

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 proteofección 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 T3SS 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 ciclasa 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
15 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.

25 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':

un promotor;

30 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

35 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.

40 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':

un promotor;

45 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

50 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.

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 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.

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

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;

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

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 segrega hacia el sobrenadante del cultivo.

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

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 translocadas 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 YopE₁₋₁₃₈ (V). (B) Secreción *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.

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 YopE₁₋₁₃₈ (EGFP). Señal de EGFP en células HeLa infectadas con I: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd*, o II: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* Δ*yopB* que porta los plásmidos. III: +YopE₁₋₁₃₈-EGFP o IV: +YopE₁₋₁₃₈-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 YopE₁₋₁₃₈. 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 YopE₁₋₁₃₈, mientras que la otra cepa transporta una proteína interés condensada con YopE₁₋₁₃₈ 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 escindiría el apéndice YopE₁₋₁₃₈ 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: +pBadSi₂, IV: +YopE₁₋₁₃₈-2×sitio de ruptura de TEV-Flag-INK4C, V: +YopE₁₋₁₃₈-2×sitio de ruptura de TEV-Flag-INK4C y también un tratamiento durante la noche con proteasa de TEV purificada, y VI: +YopE₁₋₁₃₈-2×sitio de ruptura de TEV-Flag-INK4C y una segunda cepa + YopE₁₋₁₃₈-TEV se analizaron mediante transferencia Western anti-INK4C (mostrado en "a") para detectar la presencia de YopE₁₋₁₃₈-2×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 YopE₁₋₁₃₈-2×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: +YopE₁₋₁₃₈-2×sitio de ruptura de TEV-Flag-INK4C, V: +YopE₁₋₁₃₈-2×sitio de ruptura de TEV-Flag-INK4C y también un tratamiento durante la noche con proteasa de TEV purificada, y VI: +YopE₁₋₁₃₈-2×sitio de ruptura de TEV-Flag-INK4C y una segunda cepa + YopE₁₋₁₃₈-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: +pBadSi₂, IV: +YopE₁₋₁₃₈-2×sitio de ruptura de TEV-ET1-Myc, V: +YopE₁₋₁₃₈-2×sitio de ruptura de TEV-ET1-Myc y también un tratamiento durante la noche con proteasa de TEV purificada, y VI: +YopE₁₋₁₃₈-2×sitio de ruptura de TEV-ET1-Myc y una segunda cepa + YopE₁₋₁₃₈-TEV se analizaron mediante transferencia Western anti-Myc (mostrado en "a") para detectar la presencia de YopE₁₋₁₃₈-2×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: YopE₁₋₁₃₈-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: YopE₁₋₁₃₈-SopE-Myc, y en algunos casos se coinfectaron con IV: YopE₁₋₁₃₈-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 YopE₁₋₁₃₈-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: YopE₁₋₁₃₈-OspF a una MOI de 100. Las células se estimulaban 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: YopE₁₋₁₃₈-SopE o V: YopE₁₋₁₃₈-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* + YopE₁₋₁₃₈-BepA, VI: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* + YopE₁₋₁₃₈-BepA_{E305-end}, VII: *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* + YopE₁₋₁₃₈-BepG_{Bid} 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: YopE₁₋₁₃₈-Bid o V: YopE₁₋₁₃₈-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: YopE₁₋₁₃₈-Bid o V: YopE₁₋₁₃₈-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 YopE₁₋₁₃₈-Bid translocado (marcado como X) o YopE₁₋₁₃₈-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: estaurosporina 0,5 μ M, o VII: estaurosporina 1 μ M. (C) Células HeLa no tratadas (I) o infectadas a una MOI de 100 durante 1 h con II: *Y. enterocolitica* Δ HOPEMT *asd* + pBad_Si2, III: *Y. enterocolitica* Δ HOPEMT *asd* + YopE₁₋₁₃₈-Bid, IV: *Y. enterocolitica* Δ HOPEMT *asd* + YopE₁₋₁₃₈-tBid. En algunos casos, las células se trataron con V: VI: estaurosporina 0,5 μ M, o VI: estaurosporina 1 μ 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* Δ HOPEMT *asd* + pBad_Si1 que expresa EGFP (I) o la cepa que transloca zBIM (II: *Y. enterocolitica* Δ HOPEMT *asd* + YopE₁₋₁₃₈-zBIM) mediante la inyección de aproximadamente 400 bacterias en la región del rombencéfalo. Después de 5,5 h los embriones se 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 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 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* Δ HOPEMT *asd* + pBad_Si1 (I), o $n = 19$ para II: *Y. enterocolitica* Δ HOPEMT *asd* + YopE₁₋₁₃₈-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* Δ HOPEMT *asd* + YopE₁₋₁₃₈-t-Bid a una MOI de 100, y como control con *Y. enterocolitica* Δ HOPEMT *asd* + pBad_Si2. (A) Representación gráfica del fosfoproteoma de tBid. Las proteínas que contienen fosfopéptidos 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* Δ HOPEMT *asd* + pBad_Si2 (I) o con *Y. enterocolitica* Δ HOPEMT *asd* + YopE₁₋₁₃₈-t-Bid (II) revelan la 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 μ 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 YopE₁₋₁₃₈. La chaperona SycE y la fusión YopE₁₋₁₃₈ están bajo el promotor nativo *Y. enterocolitica*. Los dos plásmidos solo se diferencian por la presencia de un EGFP inducible por arabinosa presente en pBad_Si1. (B) Sitio de clonación múltiple directamente detrás del fragmento YopE₁₋₁₃₈ 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 (II) o infectados con *Y. enterocolitica* Δ 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* Δ HOPEMT *asd* Δ yopB+YopE₁₋₁₃₈-SopE-Myc (I) o *Y. enterocolitica* Δ HOPEMT *asd* + YopE₁₋₁₃₈-SopE-Myc (II) fueron analizadas mediante transferencia Western anti-Myc. El tamaño que se corresponde con YopE₁₋₁₃₈-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* Δ HOPEMT *asd* + YopE₁₋₁₃₈ condensado a la proteína como 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 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: +YopE₁₋₁₃₈- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para tBid murina, IV: +YopE₁₋₁₃₈- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para Bid BH3 murina, o V: +YopE₁₋₁₃₈- *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).

