Pro Asp Lys Leu Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu  
370 375 380

Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His  
385 390 395

<210> 165

<211> 292

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SopE1-105-Ink4a-Mychis

10

<400> 165

Val Thr Lys Ile Thr Leu Ser Pro Gln Asn Phe Arg Ile Gln Lys Gln  
1 5 10 15

Glu Thr Thr Leu Leu Lys Glu Lys Ser Thr Glu Lys Asn Ser Leu Ala  
20 25 30

Lys Ser Ile Leu Ala Val Lys Asn His Phe Ile Glu Leu Arg Ser Lys  
35 40 45

Leu Ser Glu Arg Phe Ile Ser His Lys Asn Thr Glu Ser Ser Ala Thr  
50 55 60

His Phe His Arg Gly Ser Ala Ser Glu Gly Arg Ala Val Leu Thr Asn

ES 2 754 508 T3

65	70	75	80	
Lys Val Val Lys Asp Phe Met Leu Gln Thr Leu Asn Asp Ile Asp Ile				
85		90	95	
Arg Gly Ser Ala Ser Lys Asp Pro Ala Gly Thr Ile Trp Glu Phe Met				
100		105	110	
Glu Pro Ala Ala Gly Ser Ser Met Glu Pro Ser Ala Asp Trp Leu Ala				
115		120	125	
Thr Ala Ala Ala Arg Gly Arg Val Glu Glu Val Arg Ala Leu Leu Glu				
130		135	140	
Ala Gly Ala Leu Pro Asn Ala Pro Asn Ser Tyr Gly Arg Arg Pro Ile				
145		150	155	160
Gln Val Met Met Met Gly Ser Ala Arg Val Ala Glu Leu Leu Leu Leu				
165		170	175	
His Gly Ala Glu Pro Asn Cys Ala Asp Pro Ala Thr Leu Thr Arg Pro				
180		185	190	
Val His Asp Ala Ala Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr Leu Val Val Leu				
195		200	205	
His Arg Ala Gly Ala Arg Leu Asp Val Arg Asp Ala Trp Gly Arg Leu				
210		215	220	
Pro Val Asp Leu Ala Glu Glu Leu Gly His Arg Asp Val Ala Arg Tyr				
225		230	235	240
Leu Arg Ala Ala Ala Gly Gly Thr Arg Gly Ser Asn His Ala Arg Ile				
245		250	255	
Asp Ala Ala Glu Gly Pro Ser Asp Ile Pro Asp Lys Leu Gly Pro Glu				
260		265	270	
Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His				
275		280	285	
His His His His				
290				
<210> 166				
<211> 409				
<212> PRT				
<213> Secuencia artificial				
<220>				
<223> SteA-Ink4c-MycHis				
<400> 166				

ES 2 754 508 T3

Met Pro Tyr Thr Ser Val Ser Thr Tyr Ala Arg Ala Leu Ser Gly Asn  
1 5 10 15

Lys Leu Pro His Val Ala Ala Gly Asp Tyr Glu Asn Lys Leu Ser Thr  
20 25 30

Lys Ile Met Lys Gly Ile Leu Tyr Val Leu Thr Ala Gly Leu Ala Tyr  
35 40 45

Gly Phe Thr Arg Val Ile Glu His Tyr Cys Asn Val Thr Pro Lys Val  
50 55 60

Ala Glu Phe Cys Ala Asn Ala Gly Asn Ile His Asn His Leu Ala Asp  
65 70 75 80

Ala Val Arg Asp Gly Leu Phe Thr Ile Asp Val Glu Leu Ser Asp Gly  
85 90 95

Arg Met Leu Thr Phe Glu Gln Leu Ser Leu Ile Ala Glu Gly Lys Pro  
100 105 110

Ile Val Arg Ile Ser Asp Gly Glu His Thr Val Glu Val Glu Gly Thr  
115 120 125

Phe Glu Glu Ile Cys Met Arg Leu Glu Glu Gly Phe Phe Glu Ala Pro  
130 135 140

Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Ile Asp Glu Lys Tyr Lys Thr Val Arg Glu  
145 150 155 160

Arg Met Ala Ala Tyr Asn Ala Leu Pro Gln Ala Leu Gly Ala Ile Pro  
165 170 175

Cys Leu Glu Tyr Tyr Ile Ala Arg Ala Ser Asn Met Gln Glu Ala Lys  
180 185 190

Ala Gln Trp Ala Ala Asp Ile Lys Ala Arg Tyr His Asn Tyr Leu Asp  
195 200 205

Asn Tyr Gly Thr Ile Trp Glu Phe Met Ala Glu Pro Trp Gly Asn Glu  
210 215 220

Leu Ala Ser Ala Ala Ala Arg Gly Asp Leu Glu Gln Leu Thr Ser Leu

ES 2 754 508 T3

Leu Gln Asn Asn Val Asn Val Asn Ala Gln Asn Gly Phe Gly Arg Thr  
245 250 255

Ala Leu Gln Val Met Lys Leu Gly Asn Pro Glu Ile Ala Arg Arg Leu  
260 265 270

Leu Leu Arg Gly Ala Asn Pro Asp Leu Lys Asp Arg Thr Gly Phe Ala  
275 280 285

Val Ile His Asp Ala Ala Arg Ala Gly Phe Leu Asp Thr Leu Gln Thr  
290 295 300

Leu Leu Glu Phe Gln Ala Asp Val Asn Ile Glu Asp Asn Glu Gly Asn  
305 310 315 320

Leu Pro Leu His Leu Ala Ala Lys Glu Gly His Leu Arg Val Val Glu  
325 330 335

Phe Leu Val Lys His Thr Ala Ser Asn Val Gly His Arg Asn His Lys  
340 345 350

Gly Asp Thr Ala Cys Asp Leu Ala Arg Leu Tyr Gly Arg Asn Glu Val  
355 360 365

Val Ser Leu Met Gln Ala Asn Gly Ala Gly Gly Ala Thr Asn Leu Gln  
370 375 380

Lys Leu Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser  
 385                    390                    395                    400

Ala Val Asp His His His His His His  
405

<210> 167

<211> 304

5 <212> PRT

### <213> Secuencia artificial

<220>

<223> SopE1-105-Ink4c-MycHis

10

167

Val Thr Lys Ile Thr Leu Ser Pro Gin Asn Phe Arg Ile Gin Lys Gin  
1 5 10 15

Glu Thr Thr Leu Leu Lys Glu Lys Ser Thr Glu Lys Asn Ser Leu Ala  
20 25 30

ES 2 754 508 T3

Lys Ser Ile Leu Ala Val Lys Asn His Phe Ile Glu Leu Arg Ser Lys  
35 40 45

Leu Ser Glu Arg Phe Ile Ser His Lys Asn Thr Glu Ser Ser Ala Thr  
50 55 60

His Phe His Arg Gly Ser Ala Ser Glu Gly Arg Ala Val Leu Thr Asn  
65 70 75 80

Lys Val Val Lys Asp Phe Met Leu Gln Thr Leu Asn Asp Ile Asp Ile  
85 90 95

Arg Gly Ser Ala Ser Lys Asp Pro Ala Gly Thr Ile Trp Glu Phe Met  
100 105 110

Ala Glu Pro Trp Gly Asn Glu Leu Ala Ser Ala Ala Arg Gly Asp  
115 120 125

Leu Glu Gln Leu Thr Ser Leu Leu Gln Asn Asn Val Asn Val Asn Ala  
130 135 140

Gln Asn Gly Phe Gly Arg Thr Ala Leu Gln Val Met Lys Leu Gly Asn  
145 150 155 160

Pro Glu Ile Ala Arg Arg Leu Leu Leu Arg Gly Ala Asn Pro Asp Leu  
165 170 175

Lys Asp Arg Thr Gly Phe Ala Val Ile His Asp Ala Ala Arg Ala Gly  
180 185 190

Phe Leu Asp Thr Leu Gln Thr Leu Leu Glu Phe Gln Ala Asp Val Asn  
195 200 205

Ile Glu Asp Asn Glu Gly Asn Leu Pro Leu His Leu Ala Ala Lys Glu  
210 215 220

Gly His Leu Arg Val Val Glu Phe Leu Val Lys His Thr Ala Ser Asn  
225 230 235 240

Val Gly His Arg Asn His Lys Gly Asp Thr Ala Cys Asp Leu Ala Arg  
245 250 255

Leu Tyr Gly Arg Asn Glu Val Val Ser Leu Met Gln Ala Asn Gly Ala  
260 265 270

Gly Gly Ala Thr Asn Leu Gln Lys Leu Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile  
275 280 285

Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His His  
290 295 300

- 5 <210> 168  
<211> 446  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

ES 2 754 508 T3

<220>

<223> SteA-Mad2-Mychis

5    <400> 168  
Met Pro Tyr Thr Ser Val Ser Thr Tyr Ala Arg Ala Leu Ser Gly Asn  
1                5                10                15  
  
Lys Leu Pro His Val Ala Ala Gly Asp Tyr Glu Asn Lys Leu Ser Thr  
20                25                30  
  
Lys Ile Met Lys Gly Ile Leu Tyr Val Leu Thr Ala Gly Leu Ala Tyr  
35                40                45  
  
Gly Phe Thr Arg Val Ile Glu His Tyr Cys Asn Val Thr Pro Lys Val  
50                55                60  
  
Ala Glu Phe Cys Ala Asn Ala Gly Asn Ile His Asn His Leu Ala Asp  
65                70                75                80  
  
Ala Val Arg Asp Gly Leu Phe Thr Ile Asp Val Glu Leu Ser Asp Gly  
85                90                95  
  
Arg Met Leu Thr Phe Glu Gln Leu Ser Leu Ile Ala Glu Gly Lys Pro  
100                105                110  
  
Ile Val Arg Ile Ser Asp Gly Glu His Thr Val Glu Val Glu Gly Thr  
115                120                125  
  
Phe Glu Glu Ile Cys Met Arg Leu Glu Glu Gly Phe Phe Glu Ala Pro  
130                135                140  
  
Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Ile Asp Glu Lys Tyr Lys Thr Val Arg Glu  
145                150                155                160  
  
Arg Met Ala Ala Tyr Asn Ala Leu Pro Gln Ala Leu Gly Ala Ile Pro  
165                170                175  
  
Cys Leu Glu Tyr Tyr Ile Ala Arg Ala Ser Asn Met Gln Glu Ala Lys  
180                185                190

# ES 2 754 508 T3

Ala Gln Trp Ala Ala Asp Ile Lys Ala Arg Tyr His Asn Tyr Leu Asp  
 195                    200                    205

Asn Tyr Gly Thr Ile Trp Glu Phe Met Ala Leu Gln Leu Ser Arg Glu  
 210                    215                    220

Gln Gly Ile Thr Leu Arg Gly Ser Ala Glu Ile Val Ala Glu Phe Phe  
 225                    230                    235                    240

Ser Phe Gly Ile Asn Ser Ile Leu Tyr Gln Arg Gly Ile Tyr Pro Ser  
 245                    250                    255

Glu Thr Phe Thr Arg Val Gln Lys Tyr Gly Leu Thr Leu Leu Val Thr  
 260                    265                    270

Thr Asp Leu Glu Leu Ile Lys Tyr Leu Asn Asn Val Val Glu Gln Leu  
 275                    280                    285

Lys Asp Trp Leu Tyr Lys Cys Ser Val Gln Lys Leu Val Val Val Ile  
 290                    295                    300

Ser Asn Ile Glu Ser Gly Glu Val Leu Glu Arg Trp Gln Phe Asp Ile  
 305                    310                    315                    320

Glu Cys Asp Lys Thr Ala Lys Asp Asp Ser Ala Pro Arg Glu Lys Ser  
 325                    330                    335

Gln Lys Ala Ile Gln Asp Glu Ile Arg Ser Val Ile Arg Gln Ile Thr  
 340                    345                    350

Ala Thr Val Thr Phe Leu Pro Leu Leu Glu Val Ser Cys Ser Phe Asp  
 355                    360                    365

Leu Leu Ile Tyr Thr Asp Lys Asp Leu Val Val Pro Glu Lys Trp Glu  
 370                    375                    380

Glu Ser Gly Pro Gln Phe Ile Thr Asn Ser Glu Glu Val Arg Leu Arg  
 385                    390                    395                    400

Ser Phe Thr Thr Thr Ile His Lys Val Asn Ser Met Val Ala Tyr Lys  
 405                    410                    415

Ile Pro Val Asn Asp Lys Leu Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu  
 420                    425                    430

Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His

435                    440                    445

5 <210> 169  
 <211> 341  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> SopE1-105-Mad2-MycHis

ES 2 754 508 T3

<400> 169

Val Thr Lys Ile Thr Leu Ser Pro Gln Asn Phe Arg Ile Gln Lys Gln  
1 5 10 15

Glu Thr Thr Leu Leu Lys Glu Lys Ser Thr Glu Lys Asn Ser Leu Ala  
20 25 30

Lys Ser Ile Leu Ala Val Lys Asn His Phe Ile Glu Leu Arg Ser Lys  
35 40 45

Leu Ser Glu Arg Phe Ile Ser His Lys Asn Thr Glu Ser Ser Ala Thr  
50 55 60

His Phe His Arg Gly Ser Ala Ser Glu Gly Arg Ala Val Leu Thr Asn  
65 70 75 80

Lys Val Val Lys Asp Phe Met Leu Gln Thr Leu Asn Asp Ile Asp Ile  
85 90 95

Arg Gly Ser Ala Ser Lys Asp Pro Ala Gly Thr Ile Trp Glu Phe Met  
100 105 110

Ala Leu Gln Leu Ser Arg Glu Gln Gly Ile Thr Leu Arg Gly Ser Ala  
115 120 125

Glu Ile Val Ala Glu Phe Phe Ser Phe Gly Ile Asn Ser Ile Leu Tyr  
130 135 140

Gln Arg Gly Ile Tyr Pro Ser Glu Thr Phe Thr Arg Val Gln Lys Tyr  
145 150 155 160

Gly Leu Thr Leu Leu Val Thr Thr Asp Leu Glu Leu Ile Lys Tyr Leu  
165 170 175

Asn Asn Val Val Glu Gln Leu Lys Asp Trp Leu Tyr Lys Cys Ser Val  
180 185 190

Gln Lys Leu Val Val Val Ile Ser Asn Ile Glu Ser Gly Glu Val Leu  
195 200 205

ES 2 754 508 T3

Glu Arg Trp Gln Phe Asp Ile Glu Cys Asp Lys Thr Ala Lys Asp Asp  
210 215 220

Ser Ala Pro Arg Glu Lys Ser Gln Lys Ala Ile Gln Asp Glu Ile Arg  
225 230 235 240

Ser Val Ile Arg Gln Ile Thr Ala Thr Val Thr Phe Leu Pro Leu Leu  
245 250 255

Glu Val Ser Cys Ser Phe Asp Leu Leu Ile Tyr Thr Asp Lys Asp Leu  
260 265 270

Val Val Pro Glu Lys Trp Glu Glu Ser Gly Pro Gln Phe Ile Thr Asn  
275 280 285

Ser Glu Glu Val Arg Leu Arg Ser Phe Thr Thr Thr Ile His Lys Val  
290 295 300

Asn Ser Met Val Ala Tyr Lys Ile Pro Val Asn Asp Lys Leu Gly Pro  
305 310 315 320