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: +YopE₁₋₁₃₈- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para tBid murina, IV: +YopE₁₋₁₃₈- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para Bid BH3 murina, o V: +YopE₁₋₁₃₈- *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).

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: +YopE₁₋₁₃₈- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para tBid murina, IV: +YopE₁₋₁₃₈- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para Bid BH3 murina, o V: +YopE₁₋₁₃₈- *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).

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: +YopE₁₋₁₃₈- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para tBid murina, IV: +YopE₁₋₁₃₈- *Y. enterocolitica* con codones optimizados para Bid BH3 murina, o V: +YopE₁₋₁₃₈- *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).

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: SteA₁₋₂₀-t-Bid, V: SteA_{FL}-Bid, VI: SopE₁₋₈₁-t-Bid o VII: SopE₁₋₁₀₅-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: estaurosporina 1 μM. Los números escritos indican el peso molecular en kDa a la correspondiente altura.

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: SteA₁₋₂₀-t-Bid, V: SteA_{FL}-Bid, VI: SopE₁₋₈₁-t-Bid o VII: SopE₁₋₁₀₅-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: estaurosporina 1 μM. Los números escritos indican el peso molecular en kDa a la correspondiente altura.

Figura 22: Secreción 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_{FL} (I, III, V, VII) o SopE₁₋₁₀₅ (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.

Figura 23: Secreción 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* + YopE₁₋₁₃₈ condensado a los péptidos listados a continuación: II: Ink4A₈₄₋₁₀₃; III: p107/RBL1₆₅₇₋₆₆₂; IV: p21_{141-160D149A}; V: p21_{145-160D149A}; VI: p21₁₁₇₋₃₃; VII: ciclina D2₁₃₉₋₁₄₇. 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.

Figura 24: La fusión de la proteína transportada por T3SS a la ubiquitina permite la retirada del apéndice YopE₁₋₁₃₈. Se infectaron células HeLa con una cepa que transporta una proteína de interés condensada a YopE₁₋₁₃₈ con una ubiquitina directamente condensada (YopE₁₋₁₃₈-Ubi). Después del transporte de la proteína al interior de la célula eucariota, las proteasas específicas de ubiquitina endógenas escindirán el apéndice YopE₁₋₁₃₈-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* + YopE₁₋₁₃₈-Flag-INK4C-MycHis, o III: +YopE₁₋₁₃₈-Flag-Ubiquitina-INK4C-MycHis mediante transferencia Western anti-INK4C para la presencia de IV: YopE₁₋₁₃₈-Flag-Ubiquitina-INK4C-MycHis, o V: YopE₁₋₁₃₈-Flag-INK4C-MycHis, la forma escindida VI: INK4C-MycHis, y VII: la INK4C endógena.

Descripción detallada de la invención

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 trachomatis*, *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*, *Photobacterium luminescens*, *Photobacterium 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*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio azureus*, *Vibrio campellii*, *Vibrio caribbenthicus*, *Vibrio harvey*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio tasmaniensis*, *Vibrio tubiashii*, *Xanthomonas axonopodis*, *Xanthomonas campestris*, *Xanthomonas oryzae*, *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 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 (Δ asd). Este mutante auxótrofo 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 fimbrias. Las adhesinas fimbrias 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 fimbrias 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 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 β -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.

- 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. Además de ser oxidasas negativos, todos los miembros de esta familia son fermentadores de glucosa y la mayoría son reductores de nitrato.

- 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 hermannii*, *Escherichia vulneris*, *Salmonella enterica*, *Salmonella bongori*, *Shigella*

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*, *Photobacterium*, *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*.

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*.

Un “promotor”, tal como se emplea en la presente, se refiere a 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.

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.

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.

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”.

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, PipB, 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, SrfJ, Sse, SseB, SseC, SseD, SseF, SseG,

SseI/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 Genbank (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 implicada 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, Erkl/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 prosupervivencia. 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
- 10 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, 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
- 15 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.

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

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 enteroquinas (cadena ligera),
- 50 enteropeptidasa, proteasa PreScission, proteasa del rinovirus humano (HRV 3C), proteasa de TEV, proteasa de TVMV, proteasa de factorXa y trombina.

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

- Asp-Asp-Asp-Asp-Lys: enteroquina (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.

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, deleciones, inserciones y truncamientos.

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).

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).