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His  
325 330 335

His His His His His  
340

<210> 170

<211> 538

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SteA-Cdk1-MycHis

10

<400> 170

Met Pro Tyr Thr Ser Val Ser Thr Tyr Ala Arg Ala Leu Ser Gly Asn  
1 5 10 15

Lys Leu Pro His Val Ala Ala Gly Asp Tyr Glu Asn Lys Leu Ser Thr  
20 25 30

Lys Ile Met Lys Gly Ile Leu Tyr Val Leu Thr Ala Gly Leu Ala Tyr  
35 40 45

Gly Phe Thr Arg Val Ile Glu His Tyr Cys Asn Val Thr Pro Lys Val  
50 55 60

ES 2 754 508 T3

Ala Glu Phe Cys Ala Asn Ala Gly Asn Ile His Asn His Leu Ala Asp  
65 70 75 80

Ala Val Arg Asp Gly Leu Phe Thr Ile Asp Val Glu Leu Ser Asp Gly  
85 90 95

Arg Met Leu Thr Phe Glu Gln Leu Ser Leu Ile Ala Glu Gly Lys Pro  
100 105 110

Ile Val Arg Ile Ser Asp Gly Glu His Thr Val Glu Val Glu Gly Thr  
115 120 125

Phe Glu Glu Ile Cys Met Arg Leu Glu Glu Gly Phe Phe Glu Ala Pro  
130 135 140

Ala Tyr Tyr Asp Tyr Asp Ile Asp Glu Lys Tyr Lys Thr Val Arg Glu  
145 150 155 160

Arg Met Ala Ala Tyr Asn Ala Leu Pro Gln Ala Leu Gly Ala Ile Pro  
165 170 175

Cys Leu Glu Tyr Tyr Ile Ala Arg Ala Ser Asn Met Gln Glu Ala Lys  
180 185 190

Ala Gln Trp Ala Ala Asp Ile Lys Ala Arg Tyr His Asn Tyr Leu Asp  
195 200 205

Asn Tyr Gly Thr Ile Trp Glu Phe Met Glu Asp Tyr Thr Lys Ile Glu  
210 215 220

Lys Ile Gly Glu Gly Thr Tyr Gly Val Val Tyr Lys Gly Arg His Lys  
225 230 235 240

Thr Thr Gly Gln Val Val Ala Met Lys Lys Ile Arg Leu Glu Ser Glu  
245 250 255

Glu Glu Gly Val Pro Ser Thr Ala Ile Arg Glu Ile Ser Leu Leu Lys  
260 265 270

Glu Leu Arg His Pro Asn Ile Val Ser Leu Gln Asp Val Leu Met Gln  
275 280 285

Asp Ser Arg Leu Tyr Leu Ile Phe Glu Phe Leu Ser Met Asp Leu Lys  
290 295 300

Lys Tyr Leu Asp Ser Ile Pro Pro Gly Gln Tyr Met Asp Ser Ser Leu  
305 310 315 320

ES 2 754 508 T3

Val Lys Ser Tyr Leu Tyr Gln Ile Leu Gln Gly Ile Val Phe Cys His  
325 330 335

Ser Arg Arg Val Leu His Arg Asp Leu Lys Pro Gln Asn Leu Leu Ile  
340 345 350

Asp Asp Lys Gly Thr Ile Lys Leu Ala Asp Phe Gly Leu Ala Arg Ala  
355 360 365

Phe Gly Ile Pro Ile Arg Val Tyr Thr His Glu Val Val Thr Leu Trp  
370 375 380

Tyr Arg Ser Pro Glu Val Leu Leu Gly Ser Ala Arg Tyr Ser Thr Pro  
385 390 395 400

Val Asp Ile Trp Ser Ile Gly Thr Ile Phe Ala Glu Leu Ala Thr Lys  
405 410 415

Lys Pro Leu Phe His Gly Asp Ser Glu Ile Asp Gln Leu Phe Arg Ile  
420 425 430

Phe Arg Ala Leu Gly Thr Pro Asn Asn Glu Val Trp Pro Glu Val Glu  
435 440 445

Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Asn Thr Phe Pro Lys Trp Lys Pro Gly Ser  
450 455 460

Leu Ala Ser His Val Lys Asn Leu Asp Glu Asn Gly Leu Asp Leu Leu  
465 470 475 480

Ser Lys Met Leu Ile Tyr Asp Pro Ala Lys Arg Ile Ser Gly Lys Met  
485 490 495

Ala Leu Asn His Pro Tyr Phe Asn Asp Leu Asp Asn Gln Ile Lys Lys  
500 505 510

Met Lys Leu Gly Pro Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn  
515 520 525

Ser Ala Val Asp His His His His His His  
530 535

<210> 171

<211> 433

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SopE1-105-Cdk1-MycHis

10 <400> 171

ES 2 754 508 T3

Val Thr Lys Ile Thr Leu Ser Pro Gln Asn Phe Arg Ile Gln Lys Gln  
1 5 10 15

Glu Thr Thr Leu Leu Lys Glu Lys Ser Thr Glu Lys Asn Ser Leu Ala  
20 25 30

Lys Ser Ile Leu Ala Val Lys Asn His Phe Ile Glu Leu Arg Ser Lys  
35 40 45

Leu Ser Glu Arg Phe Ile Ser His Lys Asn Thr Glu Ser Ser Ala Thr  
50 55 60

His Phe His Arg Gly Ser Ala Ser Glu Gly Arg Ala Val Leu Thr Asn  
65 70 75 80

Lys Val Val Lys Asp Phe Met Leu Gln Thr Leu Asn Asp Ile Asp Ile  
85 90 95

Arg Gly Ser Ala Ser Lys Asp Pro Ala Gly Thr Ile Trp Glu Phe Met  
100 105 110

Glu Asp Tyr Thr Lys Ile Glu Lys Ile Gly Glu Gly Thr Tyr Gly Val  
115 120 125

Val Tyr Lys Gly Arg His Lys Thr Thr Gly Gln Val Val Ala Met Lys  
130 135 140

Lys Ile Arg Leu Glu Ser Glu Glu Gly Val Pro Ser Thr Ala Ile  
145 150 155 160

Arg Glu Ile Ser Leu Leu Lys Glu Leu Arg His Pro Asn Ile Val Ser  
165 170 175

Leu Gln Asp Val Leu Met Gln Asp Ser Arg Leu Tyr Leu Ile Phe Glu  
180 185 190

Phe Leu Ser Met Asp Leu Lys Lys Tyr Leu Asp Ser Ile Pro Pro Gly  
195 200 205

Gln Tyr Met Asp Ser Ser Leu Val Lys Ser Tyr Leu Tyr Gln Ile Leu  
210 215 220

Gln Gly Ile Val Phe Cys His Ser Arg Arg Val Leu His Arg Asp Leu  
225 230 235 240

ES 2 754 508 T3

Lys Pro Gln Asn Leu Leu Ile Asp Asp Lys Gly Thr Ile Lys Leu Ala  
245 250 255

Asp Phe Gly Leu Ala Arg Ala Phe Gly Ile Pro Ile Arg Val Tyr Thr  
260 265 270

His Glu Val Val Thr Leu Trp Tyr Arg Ser Pro Glu Val Leu Leu Gly  
275 280 285

Ser Ala Arg Tyr Ser Thr Pro Val Asp Ile Trp Ser Ile Gly Thr Ile  
290 295 300

Phe	Ala	Glu	Leu	Ala	Thr	Lys	Lys	Pro	Leu	Phe	His	Gly	Asp	Ser	Glu
305					310					315					320

Glu Val Trp Pro Glu Val Glu Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Asn Thr Phe  
340 345 350

Pro Lys Trp Lys Pro Gly Ser Leu Ala Ser His Val Lys Asn Leu Asp  
355 360 365

Glu Asn Gly Leu Asp Leu Leu Ser Lys Met Leu Ile Tyr Asp Pro Ala  
 370                    375                    380

Lys Arg Ile Ser Gly Lys Met Ala Leu Asn His Pro Tyr Phe Asn Asp	385	390	395	400
---	-----	-----	-----	-----

Leu Asp Asn Gln Ile Lys Lys Met Lys Leu Gly Pro Glu Gln Lys Leu  
405 410 415

Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His His His  
420 425 430

<211> 95

<213> Sec

<220>

<223> Cebador No.: Si\_74

<400>

catgactcgaa ggtggccatcg

gctgcattc

gctgcatcgccgggtgcggc gctaattcgaaatcg 95

<210> 173  
      61-65

10

<212> ADM

<213> Sec

<223>

20

<223> Cebador No.: SI\_746

	<400> 173	
	catgttcgaa ttagcggca ccggcgcat gcagcaccac caggatcc agaaaacctt	60
	cgccggcgc atcatcgatg gcaccctcga gcatg	95
5	<210> 174	
	<211> 95	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
10	<220>	
	<223> Cebador No.: Si_747	
	<400> 174	
	catgctcgag ggtgccatcg attatggtcg caaaaaacgc cgccaacgcc gccgcggtcc	60
	ggtgaaacgc cgccgtttg gttaattcga acatg	95
15	<210> 175	
	<211> 95	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador No.: Si_748	
	<400> 175	
	catgttcgaa ttaaccaaac aggccgcgtt tcaccggacc gcggcggcgt tggccgcgtt	60
25	ttttgcgacc ataatcgatg gcaccctcga gcatg	95
	<210> 176	
	<211> 95	
	<212> ADN	
30	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador No.: Si_749	
35	<400> 176	
	catgctcgag ggtgccatcg ataaacgccc ccaaaccagc atgaccgcct tttatcatag	60
	caaacgcgcg ctgatttttta gctaattcga acatg	95
	<210> 177	
	<211> 95	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador No.: Si_750	
45	<400> 177	
	catgttcgaa ttagctaaaa atcaggccgc gtttgctatg ataaaaggcg gtcatgctgg	60
	tttggccgcg tttatcgatg gcaccctcga gcatg	95
	<210> 178	
50	<211> 83	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador No.: Si_753	
	<400> 178	

	catgctcgag ggtgccatcg ataccagcat gaccgcctt tatcatagca aacgcccct	60
	gatttttagc taattcgaac atg	83
	<210> 179	
	<211> 83	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador No.: Si_754	
10	<400> 179	
	catgttcgaa ttagctaaaa atcaggcggc gtttgctatg ataaaaggcg gtcatgctgg	60
	tatcgatggc accctcgagc atg	83
	<210> 180	
15	<211> 86	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador No.: Si_755	
	<400> 180	
	catgctcgag ggtgccatcg atgcctgtcg ccgcctgttt ggtccgggtgg atagcgaaca	60
	actgagccgc gattaattcg aacatg	86
25	<210> 181	
	<211> 86	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador No.: Si_756	
	<400> 181	
	catgttcgaa ttaatcgccg ctcagttgtt cgctatccac cggaccaaac aggcggcgcac	60
	aggcatcgat ggcaccctcg agcatg	86
35	<210> 182	
	<211> 62	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador No.: Si_757	
	<400> 182	
	catgctcgag ggtgccatcg attggaaact ggtggtgctg ggtaaactgt aattcgaaca	60
45	tg	62
	<210> 183	
	<211> 62	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador No.: Si_758	
55	<400> 183	

	catgttcgaa ttacagttta cccagcacca ccagttccca atcgatggca ccctcgagca	60
	tg	62
	<210> 184	
	<211> 27	
5	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
10	<223> Cebador No.: Si_703	
	<400> 184	
	gacatggaaat tcatggagcc ggccggcg 27	
	<210> 185	
15	<211> 28	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
20	<223> Cebador No.: Si_704	
	<400> 185	
	catgaagctt atcggggatg tctgaggg 28	
25	<210> 186	
	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
30	<220>	
	<223> Cebador No.: Si_705	
	<400> 186	
	gacatggaaat tcatggccga gcctgggg 29	
35	<210> 187	
	<211> 51	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
40	<220>	
	<223> Cebador No.: Si_706	
	<400> 187	
45	gttaaacatca gcttgaaact ccagcaaagt ctgtaaagtg tccaggaaac c 51	
	<210> 188	
	<211> 51	
	<212> ADN	
50	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador No.: Si_707	
55	<400> 188	
	ggttccctgg acactttaca gacttgctg gagttcaag ctgtatgtaa c 51	
	<210> 189	
	<211> 30	
60	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador No.: Si_708	

<400> 189  
catgaagctt ttgaagattt gtggctcccc 30

5 <210> 190  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_709

<400> 190  
gacatggaat tcatggcgct gcagctctcc 30

15 <210> 191  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_710

<400> 191  
25 catgaagctt gtcattgaca ggaattttgt agg 33

<210> 192  
<211> 38  
<212> ADN

30 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_711

<400> 192  
35 gacatggaat tcatggaga ttataccaaa atagagaa 38

<210> 193  
<211> 34  
40 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cebador No.: Si\_712

<400> 193  
45 catgaagctt catcttccta atctgattgt ccaa 34

<210> 194  
50 <211> 276  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
55 <223> YopE1-138-Y. codón enterocolítico tBid murino optimizado

<400> 194

## ES 2 754 508 T3

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
 1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
 20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
 35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
 50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
 65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
 85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
 100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
 115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Gly Ser Gln Ala  
 130 135 140

Ser Arg Ser Phe Asn Gln Gly Arg Ile Glu Pro Asp Ser Glu Ser Gln  
 145 150 155 160

Glu Glu Ile Ile His Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Ile Gly Asp  
 165 170 175

Glu Met Asp His Asn Ile Gln Pro Thr Leu Val Arg Gln Leu Ala Ala  
 180 185 190

Gln Phe Met Asn Gly Ser Leu Ser Glu Glu Asp Lys Arg Asn Cys Leu  
 195 200 205

Ala Lys Ala Leu Asp Glu Val Lys Thr Ala Phe Pro Arg Asp Met Glu  
 210 215 220

Asn Asp Lys Ala Met Leu Ile Met Thr Met Leu Leu Ala Lys Lys Val  
 225 230 235 240

Ala Ser His Ala Pro Ser Leu Leu Arg Asp Val Phe His Thr Thr Val  
 245 250 255

Asn Phe Ile Asn Gln Asn Leu Phe Ser Tyr Val Arg Asn Leu Val Arg  
 260 265 270

Asn Glu Met Asp  
 275

5 <210> 195  
 <211> 245

<212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> YopE1-138-Ubiquitina

<400> 195  
 Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
 1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
 20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
 35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
 50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
 65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
 85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
 100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
 115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Met Gln Ile Phe  
 130 135 140

Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser  
 145 150 155 160

Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile  
 165 170 175

Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp  
 180 185 190

Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His  
 195 200 205

Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Phe Glu Ala Ser Lys Leu Gly Pro  
 210 215 220

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His  
 225 230 235 240

His His His His His  
 245

<210> 196  
 <211> 419

ES 2 754 508 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> YopE1-138-Ubiquitina-Bandera-INK4C-MycHis

<400> 196

Met Lys Ile Ser Ser Phe Ile Ser Thr Ser Leu Pro Leu Pro Ala Ser  
1 5 10 15

Val Ser Gly Ser Ser Ser Val Gly Glu Met Ser Gly Arg Ser Val Ser  
20 25 30

Gln Gln Lys Ser Asp Gln Tyr Ala Asn Asn Leu Ala Gly Arg Thr Glu  
35 40 45

Ser Pro Gln Gly Ser Ser Leu Ala Ser Arg Ile Ile Glu Arg Leu Ser  
50 55 60

Ser Met Ala His Ser Val Ile Gly Phe Ile Gln Arg Met Phe Ser Glu  
65 70 75 80

Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met  
85 90 95

Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu  
100 105 110

Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr  
115 120 125

Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Met Gln Ile Phe  
130 135 140

Val Lys Thr Leu Thr Gly Lys Thr Ile Thr Leu Glu Val Glu Pro Ser  
145 150 155 160

Asp Thr Ile Glu Asn Val Lys Ala Lys Ile Gln Asp Lys Glu Gly Ile  
165 170 175

Pro Pro Asp Gln Gln Arg Leu Ile Phe Ala Gly Lys Gln Leu Glu Asp  
180 185 190

Gly Arg Thr Leu Ser Asp Tyr Asn Ile Gln Lys Glu Ser Thr Leu His  
195 200 205

Leu Val Leu Arg Leu Arg Gly Gly Phe Glu Asp Tyr Lys Asp Asp Asp  
210 215 220

Asp Lys Met Ala Glu Pro Trp Gly Asn Glu Leu Ala Ser Ala Ala Ala  
225 230 235 240

ES 2 754 508 T3

Arg Gly Asp Leu Glu Gln Leu Thr Ser Leu Leu Gln Asn Asn Val Asn  
245 250 255

Val Asn Ala Gln Asn Gly Phe Gly Arg Thr Ala Leu Gln Val Met Lys  
260 265 270

Leu Gly Asn Pro Glu Ile Ala Arg Arg Leu Leu Leu Arg Gly Ala Asn  
275 280 285

Pro Asp Leu Lys Asp Arg Thr Gly Phe Ala Val Ile His Asp Ala Ala  
290 295 300

Arg Ala Gly Phe Leu Asp Thr Leu Gln Ala Leu Pro Glu Phe Gln Ala  
305 310 315 320

Asp Val Asn Ile Glu Asp Asn Glu Gly Asn Leu Pro Leu His Leu Ala  
325 330 335

Ala Lys Glu Gly His Leu Arg Val Val Glu Phe Leu Val Lys His Thr  
340 345 350

Ala Ser Asn Val Gly His Arg Asn His Lys Gly Asp Thr Ala Cys Asp  
355 360 365

Leu Ala Arg Leu Tyr Gly Arg Asn Glu Val Val Ser Leu Met Gln Ala  
370 375 380

Asn Gly Ala Gly Gly Ala Thr Asn Leu Gln Lys Leu Gly Pro Glu Gln  
385 390 395 400

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Asn Ser Ala Val Asp His His His  
405 410 415

His His His

<210> 197

<211> 30

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador No.: Si\_585

10 <400> 197

cagtctcgag atgcagatct tcgtcaagac 30

15 <210> 198

<211> 43

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador No.: Si\_586

<400> 198

gttaaagctt gctagcttcg aaaccaccac gtagacgtaa gac 43

25 <210> 199

<211> 48

<212> ADN  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> Cebador No.: Si\_588

<400> 199  
cagtttcgaa gattataaag atgatgtga taaaatggcc gagccttg 48

## REIVINDICACIONES

1. Un vector que comprende, en la dirección 5' a 3':

un promotor;

5 una primera secuencia de ADN que codifica una señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana, unida operablemente a dicho promotor, en el que la proteína efectora de T3SS bacteriana se selecciona del grupo que consiste en SopE, SteA y YopE;

10 una segunda secuencia de ADN que codifica una proteína heteróloga condensada dentro de marco al extremo 3' de dicha primera secuencia de ADN, en la que la proteína heteróloga se selecciona del grupo que consiste en proteínas implicadas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis, reguladores del ciclo celular, proteínas de repetición de anquirina, proteínas indicadoras, GTPasas pequeñas, proteínas relacionadas con GPCR, construcciones de fusión de nanocuerpos, efectores de T3SS bacterianos, efectores de T4SS bacterianos y proteínas víricas; y opcionalmente,

15 una tercera secuencia de ADN que codifica un sitio de ruptura de proteasa, en el que la tercera secuencia de ADN está localizada entre el extremo 3' de dicha primera secuencia de ADN y el extremo 5' de dicha segunda secuencia de ADN.

20 2. Una cepa bacteriana Gram-negativa recombinante, en la que dicha cepa bacteriana Gram-negativa está transformada con el vector de la reivindicación 1, en la que la cepa bacteriana Gram-negativa es una cepa de *Yersinia*, y la señal de transporte procedente de la proteína efectora de T3SS bacteriana codificada por la primera secuencia de ADN comprende la proteína efectora Yop3, o un fragmento N-terminal de esta, en la que el fragmento N-terminal incluye al menos los primeros 20 aminoácidos de la proteína efectora YopE, o en la que la cepa bacteriana Gram-negativa es una cepa de *Salmonella*, y la señal de transporte procedente de la proteína efectora de T3SS bacteriana codificada por la primera secuencia de ADN comprende la proteína efectora SopE o SteA, o un fragmento N-terminal de estas, en la que el fragmento N-terminal incluye al menos los primeros 20 aminoácidos de la proteína efectora SopE o SteA.

25 3. La cepa bacteriana Gram-negativa recombinante de la reivindicación 2, en la que dicha cepa bacteriana Gram-negativa recombinante es deficiente en la producción de al menos una proteína efectora de T3SS.

30 4. La cepa bacteriana Gram-negativa recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 2-3, en la que la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante es una cepa de *Yersinia*, y en la que dicha cepa de *Yersinia* es de tipo salvaje o es deficiente en la producción de al menos una proteína efectora de T3SS, y en la que la señal de transporte procedente de la proteína efectora de T3SS comprende los 138 aminoácidos N-terminales de la proteína efectora YopE de *Y. enterocolitica*, o en la que la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante es una cepa de *Salmonella*, y en la que dicha cepa de *Salmonella* es de tipo salvaje o es deficiente en la producción de al menos una proteína efectora de T3SS, y en la que la señal de transporte procedente de la proteína efectora de T3SS comprende la proteína efectora SteA de *S. enterica* o los 81 o 105 aminoácidos N-terminales de la proteína efectora SopE de *S. enterica*.

35 5. La cepa bacteriana Gram-negativa recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 2-4, en la que la cepa bacteriana Gram-negativa es deficiente en la producción de un aminoácido fundamental para el crecimiento.

40 6. La cepa bacteriana Gram-negativa recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en la que la cepa bacteriana Gram-negativa es deficiente en la producción de proteínas de adhesión que se unen a la superficie de células eucariotas o la matriz extracelular.

45 7. La cepa bacteriana Gram-negativa recombinante o el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la proteína heteróloga se selecciona del grupo que consiste en proteínas implicadas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis, reguladores del ciclo celular, y proteínas de repetición de anquirina.

8. La cepa bacteriana Gram-negativa recombinante o el vector de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que las proteínas implicadas en la apoptosis o la regulación de la apoptosis se seleccionan del grupo que consiste en proteínas solo con BH3, caspasas y proteínas de señalización intracelular de control del receptor de muerte de la apoptosis.

9. Un método para transportar una proteína heteróloga hacia el interior de una célula eucariota, que comprende las siguientes etapas:

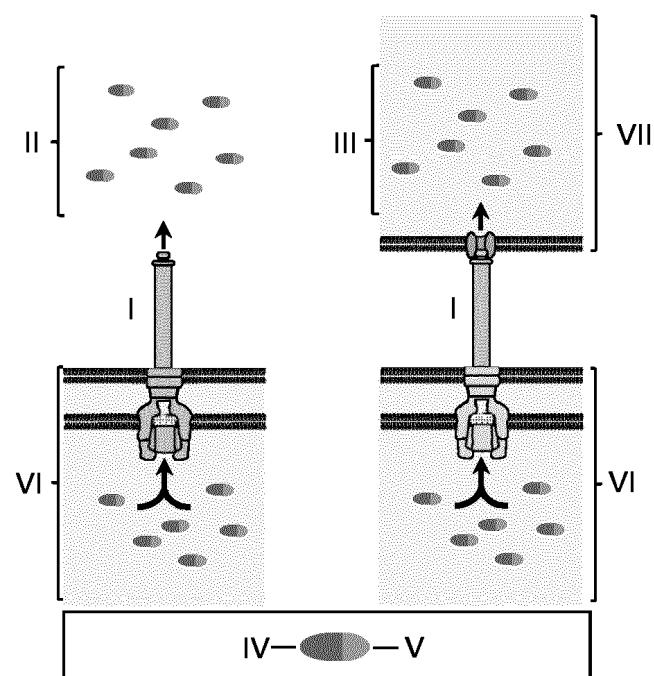
50 i) cultivar la cepa bacteriana Gram-negativa de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6; y

ii) poner en contacto una célula eucariota con la cepa bacteriana Gram-negativa de i), en el que una proteína de fusión que comprende una señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana y la proteína heteróloga es expresada por la cepa bacteriana Gram-negativa y se transloca hacia el interior de la célula eucariota.

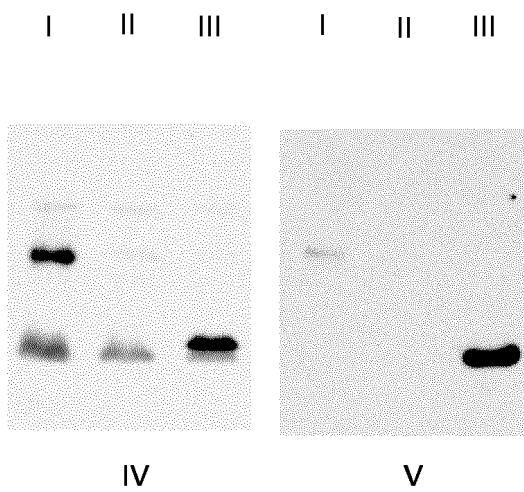
10. Un método para purificar una proteína heteróloga, que comprende cultivar la cepa bacteriana Gram-negativa de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, de forma que una proteína de fusión que comprende una señal de transporte procedente de una proteína efectora de T3SS bacteriana y la proteína heteróloga se expresa y se segregá hacia el sobrenadante del cultivo.
- 5    11. La cepa bacteriana Gram-negativa recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, para el uso en el transporte de una proteína heteróloga como un medicamento o una vacuna a un sujeto.
12. El uso de la cepa bacteriana Gram-negativa recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6 para la selección de alta capacidad de procesamiento de inhibidores de una vía celular o acontecimiento activado por la proteína o proteínas heterólogas translocadas.
- 10    13. Un banco de cepas bacterianas Gram-negativas de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, en el que la proteína heteróloga codificada por la segunda secuencia de ADN del vector de expresión de las cepas bacterianas Gram-negativas es una proteína humana o murina, y en el que cada proteína humana o murina expresada por las cepas bacterianas Gram-negativas tiene una secuencia de aminoácidos diferente.