30 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 AclI, HindIII, SspI, MluCI, Tsp509I, PciI, AgeI, BspMI, BfuAI, SexAI, MluI, BceAI, HpyCH4IV, HpyCH4III, BaeI, BsaXI, AflIII, SpeI, BsrI, BmrI, BglII, AfeI, AluI, StuI, Scal, ClaI, BspDI, P1-SceI, NsiI, AseI, SwaI, CspCI, MfeI, BssSI, BmgBI, PmlI, DraIII, AelI, EcoP 151, PvuII, AlwNI, BtsIMutI, TspRI, NdeI, NlaIII, CviAI, FatI, MsiI, FspEI, XcmI, BstXI, PfiMI, BccI, NcoI, BseYI, FaeI, SmaI, XmaI, TspMI, Nt.CviPII, LpnPI, AclI, SacII, BsrBI, MspI, HpaII, ScrFI, BssKI, StyD4I, BsaJI, BsiI, BtgI, NciI, AvrII, MnlI, BbvCI, Nb.BbvCI, Nt.BbvCI, SbfI, Bpu10I, Bsu36I, EcoNI, HpyAV, BstNI, PspGI, Styl, BcgI, PvuI, BstUI, EagI, RsrI, BsiEI, BsiWI, BsmBI, Hpy99I, MspAII, MspJI, SgrAI, BfaI, BspCNI, XhoI, EarI, AclI, BpmI, BpmI, Ddel, SfiI, AflII, BpuEI, SmlI, Aval, BsoBI, MbolI, BbsI, XmnI, BsmI, Nb.BsmI, EcoRI, HgaI, AatII, ZraI, Tth111I PfiFI, PshAI, AhdI, DrdI, Eco53kI, SacI, BseRI, PfuI, Nt.BstNBI, MlyI, HinfI, EcoRV, MboI, Sau3AI, DpnII BfuCI, DpnI, BsaBI, TfiI, BsrDI, Nb.BsrDI, BbvI, BtsI, Nb.BtsI, BstAPI, SfaNI, SphI, NmeAIII, NaeI, NgoMIV, BglI, AsiSI, BtgZI, HinPI, HhaI, BssHII, NotI, Fnu4HI, Cac8I, MwoI, NheI, BmtI, SapI, BspQI, Nt.BspQI, BplI, TseI, ApeKI, Bsp1286I, AlwI, Nt.AlwI, BamHI, FokI, BtsCI, HaeIII, PfuI, FseI, SfiI, NarI, KsiI, SfoI, PfuTI, AscI, EclI, BsmFI, ApaI, PspOMI, Sau961, NlaIV, KpnI, Acc65I, BsaI, HphI, BstEII, AuaI, BanI, BaeGI, BsaHI, BanII, RsaI, CviQI, BstZ17I, BciVI, Sall, Nt.BsmAI, BsmAI, BcoDI, ApaLI, BsgI, AccI, HpyI66II, Tsp45I, HpaI, PmeI, HincII, BsiHKAII, ApsI, NspI, BsrFI, BstYI, HaeII, CviKI-1, EcoO109I, PpuMI, I-CeuI, SnaBI, I-SceI, BspHI, BspEI, MmeI, TaqI, NruI, Hpy188I, Hpy188III, XbaI, BclI, HpyCH4V, FspI, P1-PspI, MscI, BsrGI, MseI, PacI, PstI, BstBI, DraI, PspXI, BsaWI, BsaAI, EaeI, preferiblemente XhoI, XbaI, HindIII, NcoI, NotI, EcoRI, EcoRV, BamHI, NheI, SacI, 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.

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 deleción 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 YopE₁₋₁₃₈ 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 SopE₁₋₈₁ o SopE₁₋₁₀₅, 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 YopE₁₋₁₃₈ 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 mutante, por ejemplo, una cepa de *Yersinia* mutante, puede generarse introduciendo al menos una mutación en al menos un gen que codifica un efector. 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, SseI/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].

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

La mutación también puede generarse en la región codificadora de un gen que codifica un efector, 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 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 mutación preferida es una mutación de desplazamiento de marco en un gen que codifica un efector, 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.

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 bacteriana Gram-negativa para producir un polimutante, por ejemplo, una cepa recombinante mutante séxtuple. 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 séxtuples, 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 séxtuple, 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 séxtuple se denomina $\Delta yopH, O, P, E, M, T$ para *Y. enterocolitica*. Como ejemplo, dicho mutante séxtuple puede producirse a partir de la cepa de *Y. enterocolitica* MRS40 para producir *Y. enterocolitica* MRS40 $\Delta yopH, O, P, E, M, T$, 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;

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.

5 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-YopE₁₋₁₃₈ 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 NcoI/BglII de pBad-MycHisA mediante digestión, tratamiento con fragmento de Klenow y reacoplamiento. Además, en el extremo 3' de YopE₁₋₁₃₈ se añadieron los siguientes sitios de ruptura: XbaI-XhoI-BstBI-(HindIII). pBad_Si1 es igual que pBad_Si2, pero codifica EGFP amplificada a partir de pEGFP-C1 (Clontech) en el sitio NcoI/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 SteA₁₋₂₀ (pSi_266), la secuencia SteA de longitud completa (pSi_267), el fragmento SopE₁₋₈₁ (pSi_268) o el fragmento SopE₁₋₁₀₅ (pSi_269) se amplificaron a partir del ADN genómico de *S. enterica* SL1344 y se clonaron en el sitio NcoI/KpnI de pBad-MycHisA (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 efector 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.

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 efector 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.

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 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.

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.

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.

En una realización de la presente invención, el vector comprende otra secuencia de ADN que codifica una molécula marcadora o un sitio aceptor para una molécula marcadora. Esta otra secuencia de ADN que codifica una molécula marcadora o un sitio aceptor 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 aceptor para una molécula marcadora preferidos se seleccionan del grupo que consiste en proteína fluorescente verde potenciada (EGFP), cumarina, sitio aceptor de cumarina ligasa, resorrufigina, sitio aceptor de resorrufigina ligasa, el motivo de tetra-cisteína, usados con el tinte FIAsh/ReAsH (Life Technologies). Los más preferidos son resorrufigina y un sitio aceptor de resorrufigina ligasa o EGFP. El uso de una molécula marcadora o un sitio aceptor 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.

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 XhoI, XbaI, HindIII, NcoI, NotI, EcoRI, EcoRV, BamHI, NheI, SacI, Sall, BstBI. Las más preferidas son XbaI, XhoI, 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 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
 10 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^{++} , 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 segrega hacia el sobrenadante del cultivo. La proteína de fusión expresada 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.
 30

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 segrega hacia el sobrenadante del cultivo;
 35

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:

40 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 segrega 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:

45 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 segrega hacia el sobrenadante del cultivo;

50 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 segrega

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.

- 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.

- 25 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 segrega 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 estreptomycin 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 delecionada 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* SmlO 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. Después se usó sacarosa para seleccionar los clones que habían perdido el vector. Por último, los mutantes se identificaron mediante PCR de colonias.

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-YopE₁₋₁₃₈ 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 NcoI/BglII de pBad-MycHisA mediante digestión, tratamiento con fragmento de Klenow y reacoplamiento. Un terminador 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 YopE₁₋₁₃₈ se añadieron los siguientes sitios de ruptura: XbaI-XhoI-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 NcoI/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 SteA₁₋₂₀ (pSi_266), la secuencia SteA de longitud completa (pSi_267), el fragmento SopE₁₋₈₁ (pSi_268) o el fragmento SopE₁₋₁₀₅ (pSi_269) se amplificaron a partir del ADN genómico de *S. enterica* SL1344 y se clonaron en el sitio NcoI/KpnI de pBad-MycHisA (Invitrogen).

- 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 YopE₁₋₁₃₈ 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/HindII 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 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.

Tabla I (Cebador No. Si.: Secuencia

285:	CATACCATGGAGTGAGCAAGGGCGAG
286:	GAAGATCTIAC TTGTACAGCTCGTCCAT
287:	CGGGGTACCTCAACTAAATGACCGTGGTG
288:	GTAAAGCTTIL:gaalclagacgagCGTGGCGAACTGGTC
292:	CAGTclgagCAAAATTCTAAACAAAATAC TTCCAC
293:	cagITTCGAATTAATTTGTATTGCTTTGACGG
296:	CAGTclgagACTAACATAACACTATCCACCCAG
297:	GTAAAGCTTTTCAGGAGGCATTCTGAAG
299:	CAGTclgagCAGGCCATCAAGTGTGTG
300:	cagITTCGAATCATTTTCTCTCCCTCTCTTCA
301:	CAGTclgagGCTGCCATCCGGAA
302:	cagITTCGAATCACAAAGACAAGGCACCC
306:	GTAAAGCTTTGGAGGCATTCTGAAGalactIIII CAGTclgagCAAAATACAGAGCTTCTATCACTCAG
308:	GTAAAGCTTTCAAGATGTGATTAATGAAGAAATG
317:	cagITTCGAACCCATAAAAAGCCCTGTC
318:	GTAAAGCTTCTACTCTATCATCAACGATAAAATGg
324:	CAGTclgagTTCACTCAAGAAACGCAAA
339:	cagITTCGAATTTTCTCTCTCTCTCTCTTCAg
341:	cglaTCTAGAAAAATGATGAAAAATGGAGACTG
342:	GTAAAGCTTIIlaGCTGGAGACGGTGAC
346:	CAGTclgagTTCCAGATCCCAGAGTTTG
347:	GTAAAGCTTTCACTGGGAGGGGG
351:	CAGTclgag:tgagTTATCTACTCATAGAACTACTTTTTCAG
352:	ggcGGATCClcaaglglddggggcIIa
353:	CATTTATTCCTCTAGTTCAGTCAcagcaadgtdcdllc
	gaagagcagcagllgldgTGACTAACTAGGAGGAATAAATG
355:	cgallca:ggallgcllclCATTTATTCCTCCAGGTACTA
356:	TAGTACCTGGAGGGGAATAATGagaagcaalccgllgallcg
357:	cglaTCTAGAcggcIIlaaglgcgcallc cglaTCTAGACTAAAGTATGAGGAGAGAAAAATTGAA
365:	GTAAAGCTTTTCAGCTTGCCCGTGT
367:	CGTAldagaGACCCGTTCTTGGTGC
369:	cglaTCTAGAccccccaagaagagc
373:	GTAAAGCTTGCTGGAGACGGTGACC
386:	CGTAldagaTCAGGACGCTTCGGAGGTAG
387:	CGTAldagaATGGACTGTGAGGTCAACAA

(continuación)