## Figura 1

A

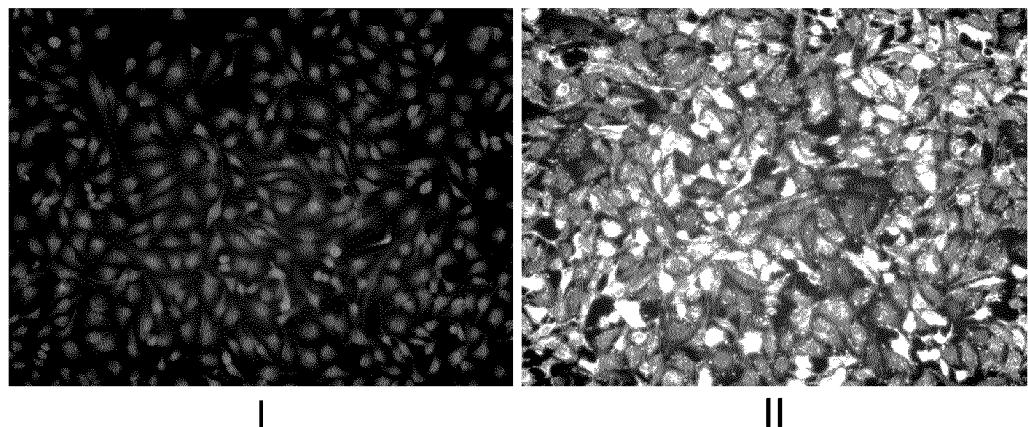


B



**Figura 2**

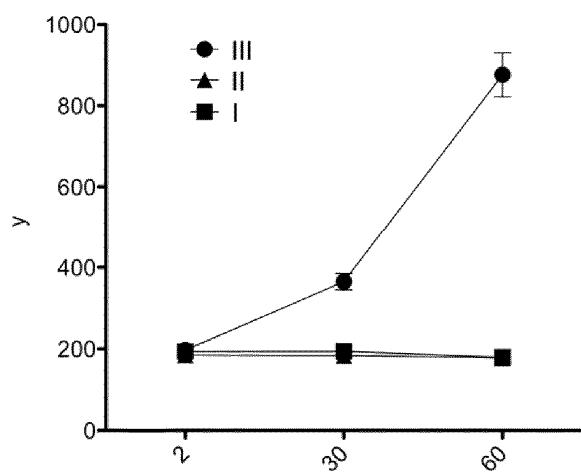
A



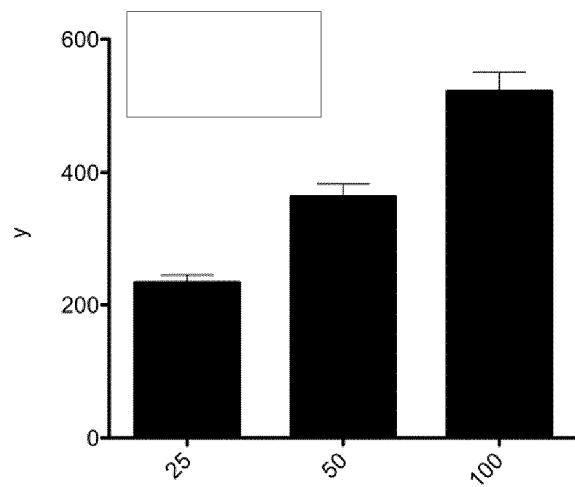
I

II

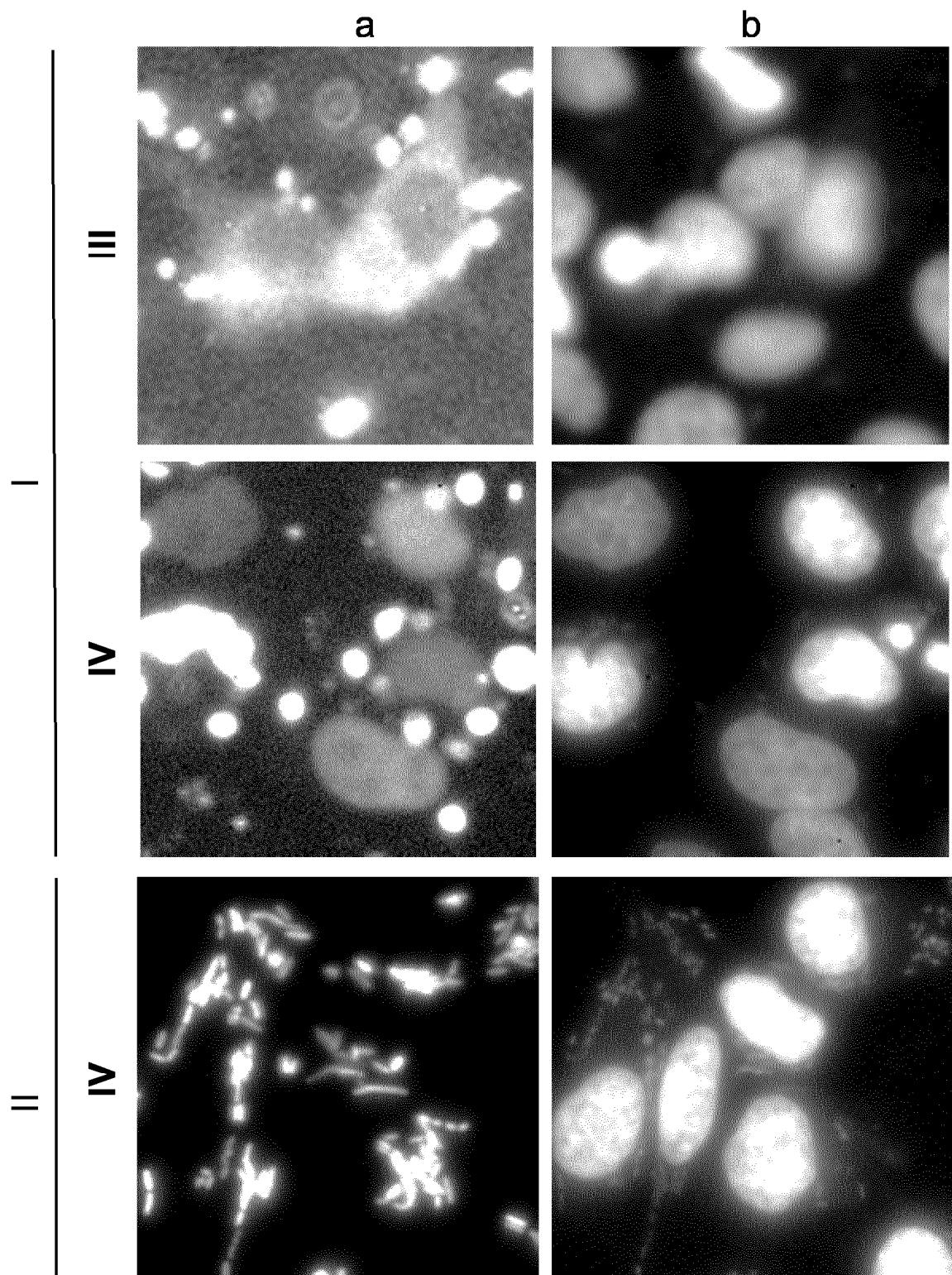
B

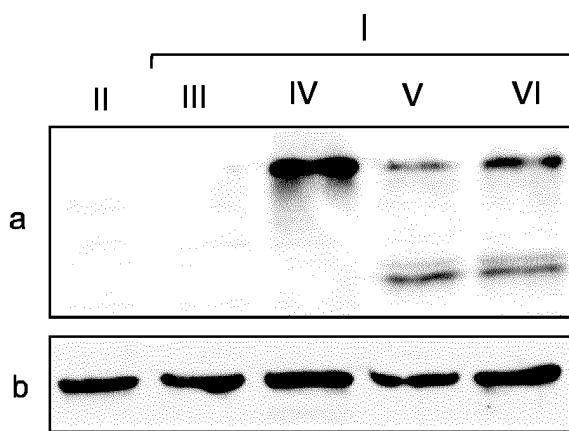
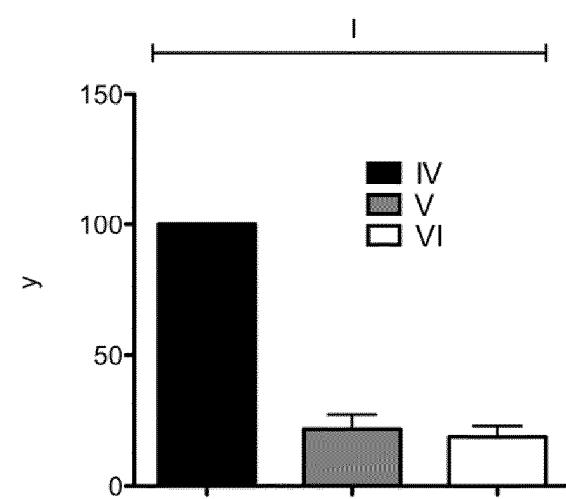
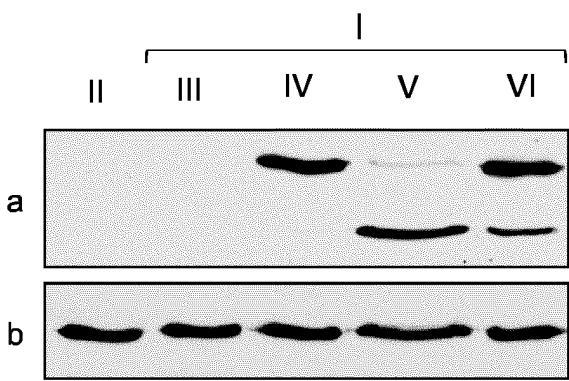