389:	CGTAIdtagaGGCAACCGCAGCA
391:	GTTAAAGCTTTCAGTCCATCCCATTTCTg
403:	CGTAIdtagIdggaataIccIggaca
406:	GTTAAAGCTTgIdgIdcaIggccacagI
410:	CAGTclogagATGTCCGGGGTGGTg
413:	cagITTCGAATCACTGCAGCATGATGTC
417:	CAGTclogagAGTGGTGTGATGATGACATG
420:	cagITTCGAATTAGTGATAAAATAGAGTCTTTGTGAG
423:	CAGTclogagATGCACATAACTAATTTGGGATT
424:	cagITTCGAATTATACAAATGACGAATACCCCTT
425:	GTTAAAGCTTItacacIdIggIdIdIggIggGCTGGAGACGGTGAC
428:	CGTAIdtagaATGGACTTCAACAGGAACTTT
429:	CGTAIdtagaGGACATAGTCCACCAGCG
430:	GTTAAAGCTTTCAGTGGATCCGAAAAAC
433:	CGTAIdtagaGAATTAAAAAAACACTCATCCCA
434:	CGTAIdtagaCCAAAGGCAAAAGCAA AAA
435:	GTTAAAGCTTTTAGCTAGCCATGGCAAGC
436:	CGTAIdtagaATGCCCGCCCC
437:	GTTAAAGCTTCTACCCACCGTACTCGTCAAT
438:	CGTAIdtagaATGCTGACACGTCCAGAGAG
439:	GTTAAAGCTTTCATCTTCTTCGAGGAAAAAG
445:	ggcGGATCCItatggIdcacagcaaaa
446:	CATTTATTCCTCCTAGTTAGTCAaggcaacagccaIcaagag
447:	ctIdIgatIggIdgtIgcdTGACTAACTAGGAGGAATAAATG
448:	IItgatIgcagIgaacaIggIgcATTATCCCTCCAGGTACTA
449:	TAGTACCTGGAGGGGAATAATGcaacatIgcacIgaIcaaa
450:	qIlaTCTAGAtagccgcagatIgtIgtatIg
451:	CGTAIdtagaGATCAAGTCCAAC TGTGTGG
463:	CAGTclogaggaagcIgtItaaggggc
464:	cagITTCGAAtIagcgacggcgagcg
476:	GTTAAAGCTTItAC TTGTACAGCTCGTCCAT
477:	CGTAIdtagaGTGAGCAAGGGCGAG
478:	CAGTclogagATGGAAGATTATACCAAAATAGAGAAA
479:	GTTAAAGCTTCTACATCTTCTTAATCTGATTGTCCa

(continuación)

482: CGTAlctagaATGGCGCTGCAGCt
 483: GTTAAAGCTTTTCAGTCAATTGACAGGAATTTTg
 486: CGTAlctagaATGGAGCCGGCGCG
 487: GTTAAAGCTTTTCAATCGGGGATGTCtg
 492: CGTAlctagaATGCGCGAGGAGAAACAAGGG
 493: GTTAAAGCTTTTCAGTCCCTGTGGCTGTgc
 494: CGTAlctagaATGGCCGAGCCTTG
 495: GTTAAAGCTTTTGAAGATTTGTGGCTCC
 504:CGTAlctagaGAAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAAATCTGTATTTTCAAAGTATGC
 CCGCCCC
 506: GTTAAAGCTTCCCACCGTACTCGTCAATtc
 508:CGTAlctagaGAAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAAATCTGTATTTTCAAAGTATGG
 CCGAGCCCTTG
 509: GTTAAAGCTTTTGAAGATTTGTGGCTCCc
 511:CGTAlctagaGAAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAAATCTGTATTTTCAAAGTGTA
 GCAAGGGCGGAG
 512:CGTAlctagaGAAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAAATCTGTATTTTCAAAGTCCGC
 CGAAAAAAAACGTAAAGTTGTGAGCAAGGGCGAG
 513: GTTAAAGCTTAAACTTTACGTTTTTTTCGGCGGCTTGACAGCTCGTCCAT
 515:CGTAlctagaGAAAAATCTGTATTTTCAAAGTGAAAAATCTGTATTTTCAAAGTGATT
 ATAAAGATGATGATGATAAAATGGCCGAGCCCTTG
 558: CGTATCTAGAAATGACCAG TTTTGAAGATGC
 559: GTTAAAGCTTTTCATGACTCATTTTTCATCCAT
 561: CGTATCTAGAAATGAGTCTCTTAACTGTGAGAACAG
 562: GTTAAAGCTTCTACACCCCGCATCA
 580: calgccatggATTTATGGTCATAGATATGACCTC
 585: CAGTctcgagATGCAGATCTTCGTCAAGAC
 586: GTTAAAGCTTgtagctcgaAACCCACGTAGACGTAAGAC
 588: cagTTTCGAAGATTATAAAGATGATGATGATAAAATGGCCGAGCCCTTG

(continuación)

612: C G G G G T A C C a t g a g g t a g c t t a t t c d g a l a a a g
613: C G G G G T A C C a t a a t t g t c c a a a t a g t a t g g l a g c
614: c a t g c c a t g g C G G C A A G G C T C C T C
615: c g g g l a c c t t t a t t t g t c a a c a c t g c c c
616: g g g g l a c c t g c g g g g t c t t t a c t c g

677: T T A C T A T T C G A A G A A A T T A T T C A T A A T A T T G C C C G C C A T C T G G C C C A A A T T G G T
G A T G A A A T G G A T C A T T A A G C T T G G A G T A

678: T A C T C C A A G C T T A A T G A T C C A T T T C A T C A C C A A T T T G G G C C A G A T G G C G G G C A
A T A T T A T G A A T A A T T T C T T C G A A T A G T A A

682: T T A C T A C T C G A G A A A A A A C T G A G C G A A T G T C T G C G C C G C A T T G G T G A T G A A C T
G G A T A G C T A A G C T T G G A G T A

683: T A C T C C A A G C T T A G C T A T C C A G T T C A T C A C C A A T G C G G G C G A G A C A T T C G C T C
A G T T T T T T C T C G A G T A G T A A

Tabla II: Proteínas de fusión clonadas

Proteína que va a ser transportada por T3SS	SEQ ID NO: de la proteína	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-CdkI	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

		(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-MyHis	167	pSi_269	pSi_336	PCR1: 705/706; PCR2: 707/708; PCR solapante: 705/708	186/187, 188/189
SteA-Mad2-MyHis	168	pSi_267	pSi_337	709/710	190/191
SopE1-105-Mad2-MyHis	169	pSi_269	pSi_338	709/710	190/191
SteA-Cdk1-MyHis	170	pSi_267	pSi_339	711/712	192/193
SopE1-105-Cdk1-MyHis	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-MyHis	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
- 10 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 3×10⁸ 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 2×10⁸ 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 antisuero 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.

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 DO₆₀₀ 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 Spil 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.

25

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 periodos 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 3×10^8 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 2×10^8 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_{600} 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 TNF α 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 TNF α (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).

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

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

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 DO₆₀₀ 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 DO₆₀₀ 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. Después 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×. Las imágenes se analizaron empleando los programas informáticos Imaris (Bitplane) e Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

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.

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. Después 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 extinguió 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 TiO₂, 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 TiO₂ 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 NH₄OH 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 10⁶ 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 10⁴ 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, 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, 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 triptica 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 fijada, y la fosforilación (S,T,Y) o la oxidación (M) como una modificación variable para muestras enriquecidas con TiO₂ 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/eahrne/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 señuelo) 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. Después, a 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 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 la red EMBL-EBI en <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

B) Resultados

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 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 heterólogos [38]. Puesto que estos 138 aminoácidos N-terminales de YopE contienen el CBS, se decidió coexpresar SycE. El fragmento SycE-YopE₁₋₁₃₈ clonado a partir del plásmido de virulencia de *Y. enterocolitica* pYV40 contiene los promotores endógenos de YopE y de su chaperona SycE (figura 10). Por tanto, SycE y cualquier proteína de fusión de YopE₁₋₁₃₈ 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 bacterias. Se añadió un sitio de clonación múltiple ("multiple cloning site", MCS) en el extremo 3' de YopE₁₋₁₃₈ (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, 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 (*Δasd*), 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 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. Después 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 1 B). Aunque una cepa de tipo salvaje segregó la YopE de longitud completa, las cepas ΔHOPEMT *asd* no lo hicieron. Con la presencia de YopE₁₋₁₃₈-Myc-His (denominado también YopE₁₋₁₃₈-Myc; SEQ ID NO:3), una banda de YopE más pequeña se hizo visible (figura 1 B). Por tanto, el fragmento YopE₁₋₁₃₈ 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 YopE₁₋₁₃₈-Myc y tiñeron el marcador Myc con IF (figuras 2 A y B). Aunque al principio solo se tiñeron las bacterias, a los 30 min después 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 YopE₁₋₁₃₈-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 manera comparable. Puesto que se sabe que *Y. enterocolitica* infecta muchos tipos celulares diferentes [69], se realizó un seguimiento del transporte de YopE₁₋₁₃₈-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 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 YopE₁₋₁₃₈ 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 YopE₁₋₁₃₈-EGFP (SEQ ID NO:39 y SEQ ID NO:38, respectivamente). Mientras que YopE₁₋₁₃₈-EGFP (SEQ ID NO:37) condujo a una tinción citoplásmica débil, YopE₁₋₁₃₈-EGFP-NLS produjo una señal de EGFP nuclear más fuerte en células HeLa infectadas (figura 3). Esto indica que el fragmento YopE₁₋₁₃₈ 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 YopE₁₋₁₃₈ como muy prometedora para transportar muchas proteínas seleccionadas.

Retirada del apéndice YopE₁₋₁₃₈ después de la translocación de la proteína de fusión hacia la célula eucariota

Aunque para el transporte bacteriano, el fragmento YopE₁₋₁₃₈ 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 YopE₁₋₁₃₈ 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 YopE₁₋₁₃₈ (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 YopE₁₋₁₃₈-2×sitio de ruptura de TEV-ET1-Myc o YopE₁₋₁₃₈-2×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 produjo 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 YopE₁₋₁₃₈ 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 YopE₁₋₁₃₈-Myc hacia el interior de células HeLa no produce ningún efecto, el YopE₁₋₁₃₈-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 YopE₁₋₁₃₈-SopE-Myc (SEQ ID NO:135) por sí sola activa redistribuciones masivas de F-actina, la coinfección con bacterias que expresan YopE₁₋₁₃₈-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 YopE₁₋₁₃₈-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 efector 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 YopE₁₋₁₃₈-OspF translocada (SEQ ID NO:7), se controló la fosforilación de p38 después de una estimulación con TNFα. En células no infectadas o en células infectadas con bacterias que expresan YopE₁₋₁₃₈-Myc, el TNFα induce la fosforilación de p38. Por contraste, después de la translocación de YopE₁₋₁₃₈-OspF, la fosforilación inducida por TNFα fue abolida, demostrando que la OspF transportada es activa hacia p38 (figura 6 A).