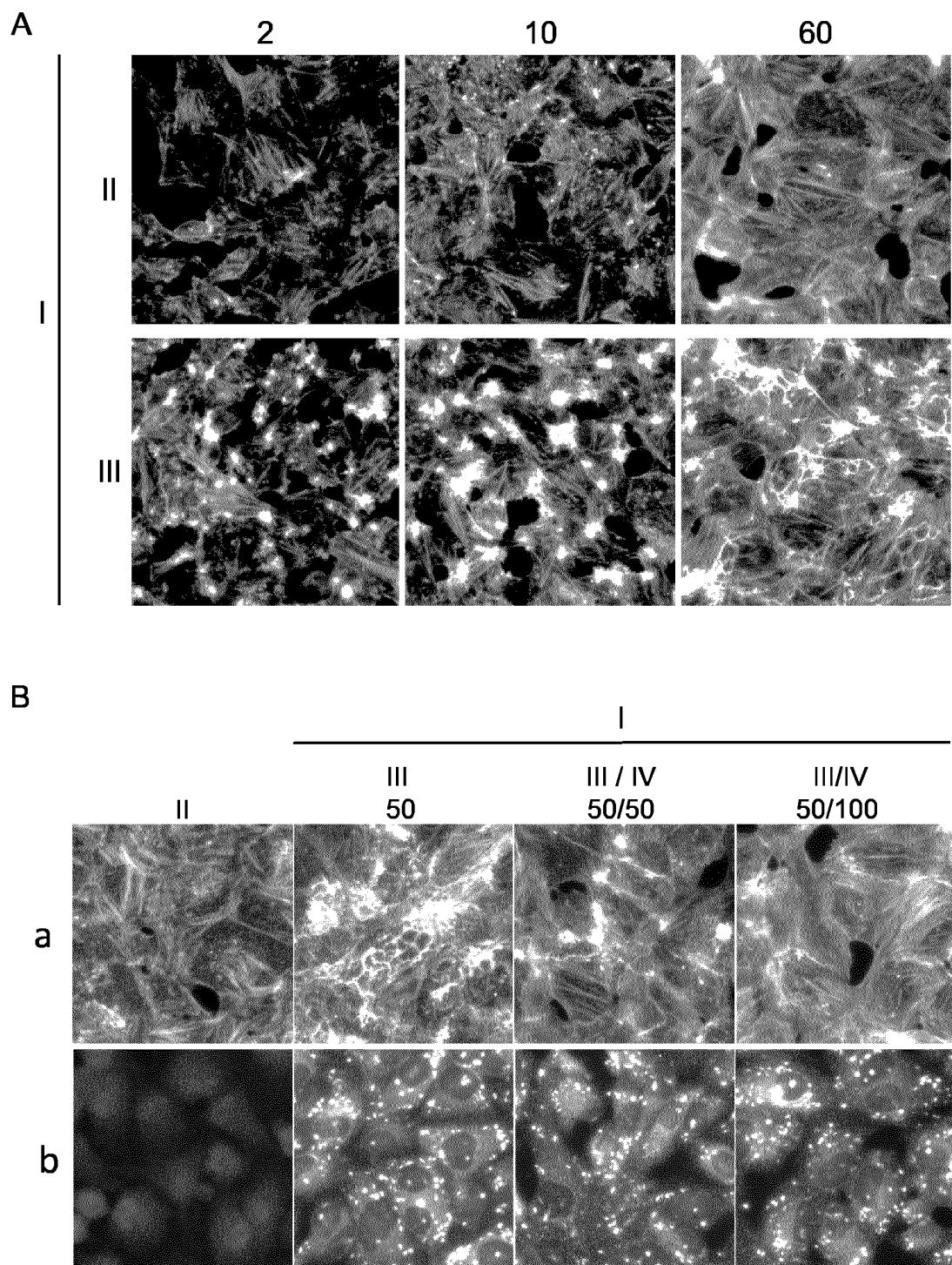
C

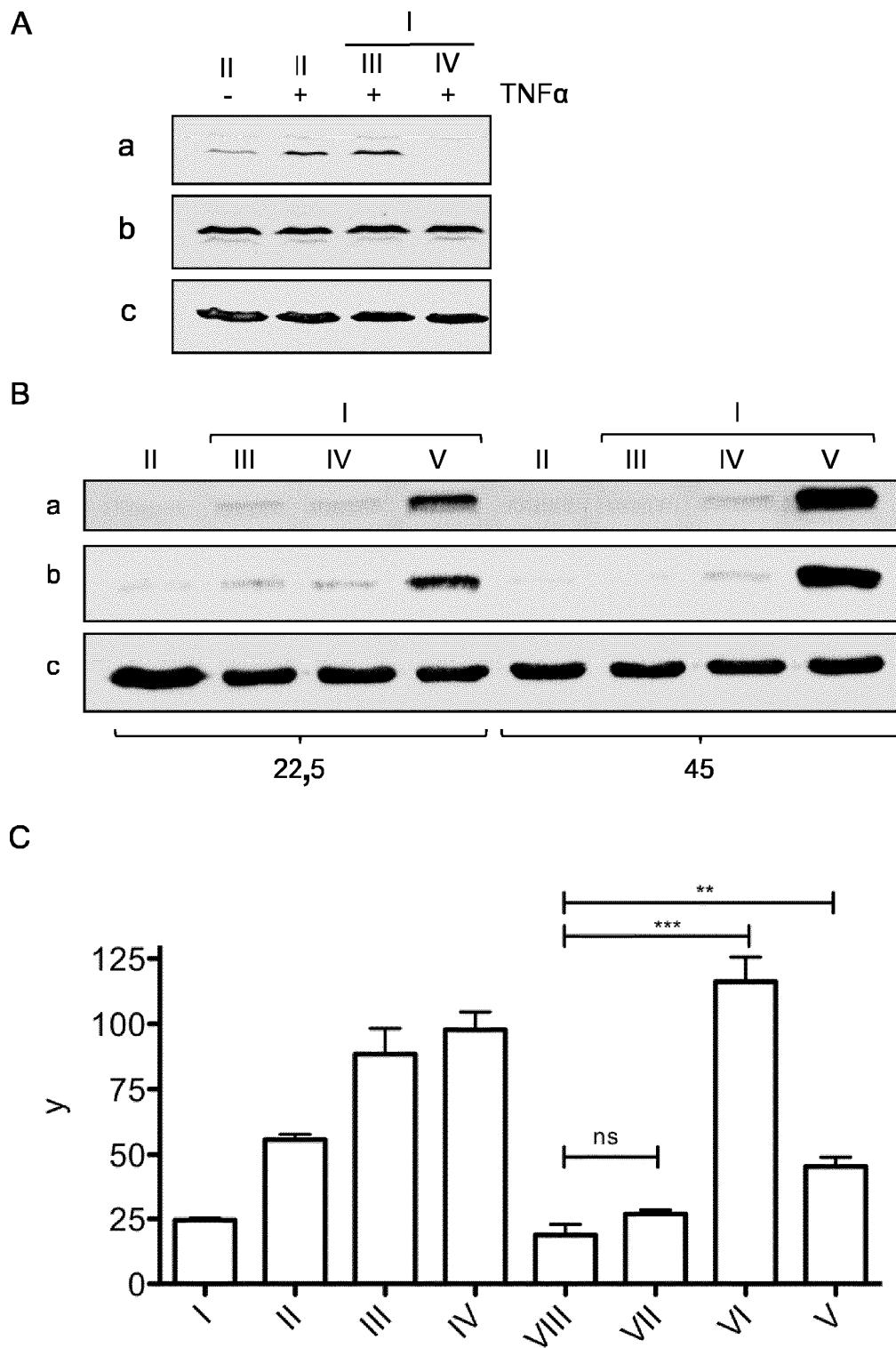


**Figura 3**

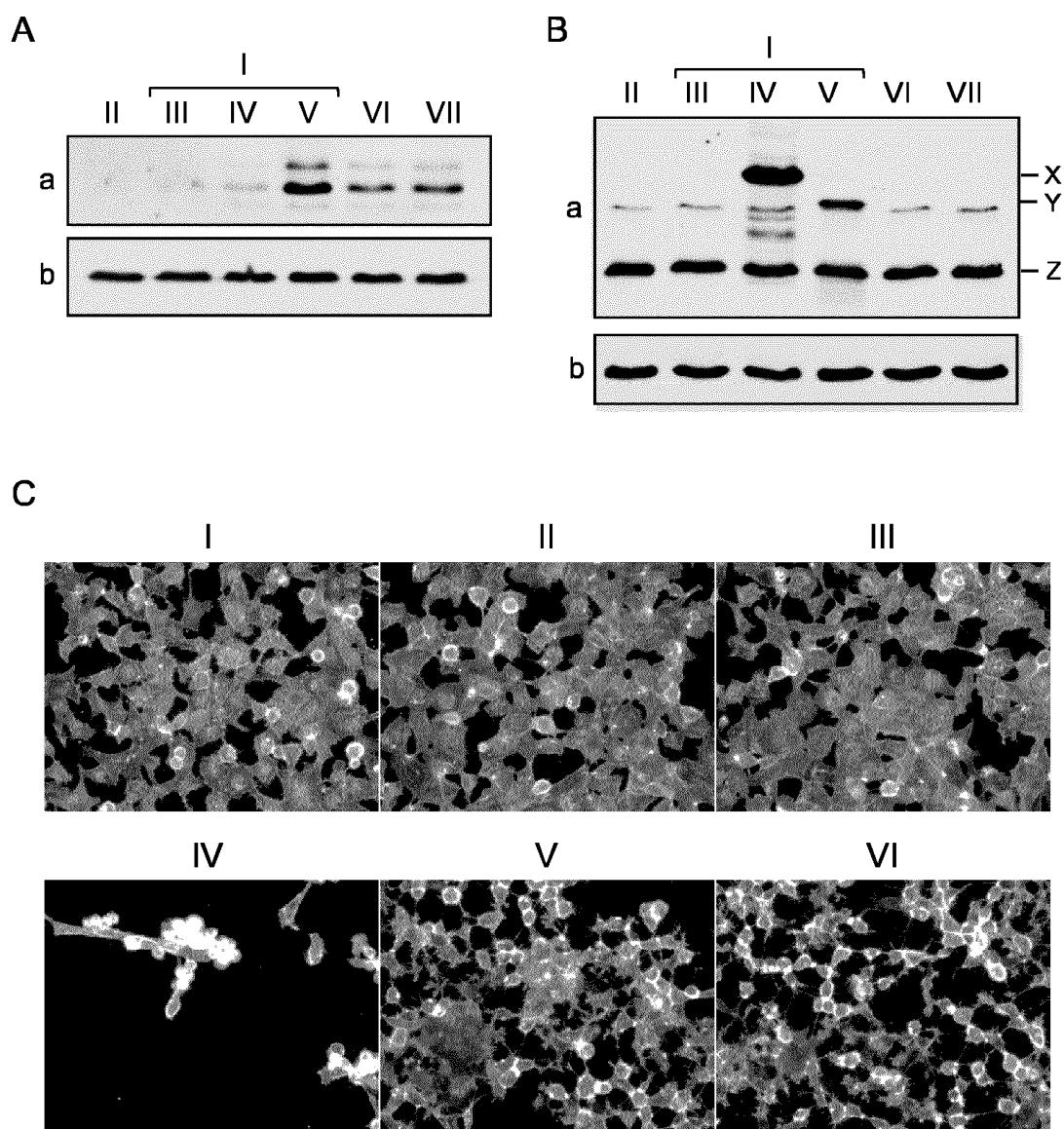


**Figura 4****A****B****C**

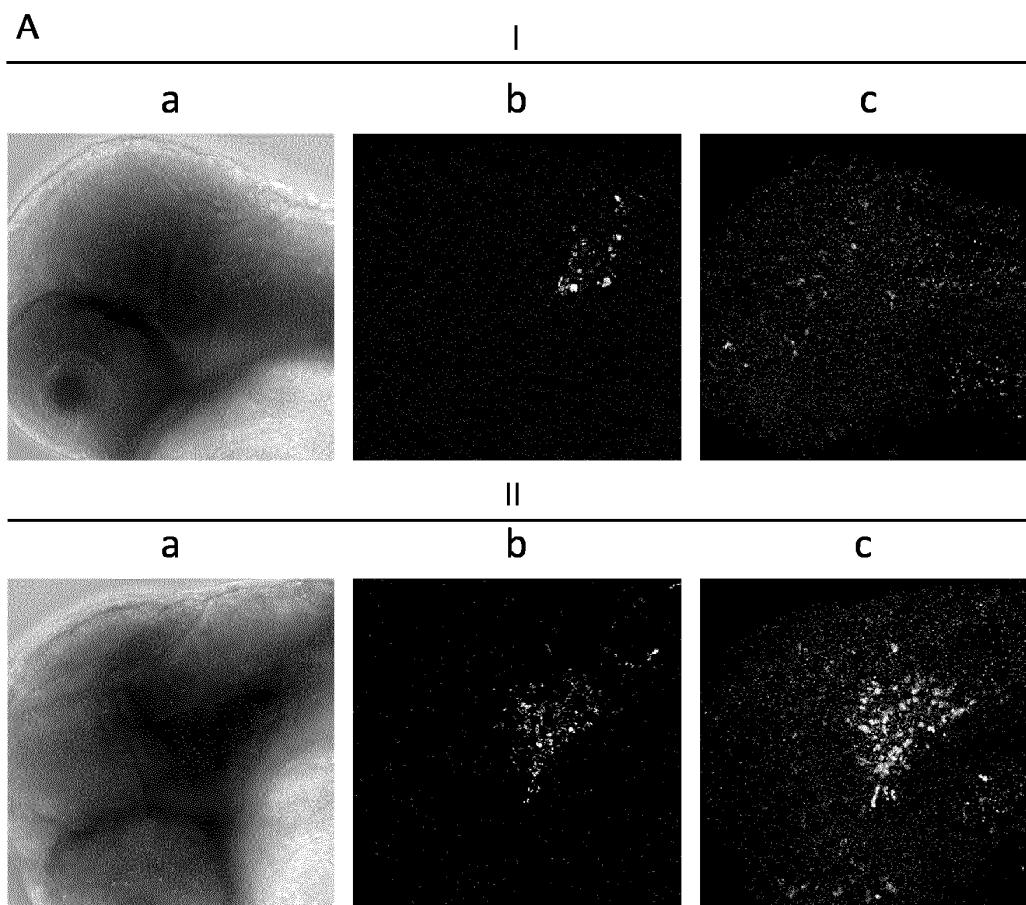
**Figura 5**

**Figura 6**

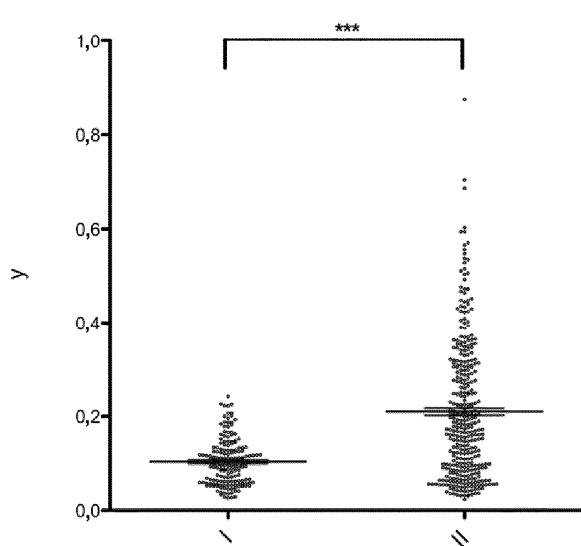
**Figura 7**



**Figura 8**

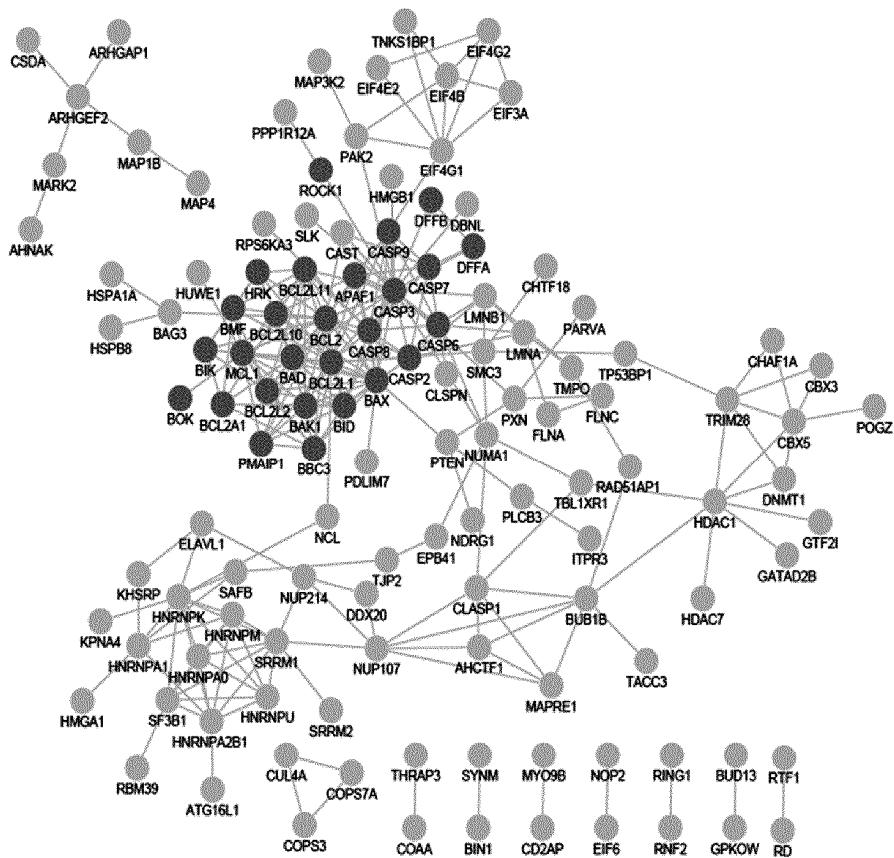


**B**



**Figura 9**

A



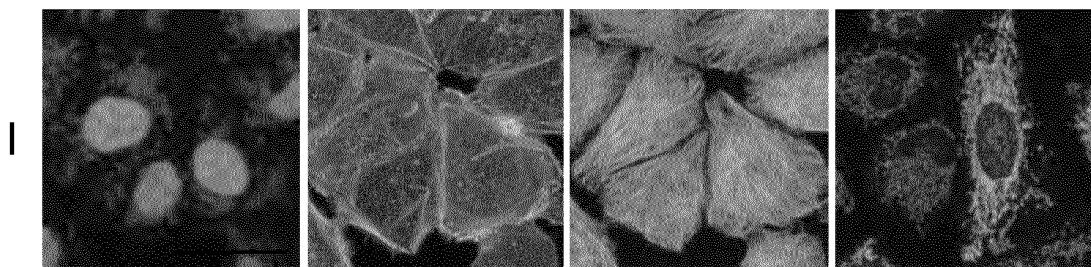
B

a

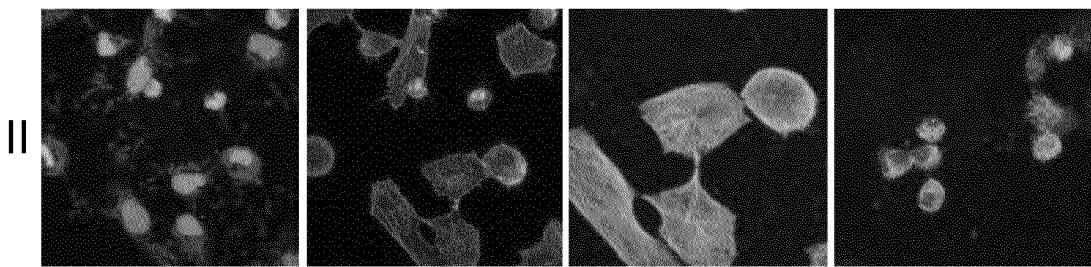
b

C

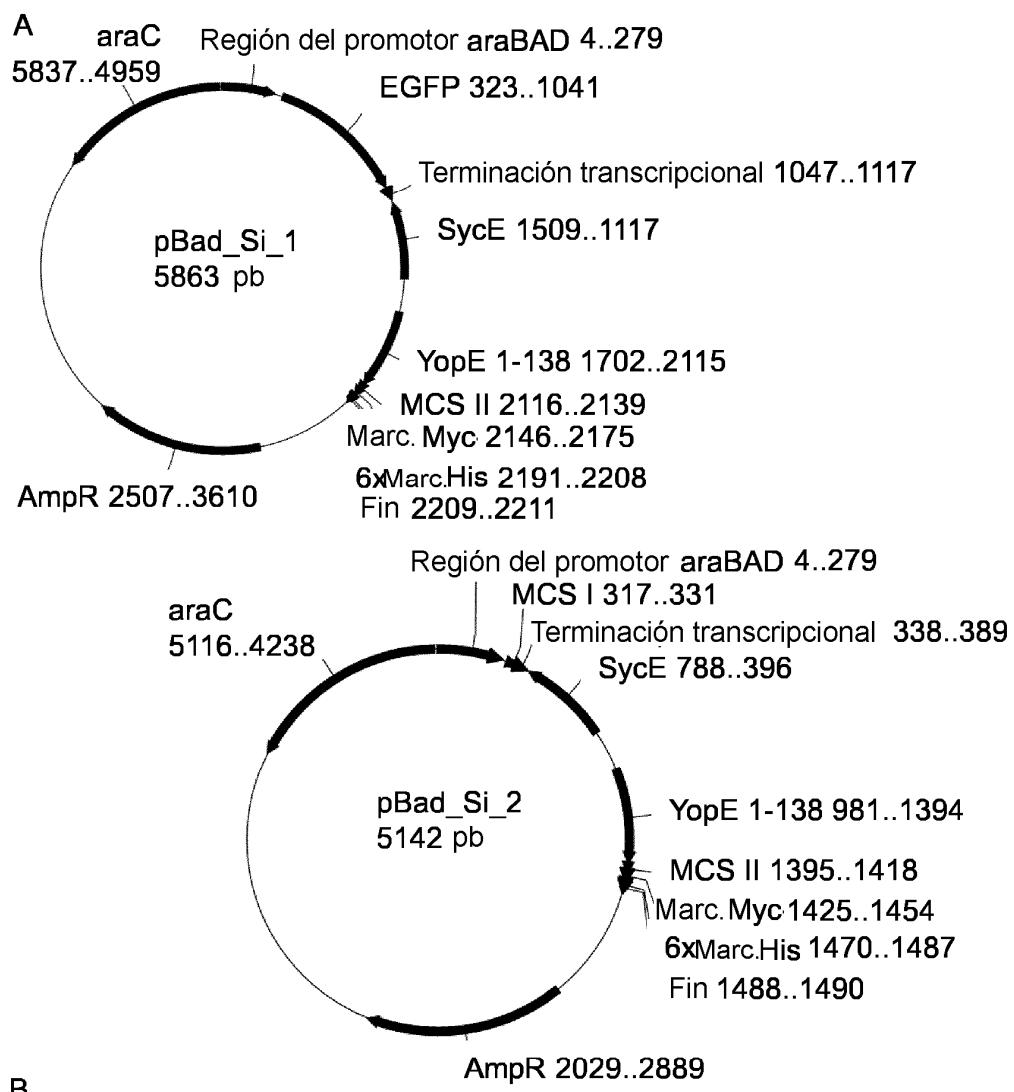
d



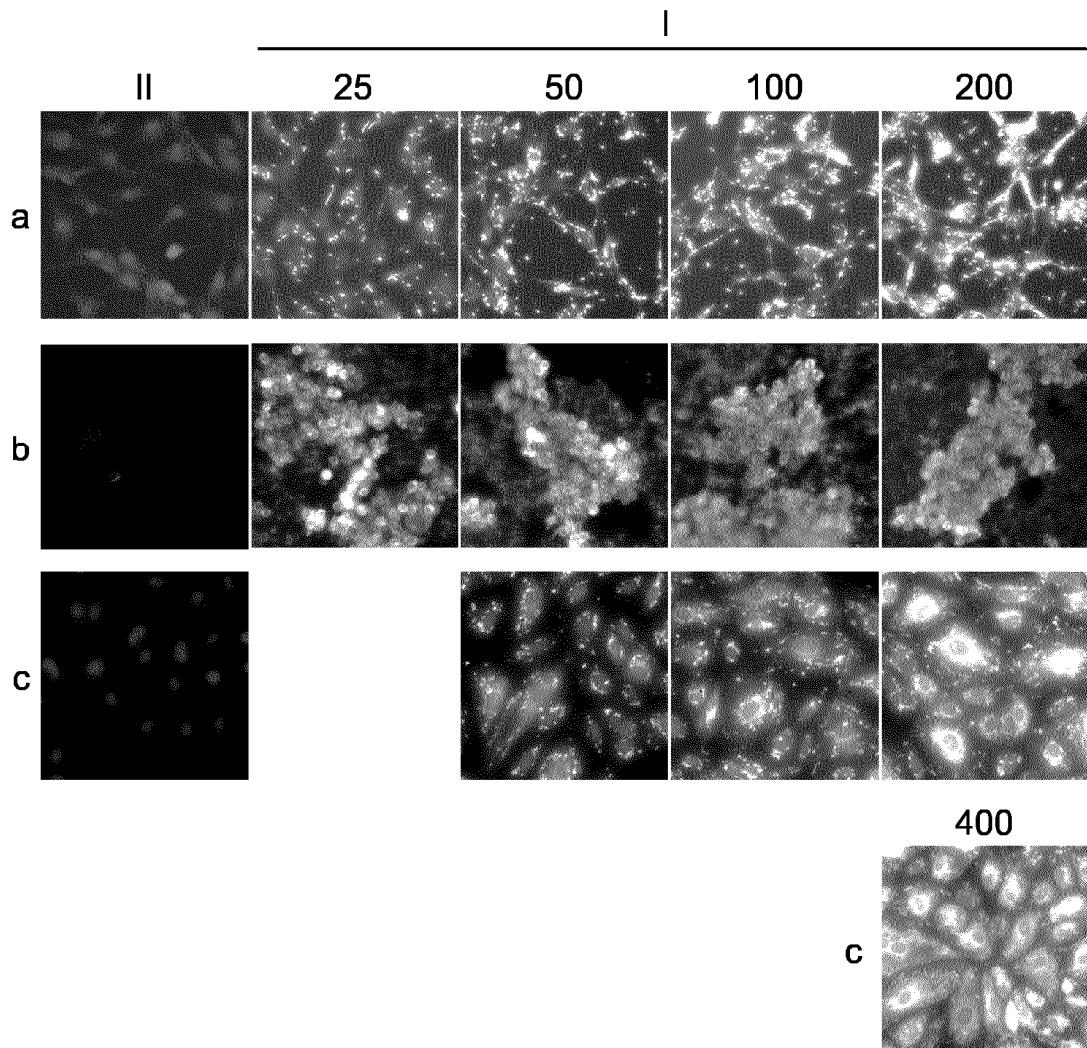
1



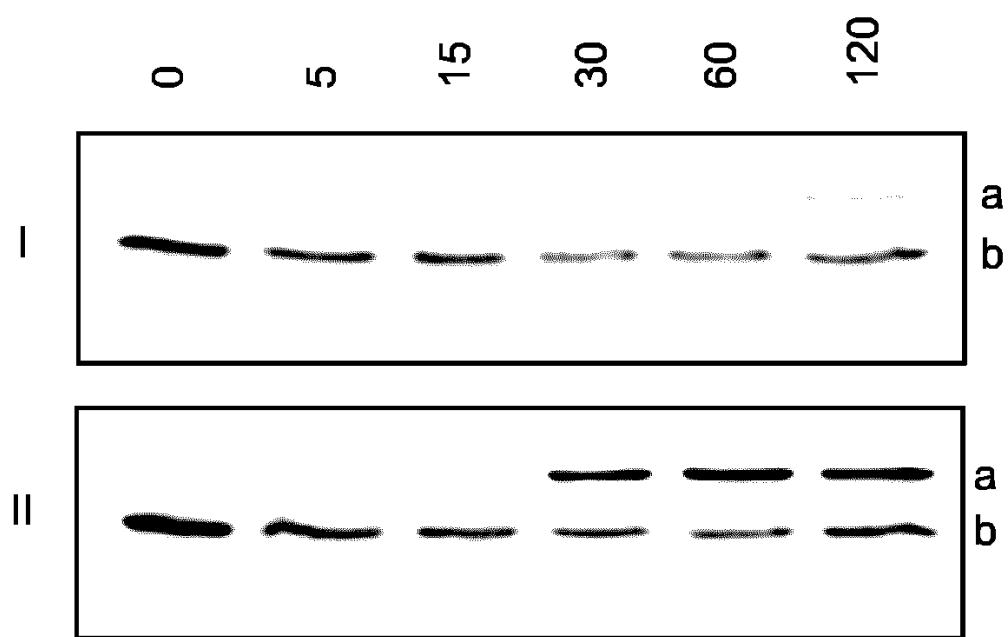
**Figura 10**

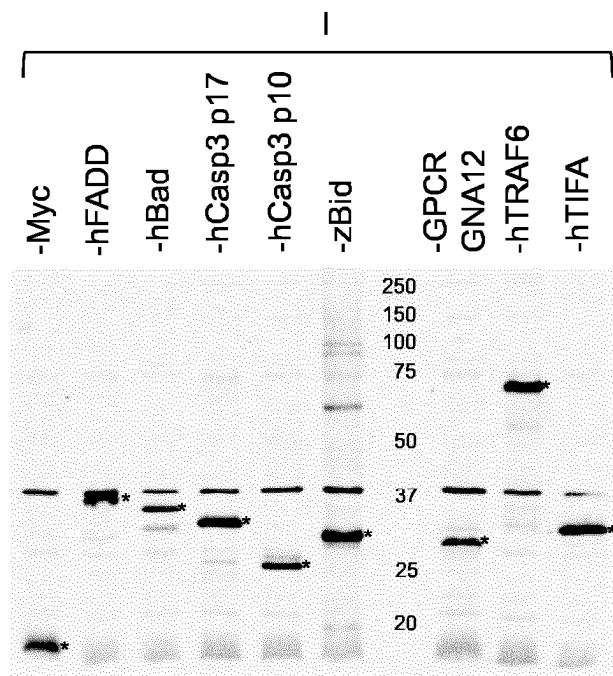
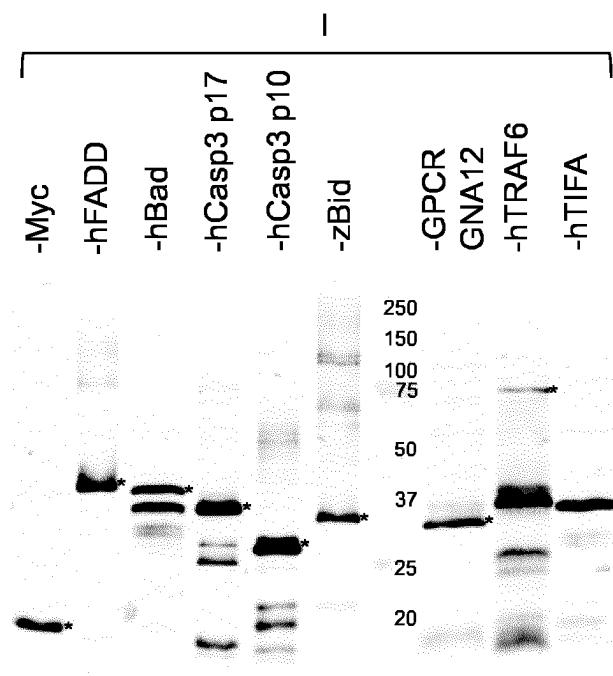


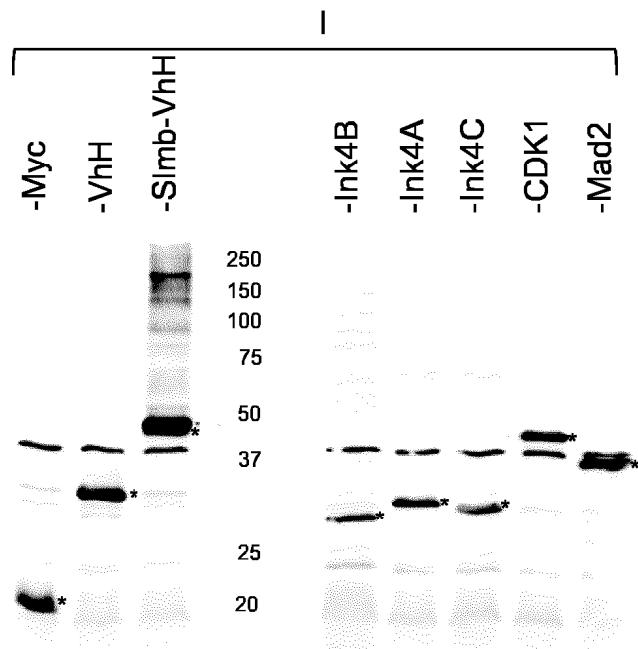
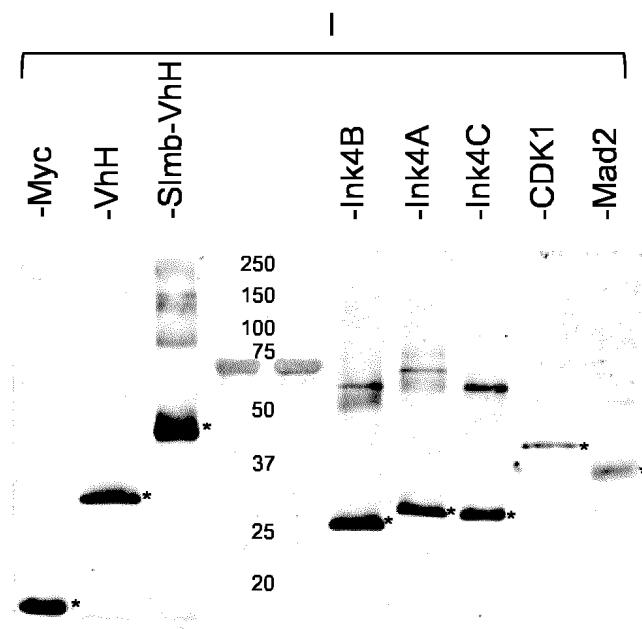
**Figura 11**



## Figura 12



**Figura 13****A****B**

**Figura 14****A****B**

**Figura 15A**

Nombre de la cepa	Cepa base	Insertión/características importantes	Proteína que va a ser transportada por T3SS	Esqueleto del plásmido	Nombre del plásmido resultante	Cebadores, SEQ NO:	Resistencias	Referencia bibliográfica
$\Delta$ HOPEMT	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T	MRS40 pIML421 [yopH $\Delta$ 1–352, yopO $\Delta$ 65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]						Iriarte y Cornelis, 1998
$\Delta$ HOPEMT asd yopB	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ yopB	MRS40 pIML421 [yopB $\Delta$ 89–217, yopH $\Delta$ 1–352, yopO $\Delta$ 65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]					Nal	Nal Kan
$\Delta$ HOPEMT asd	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd	MRS40 asd $\Delta$ 292-610 pIML421 [yopH $\Delta$ 1–352, yopO $\Delta$ 65–558, yopP23, yopE21,yopM23, yopT135]					Nal	Kudryashev et al., 2013
$\Delta$ HOPEMT asd inv	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd $\Delta$ invA	MRS40 asd $\Delta$ 292-610 invA $\Delta$ 352-2225::aphA-3 pIML421 [yopH $\Delta$ 1–352, yopO $\Delta$ 65–558, yopP23, yopE21,yopM23, yopT135]					445/446, 447/448, 449/450	Nal Kan
$\Delta$ HOPEMT asd inv yadA	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd $\Delta$ invA $\Delta$ yadA	MRS40 asd $\Delta$ 292-610 invA $\Delta$ 587-836 (vector de cointegración) yadA $\Delta$ 89–354::aphA3 pIML421 [yopH $\Delta$ 1–352, yopO $\Delta$ 65–558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]					352/353, 354/355, 356/357	Nal Kan Tet

**Figura 15B**

Nombre de la cepa	Cepa base	Insertión/características importantes	Proteína que va a ser transportada por T3SS	Esqueleto del plásmido resultante	Nombre del plásmido resultante	Cebadores, SEQ NO:	Resistencias	Referencia bibliográfica
$\Delta$ HOPEMT asd pBad_Si1	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd	EGFP (inducible por arabinosa), fragmento SycE-YopE1-138-MycHis	-	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_1	285/286 (EGFP), 287/288 (sycE-YopE1-138)	Nal Amp	
$\Delta$ HOPEMT asd pBad_Si2	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd	fragmento SycE-YopE1-138-MycHis	YopE1-138-MycHis (Invitrogen)	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_2	287/288 (sycE-YopE1-138)	Nal Amp	
$\Delta$ HOPEMT asd pSi_16	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd		YopE1-138-lpgB1	pBad_Si_2	pSi_16	292/293	Nal Amp	
$\Delta$ HOPEMT asd pSi_20	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd		YopE1-138-SopE	pBad_Si_2	pSi_20	296/297	Nal Amp	
$\Delta$ HOPEMT asd pSi_22	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd		YopE1-138-Rac1 Q61L	pBad_Si_2	pSi_22	299/300	Nal Amp	
$\Delta$ HOPEMT asd pSi_24	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd		YopE1-138-RhoA Q61E	pBad_Si_2	pSi_24	301/302	Nal Amp	

**Figura 15C**

Nombre de la cepa	Cepa base	Inserción/características importantes	Proteína que va a ser transportada por T3SS	Esqueleto del plásmido	Nombre del plásmido resultante	Cebadores, SEQ NO:	Resistencias	Referencia bibliográfica
$\Delta$ HOPEM T asd pSi_28	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd		<i>YopE1-138-SopE-MycHis</i>	pBad_Si_2	pSi_28	296/306	Nal Amp	
$\Delta$ HOPEM T yopB asd pSi_28	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ yopB $\Delta$ asd		<i>YopE1-138-SopE-MycHis</i>	pBad_Si_2	pSi_28	296/306	Nal Amp	
$\Delta$ HOPEM T asd pSi_30	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd		<i>YopE1-138-SopB</i>	pBad_Si_2	pSi_30	307/308	Nal Amp	
$\Delta$ HOPEM T asd pSi_37	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd		<i>YopE1-138-FADD</i>	pBad_Si_2	pSi_37	367/386	Nal Amp	
$\Delta$ HOPEM T asd pSi_38	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd		<i>YopE1-138-OspF</i>	pBad_Si_2	pSi_38	317/318	Nal Amp	
$\Delta$ HOPEM T asd pSi_43	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd		<i>YopE1-138-BepG 715-end</i>	pBad_Si_2	pSi_43	324/351	Nal Amp	

**Figura 15D**

Nombre de la cepa	Cepa base	Inserción/características importantes	Proteína que va a ser transportada por T3SS	Esqueleto del plásmido	Nombre del plásmido resultante	Cebadores; SEQ NO:	Resistencias	Referencia bibliográfica
ΔHOPEMT asd pSi_51	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Rac1 Q61L- MychHis	pBad_Si_2	pSi_51	299/339	Nal Amp	
ΔHOPEMT yopB asd pSi_51	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T ΔyopB Δasd		YopE1-138-Rac1 Q61L- MychHis	pBad_Si_2	pSi_51	299/339	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_53	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Slmb1- VhH4	pBad_Si_2	pSi_53	341/342	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_57	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Bad	pBad_Si_2	pSi_57	346/347	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_64	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-SptP	pBad_Si_2	pSi_64	364/365	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_70	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-NLS-Slmb1- VhH4	pBad_Si_2	pSi_70	369/342	Nal Amp	

**Figura 15E**

Nombre de la cepa	Cepa base	Inserción/características importantes	Proteína que va a ser transportada por T3SS	Esqueleto del plásmido	Nombre del plásmido resultante	Cebadores, SEQ NO:	Resistencias	Referencia bibliográfica
$\Delta$ HOPEMT asd pSi_85	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd		YopE1-138-Bid	pBad_Si_2	pSi_85	387/391	Nal Amp	
$\Delta$ HOPEMT asd pSi_87	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd		YopE1-138-t-Bid	pBad_Si_2	pSi_87	389/391	Nal Amp	
$\Delta$ HOPEMT asd pSi_97	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd		YopE1-138-p17	pBad_Si_2	pSi_97	403/406	Nal Amp	
$\Delta$ HOPEMT asd pSi_103	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd		YopE1-138-GPCR GNA12	pBad_Si_2	pSi_103	410/413	Nal Amp	
$\Delta$ HOPEMT asd pSi_106	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd		YopE1-138-Caspasa3 p10/12	pBad_Si_2	pSi_106	417/420	Nal Amp	
$\Delta$ HOPEMT asd pSi_111	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd		YopE1-138-lpgD	pBad_Si_2	pSi_111	423/424	Nal Amp	
$\Delta$ HOPEMT asd pSi_112	<i>Y. enterocolitica</i> $\Delta$ yopH,O,P,E,M,T $\Delta$ asd		YopE1-138-SlmB1-VhH4-NLS	pBad_Si_2	pSi_112	341/425	Nal Amp	

**Figura 15F**

Nombre de la cepa	Cepa base	Insertión/ características importantes	Proteína que va a ser transportada por T3SS	Esqueleto del plásmido	Nombre del plásmido resultante	Cebadores, SEQ NO:	Resistencias	Referencia; bibliográfica
ΔHOPEMT asd pSi_116	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M, T Δasd		YopE1-138-z-Bid	pBad_Si_2	pSi_116	428/430	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_117	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M, T Δasd		YopE1-138-z-t-Bid	pBad_Si_2	pSi_117	429/430	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_118	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M, T Δasd		YopE1-138-BepA E305-end	pBad_Si_2	pSi_118	433/435	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_119	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M, T Δasd		YopE1-138-BepA	pBad_Si_2	pSi_119	434/435	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_120	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M, T Δasd		YopE1-138-ET1	pBad_Si_2	pSi_120	436/437	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_121	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M, T Δasd		YopE1-138-z-BIM	pbad_Si_1	pSi_121	438/439	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_124	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M, T Δasd		YopE1-138-VhH4 nanocuerpo que reconoce pBad_Si_2 EGFP	pBad_Si_2	pSi_124	451/373	Nal Amp	