Durante una infección con *Salmonella*, el efector de tipo III SopB protege a las células epiteliales de la apoptosis mediante una activación sostenida de Akt [83]. Mientras que la translocación de YopE₁₋₁₃₈-Myc o YopE₁₋₁₃₈-SopE no produjo ningún efecto sobre Akt, la translocación de YopE₁₋₁₃₈-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 YopE₁₋₁₃₈ 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 efector 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_{E305-end} (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 efector BepG de *B. henselae* (SEQ ID NO:136) no indujo AMPc, BepA de longitud completa y BepA_{E305-end} 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 YopE₁₋₁₃₈ 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 YopE₁₋₁₃₈ o para su transporte por *S. enterica* a SteA₁₋₂₀, SteA, SopE₁₋₈₁ o SopE₁₋₁₀₅. 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 YopE₁₋₁₃₈-Myc o YopE₁₋₁₃₈-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 estaurosporina (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 estaurosporina (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). YopE₁₋₁₃₈-tBID transportado por T3SS alcanzó unos niveles de Bid aproximadamente endógenos en células HeLa, mientras que YopE₁₋₁₃₈-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 10⁵ copias de BID por célula individual [86]. Por tanto, se puede concluir que el transporte de proteínas humanas dependiente de T3SS alcanza de 10⁵ a 10⁶ 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 10⁶ 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 YopE₁₋₁₃₈ para el transporte por *Y. enterocolitica*. Mientras que una infección durante 2,5 h con *Y. enterocolitica* ΔHOPEMT *asd* no transporta proteínas o YopE₁₋₁₃₈-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. SteA₁₋₂₀ 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 (vhhGFP4, (SEQ ID NO:31)) y construcciones de fusión de nanocuerpos para la degradación de proteínas transportadas (Smb-vhhGFP4; (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 YopE₁₋₁₃₈-z-BIM (SEQ ID NO:21) en células epiteliales humanas. Células HeLa infectadas durante 1 h con la cepa que transloca YopE₁₋₁₃₈-z-BIM muestran señales evidentes de muerte celular. Después se realizaron experimentos *in vivo* con embriones de pez cebra de 2 días posfertilización (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 YopE₁₋₁₃₈-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 YopE₁₋₁₃₈-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 YopE₁₋₁₃₈-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 Δ HOPEMT *asd* + YopE₁₋₁₃₈-Myc o con Δ HOPEMT *asd* + YopE₁₋₁₃₈-tBid durante 30 minutos. Las células se lisaron, seguido de una digestión enzimática, un enriquecimiento en fosfopéptidos y una cuantificación e identificación de los fosfopéptidos individuales. Se compararon las células infectadas con Δ HOPEMT *asd* + YopE₁₋₁₃₈-Myc con las células infectadas con Δ HOPEMT *asd* + YopE₁₋₁₃₈-tBid, lo cual permitió identificar 363 acontecimientos de fosforilación dependientes de tBid. 286 fosfopéptidos 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.ov>) [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- κ 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.

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. Ruyschaert, 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.
14. García, J.T., F. Ferracci, M.W. Jackson, S.S. Joseph, I. Pattis, *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.
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.
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. 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.
25. Skurnik, M., y H. Wolf-Watz (1989), Analysis of the *yopA* gene encoding the YopI virulence determinants of *Yersinia* spp, Mol. Microbiol., 3:517-29.
26. Terti, 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.
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.
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.
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.

5 38. Wo lke, 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.

10 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.

15 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.

20 45. Cornells, G.R., 1997, Cross talk between *Yersinia* and eukaryotic cells, en Molecular aspects of host-pathoge interactions, S. McCRAE, 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.

25 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. Sluiter (1987), Transcription of the yop regulon from *Y. enterocolitica* requires trans acting pYV and chromosomal genes, Microb. Pathog., 2:367-379.

30 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.

35 52. Westerfield, M. (2000), The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish *Danio rerio* University of Oregon Press, Eugene, ORp,

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.

40 54. Benard, EX., 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.

45 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. Lambermont, 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.
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.
- 15 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.
67. Mota, L.J., L. Journet, I. Sorg, C. Agrain, y G.R. Cornells (2005), Bacterial injectisomes: needle length does matter, *Science*, 307:1278.
- 20 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.
69. Denecker, G., S. Totemeyer, L.J. Mota, P. Troisfontaines, I. Lambermont, *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.
- 25 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.
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.
- 30 72. Kapust, R.B., J. Tozser, T.D. Copeland, y D.S. Waugh (2002), The P1 specificity of tobacco etch virus protease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 294:949-955.
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.
- 35 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.
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.
- 40 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.
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.
- 45 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.
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. Pielas, C.S. Brand, B. Hauert, A. Bohm, *et al.* (2012). Bacterial effector binds host cell adenyl 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. Carbonneau, *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. Gnäd, 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. Ahrne, 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), Bio informatics 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, Bioinformatics, 24:428-430.