**Figura 15G**

Nombre de la cepa	Cepa base	Insertión/características importantes	Proteína que va a ser transportada por T3SS	Esqueleto del plásmido	Nombre del plásmido resultante	Cebadores, SEQ NO:	Resistencias	Referencia bibliográfica
ΔHOPEMT asd pSi_132	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M, T Δasd		YopE1-138-TEV proteasa S219V	pBad_Si_2	pSi_132	463/464	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_140	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M, T Δasd		YopE1-138-EGFP	pBad_Si_2	pSi_140	477/476	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_143	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M, T Δasd		YopE1-138-Cdk1	pBad_Si_2	pSi_143	478/479	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_145	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M, T Δasd		YopE1-138-Mad2	pBad_Si_2	pSi_145	482/483	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_147	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M, T Δasd		YopE1-138-Ink4A	pBad_Si_2	pSi_147	486/487	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_150	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M, T Δasd		YopE1-138-Ink4B	pBad_Si_2	pSi_150	492/493	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_151	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M, T Δasd		YopE1-138-Ink4C	pBad_Si_2	pSi_151	494/495	Nal Amp	

**Figura 15H**

Nombre de la cepa	Cepa base	Insertión/características importantes	Proteína que va a ser transportada por T3SS	Esqueleto del plásmido	Nombre del plásmido resultante	Cebadores, SEQ NO:	Resistencias	Ref. bibliogr
ΔHOPEMT asd pSi_153	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-TIFA	pBad_Si_2	pSi_153	558/559	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_156	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-2X sitioTEV - ET1	pBad_Si_2	pSi_156	504/505	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_159	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138- 2x sitioTEV- EGFP - NLS	pBad_Si_2	pSi_159	511/513	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_160	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138- 2x sitioTEV- NLS - EGFP	pBad_Si_2	pSi_160	512/476	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_161	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-2X sitioTEV - INK4C	pBad_Si_2	pSi_161	508/509	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_164	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-2X sitioTEV - Flag - INK4C	pBad_Si_2	pSi_164	515/509	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_166	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-murina Traf6	pBad_Si_2	pSi_166	561/562	Nal Amp	

**Figura 15|**

Nombre de la cepa	Cepa base	Inserción/ características importantes	Proteína que va a ser transportada por T3SS	Esqueleto del plásmido	Nombre del plásmido resultante	Cebadores, SEQ NO:	Resistencias	Referencia bibliográfica
ΔHOPEMT asd pSi_318	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138- parte BH3 de tBid murino con codones optimizados para <i>Y. enterocolitica</i>	pBad_Si_2	pSi_318	677/678	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_322	<i>Y. enterocolitica</i> ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138- parte BH3 de Bax murino con codones optimizados para <i>Y. enterocolitica</i>	pBad_Si_2	pSi_322	682/683	Nal Amp	
<i>S. enterica</i> SL1344 ΔaroA	<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> SL1344 ΔaroA							Hoiseth y Stocker, 1981
<i>S. enterica</i> ΔaroA pSi_266	<i>S. enterica</i> SL1344 ΔaroA		SteA1-20	pBad- MychIsA (Invitrogen)	pSi_266	580/612	Amp	
<i>S. enterica</i> ΔaroA pSi_267	<i>S. enterica</i> SL1344 ΔaroA		SteA	pBad- MychIsA (Invitrogen)	pSi_267	580/613	Amp	

**Figura 15J**

Nombre de la cepa	Cepa base	Insertión/características importantes	Proteína que va a ser transportada por T3SS	Esqueleto del plásmido	Nombre del plásmido resultante	Cebadores, SEQ NO:	Resistencias	Ref. biblio.
S. enterica ΔaroA pSi_268	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-80	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_268	614/615	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_269	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-104	pBad-MycHisA (Invitrogen)	pSi_269	614/616	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_270	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA1-20-tBid murino con codones optimizados para S. enterica	pSi_266	pSi_270	construcción sintética	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_271	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA-tBid murino con codones optimizados para S. enterica	pSi_267	pSi_271	construcción sintética	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_272	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-80-tBid murino con codones optimizados para S. enterica	pSi_268	pSi_272	construcción sintética	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_273	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-104-tBid murino con codones optimizados para S. enterica	pSi_269	pSi_273	construcción sintética	Amp	

**Figura 15K**

Nombre de la cepa	Cepa base	Inserción/características importantes	Proteína que va a ser transportada por T3SS	Esqueleto del plásmido	Nombre del plásmido resultante	Cebadores, SEQ NO:	Resistencias	Ref. biblio.
ΔHOPEMT asd pSi_362	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Ink4A 84-103 con codones optimizados para Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_362	745/746	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_363	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-peptido inhibidor de ciclina I/Cdk2 con codones optimizados para Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_363	747/748	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_364	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-p21 de péptido 10 (DtoA) con codones optimizados para Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_364	749/750	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_366	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-centro p21 de péptido 10 y 11 con codones optimizados para Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_366	753/754	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_367	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-p21 de péptido 17-33 con codones optimizados para Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_367	755/756	Nal Amp	

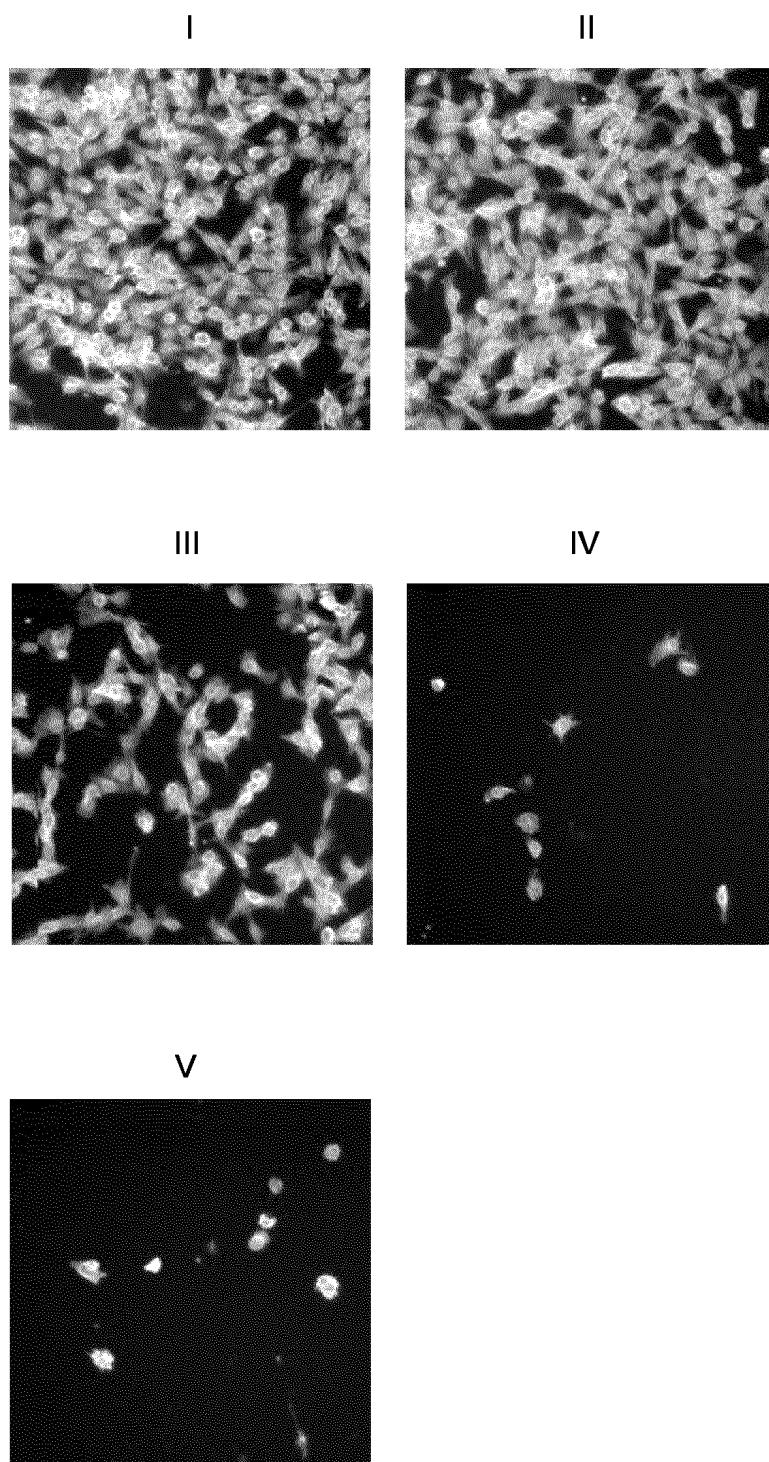
**Figura 15L**

Nombre de la cepa	Cepa base	Insertión/características importantes	Proteína que va a ser transportada por T3SS	Esqueleto del plásmido	Nombre del plásmido resultante	Cebadores, SEQ NO:	Resistencias	Ref. biblio.
ΔHOPEMT asd pSi_368	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-peps de G1/S ciclina D2 con codones optimizados para Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_368	757/758	Nal Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_333	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA-Ink4a-MycHis	pSi_267	pSi_333	703/704	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_334	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-104-Ink4a-MycHis	pSi_269	pSi_334	703/704	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_335	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA-Ink4c-MycHis	pSi_267	pSi_335	705/706; 707/708;	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_336	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-104-Ink4c-MycHis	pSi_269	pSi_336	705/706; 707/708;	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_337	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA-Mad2-MycHis	pSi_267	pSi_337	709/710	Amp	

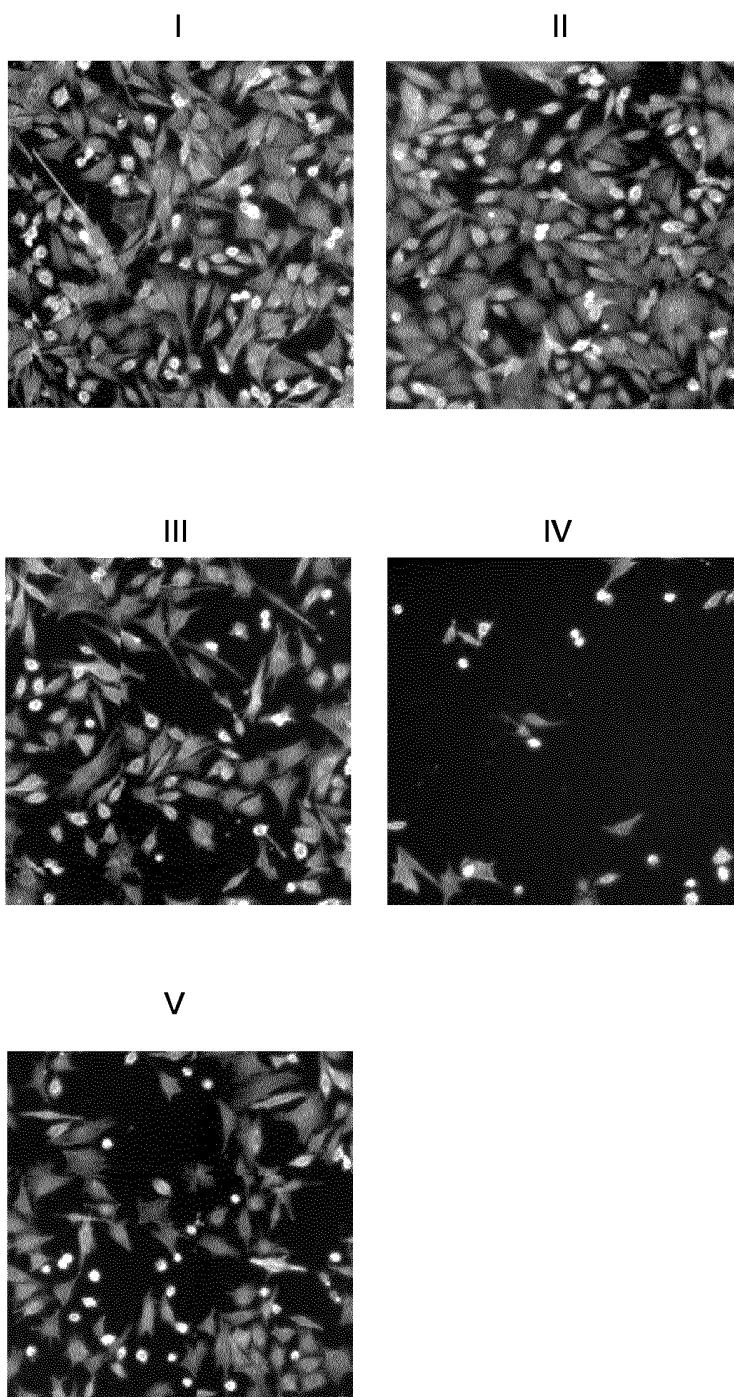
**Figura 15M**

Nombre de la cepa	Cepa base	Inserción/características importantes	Proteína que va a ser transportada por T3SS	Esqueleto del plásmido	Nombre del plásmido resultante	Cebadores, SEQ NO:	Resistencias	Ref. biblio.
S. enterica ΔaroA pSi_338	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-104-Mad2-MycHis	pSi_269	pSi_338	709/710	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_339	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA-Cdk1-MycHis	pSi_267	pSi_339	711/712	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_340	S. enterica SL1344 ΔaroA		SopE1-104-Cdk1-MycHis	pSi_269	pSi_340	711/712	Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_315	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-tBld murino con codones optimizados para Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_315	construcción sintética	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_236	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Ubiquitina	pBad_Si_2	pSi_236	585/586	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_237_II	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Ubiquitina-Flag-INK4C-MycHis	pSi_236	pSi_237_II	588/509	Nal Amp	

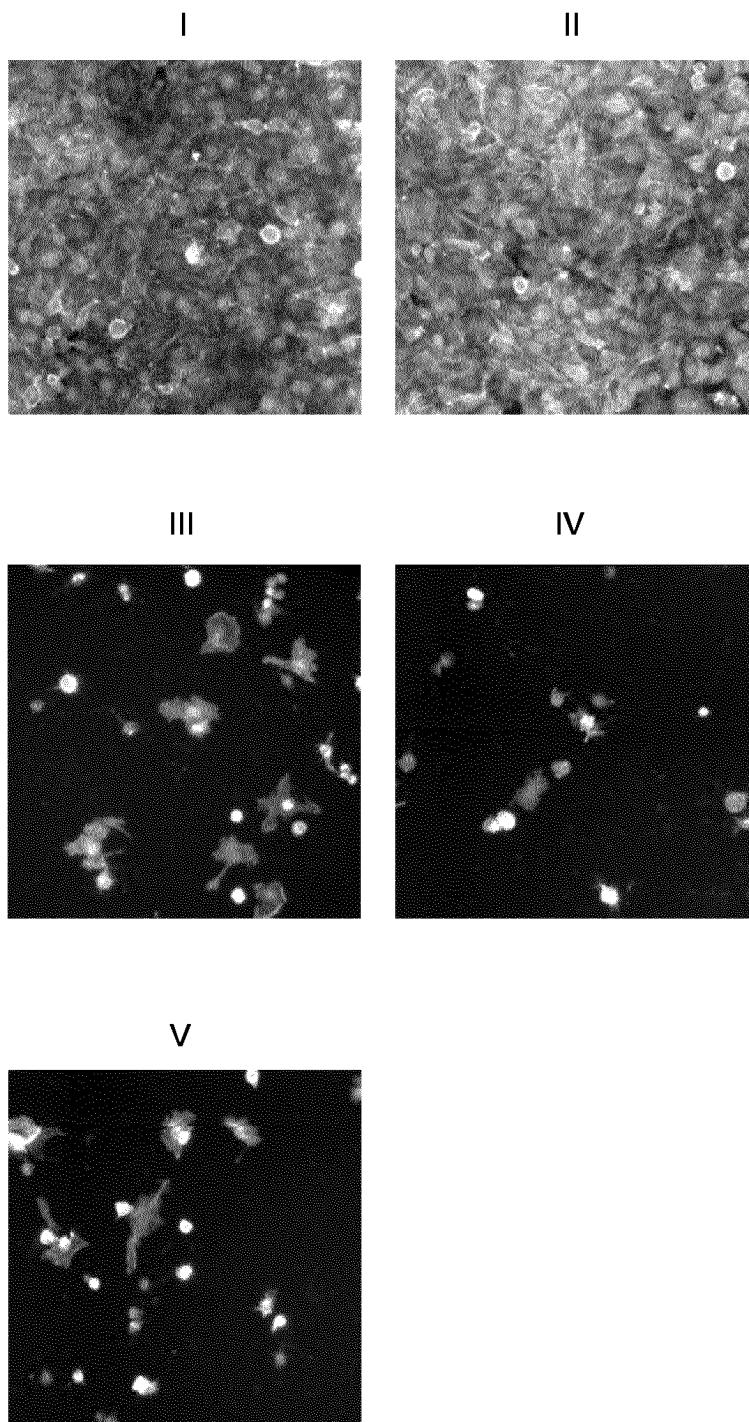
**Figura 16**



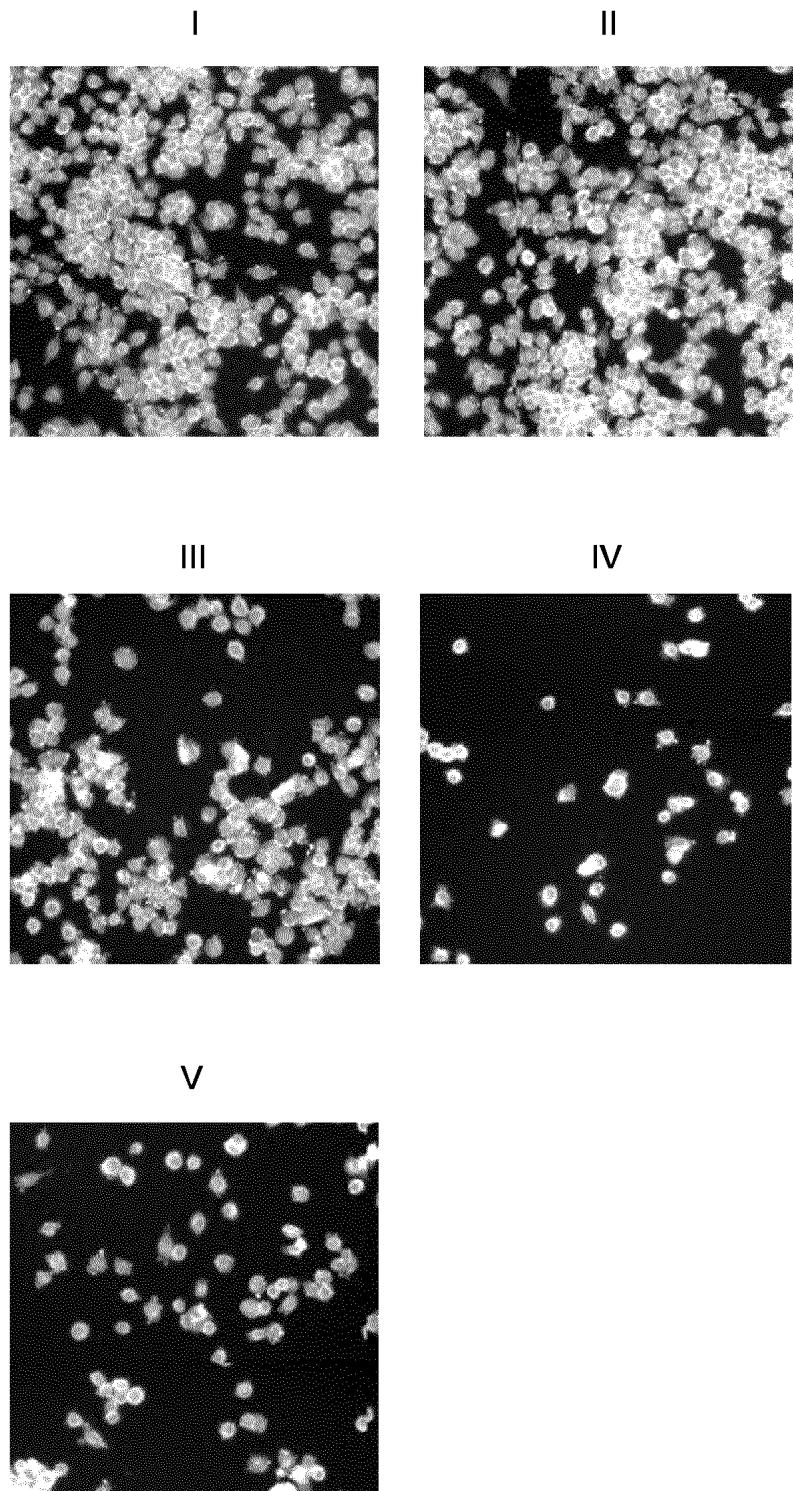
**Figura 17**



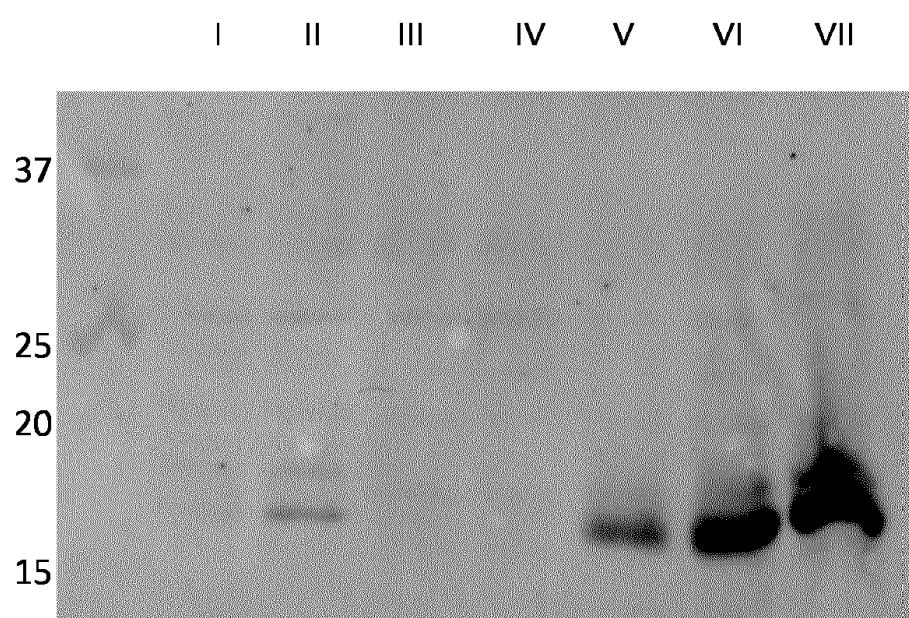
**Figura 18**



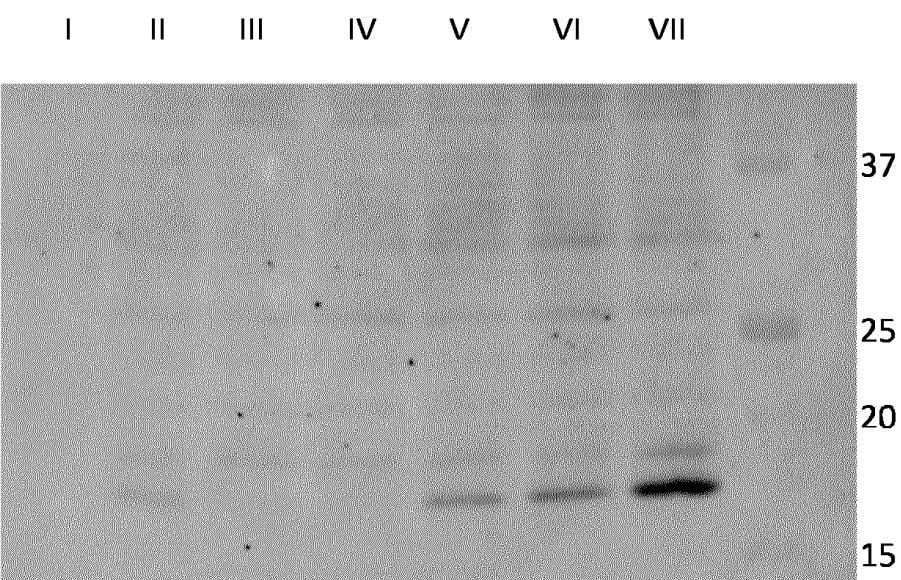
**Figura 19**



## Figura 20

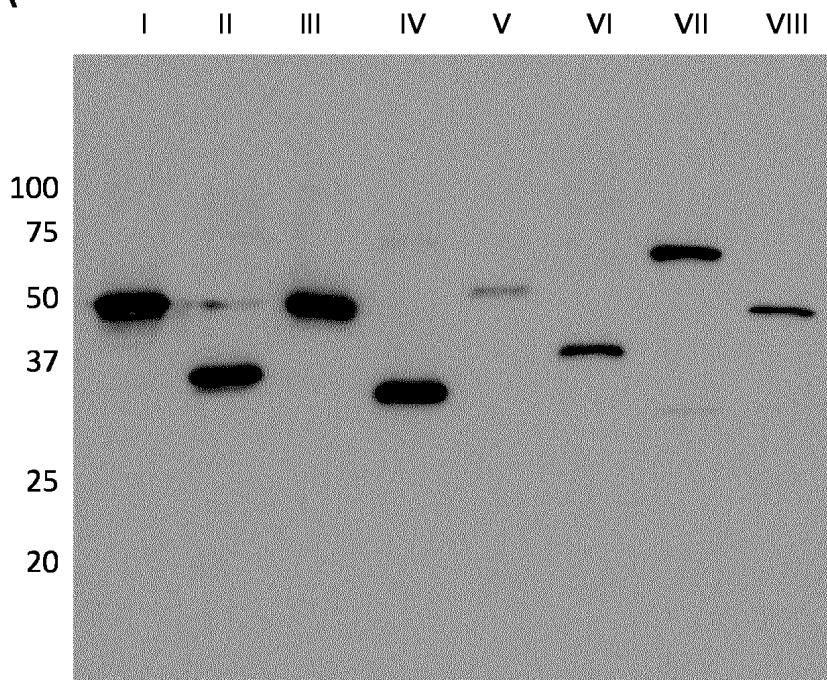


## Figura 21

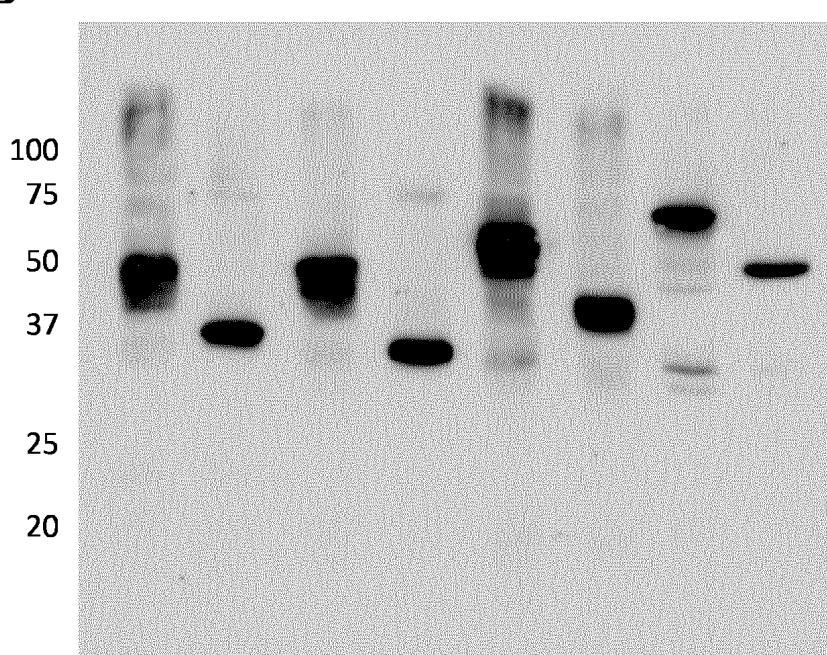


**Figura 22**

A

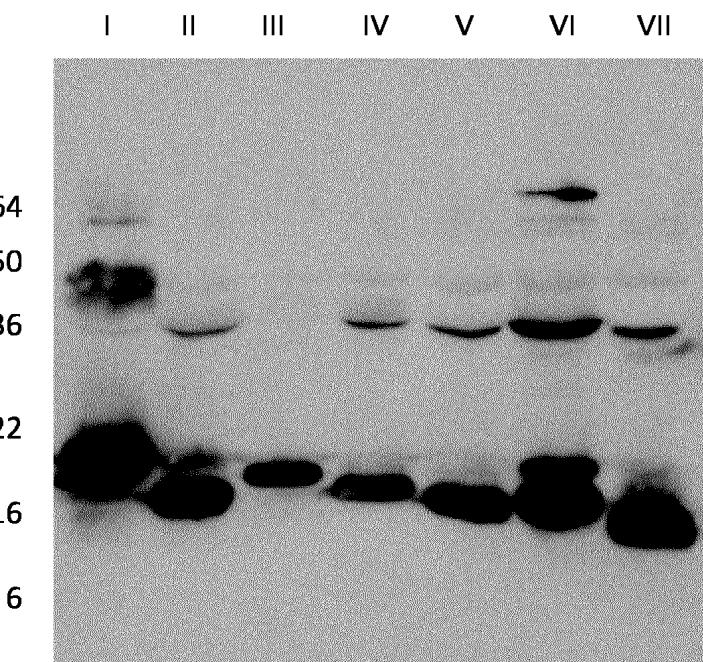


B

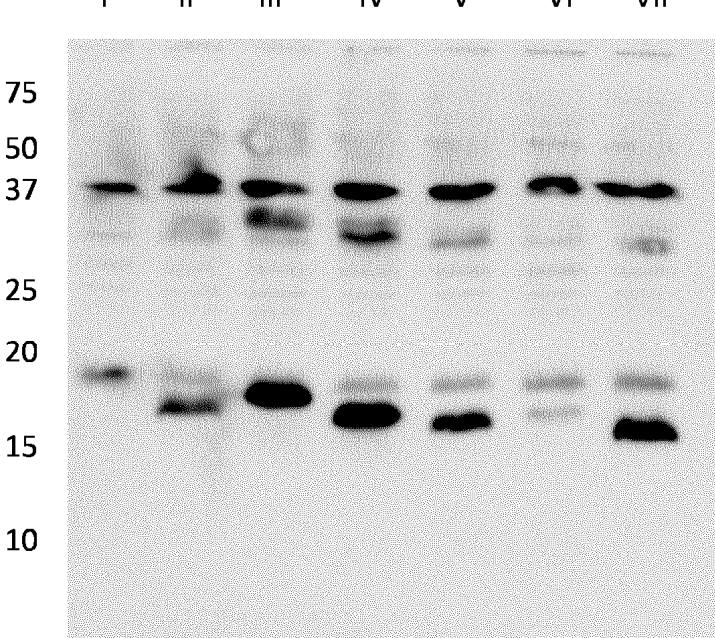


## Figura 23

A



B



## Figura 24