96. Schwert, 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>

10 <223> YopE1-138 - lpgB1

<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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - SopE

<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 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	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>

10 <223> YopE1-138 - SptP

<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

<210> 9

<211> 678

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - lpgD

<400> 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>

10 <223> YopE1-138 - BepA

<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>

10 <223> YopE1-138 - BepA E305-end

<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

<210> 12

<211> 672

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - Traf6 murino

<400> 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	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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> YopE1-138 - TIFA

<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
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> YopE1-138 - Cdk1

<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
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
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										
Glu	Glu	Val	Arg	Leu	Arg	Ser	Phe	Thr	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																							
<212> PRT																							
<213> Secuencia artificial																							
<220>																							
<223> YopE1-138 - Ink4A																							
<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										
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 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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - Ink4B

<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 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 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

Tyr Leu Arg Thr Ala Thr Gly Asp
275 280

5 <210> 18
<211> 310
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> YopE1-138 - Ink4C

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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - z-Bid

<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

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
 Phe Asn Arg Asn Phe Asp His Ile Pro His Thr Ser Leu Val Leu Leu
 145 150 155 160
 Ser Phe Leu Asn Gln Lys Asp Cys Gln Asn Gly Glu Ser Gly Arg Val
 165 170 175
 Phe Asp Tyr Arg Glu Asp Asn Leu Ser Thr Asn His Ile Asp Ser Asp
 180 185 190
 Gly Asp Ile Glu Thr Asp Gly His Ser Pro Pro Ala Thr Tyr Arg Asp
 195 200 205
 Leu Leu His Glu Leu Gln His Glu Val Gln Pro Gly Leu Ser Val Asn
 210 215 220
 Ala Glu Glu Ala Arg Ala Ala Arg Glu Met Ala Ala Glu Leu Ile Arg
 225 230 235 240
 Ile Ala Asp Leu Leu Glu Gln Ser Val Leu Ser Gln Ala Ala Glu Ser
 245 250 255
 Leu Thr Lys Lys Leu Arg Ser Phe Gln Glu Gln Val Trp Ala Ser His
 260 265 270
 Leu Ser Lys Gly Val Gln Thr Leu Leu Gln His Val Ala Ala Ala Lys
 275 280 285
 Glu Phe Lys Lys Glu Leu Val Glu Met Ala Phe Thr Phe Met Leu Met
 290 295 300
 Lys Thr Val Cys Glu Arg Thr Pro Asp Phe Leu Phe Gly Leu Tyr Gly
 305 310 315 320
 Thr Val Val Gln Phe Phe Gly Ser Asn
 325

<210> 20
 <211> 273
 5 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> YopE1-138 - z-t-Bid

10 <400> 20

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 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

<220>

5 <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 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 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

10 <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

5

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 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 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 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 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

<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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - nanocuerpo VhH4 que reconoce EGFP

<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 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>

10 <223> YopE1-138 - NLS-Slmb1-VhH4

<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 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 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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> YopE1-138 - Dominio PH Akt

<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 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

<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
		20						25				30		
Gln	Gln	Lys	Ser	Asp	Gln	Tyr	Ala	Asn	Asn	Leu	Ala	Gly	Arg	Thr
		35					40					45		
Ser	Pro	Gln	Gly	Ser	Ser	Leu	Ala	Ser	Arg	Ile	Ile	Glu	Arg	Leu
	50					55					60			
Ser	Met	Ala	His	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Ile	Gln	Arg	Met	Phe	Ser
65					70					75				80
Gly	Ser	His	Lys	Pro	Val	Val	Thr	Pro	Ala	Leu	Thr	Pro	Ala	Gln
				85					90					95
Pro	Ser	Pro	Thr	Ser	Phe	Ser	Asp	Ser	Ile	Lys	Gln	Leu	Ala	Ala
			100					105					110	
Thr	Leu	Pro	Lys	Tyr	Met	Gln	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu	Asp	Ala	Glu
		115					120					125		
Leu	Gln	Lys	Asn	His	Asp	Gln	Phe	Ala	Thr	Leu	Glu	Ser	Arg	Glu
	130					135					140			
Leu	Tyr	Phe	Gln	Ser	Glu	Asn	Leu	Tyr	Phe	Gln	Ser	Pro	Pro	Lys
145					150					155				160
Lys	Arg	Lys	Val	Val	Ser	Lys	Gly	Glu	Glu	Leu	Phe	Thr	Gly	Val
				165					170					175
Pro	Ile	Leu	Val	Glu	Leu	Asp	Gly	Asp	Val	Asn	Gly	His	Lys	Phe
			180					185					190	
Val	Ser	Gly	Glu	Gly	Glu	Gly	Asp	Ala	Thr	Tyr	Gly	Lys	Leu	Thr
		195					200					205		
Lys	Phe	Ile	Cys	Thr	Thr	Gly	Lys	Leu	Pro	Val	Pro	Trp	Pro	Thr
	210					215					220			
Val	Thr	Thr	Leu	Thr	Tyr	Gly	Val	Gln	Cys	Phe	Ser	Arg	Tyr	Pro
225					230					235				240
His	Met	Lys	Gln	His	Asp	Phe	Phe	Lys	Ser	Ala	Met	Pro	Glu	Gly
				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>

10 <223> YopE1-138 - 2xTEVsitio - EGFP - NLS

<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
Gly Ser His Lys Pro Val Val Thr Pro Ala Leu Thr Pro Ala Gln Met				
		85		90
Pro Ser Pro Thr Ser Phe Ser Asp Ser Ile Lys Gln Leu Ala Ala Glu				
		100		105
Thr Leu Pro Lys Tyr Met Gln Gln Leu Ser Ser Leu Asp Ala Glu Thr				
		115		120
Leu Gln Lys Asn His Asp Gln Phe Ala Thr Leu Glu Ser Arg Glu Asn				
		130		135
Leu Tyr Phe Gln Ser Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Ser Val Ser Lys Gly				
		145		150
Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly				
		165		170
Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp				
		180		185
Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys				
		195		200
Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val				
		210		215
Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe				
		225		230
Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe				
		245		250
Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly				
		260		265
Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu				
		275		280
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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - 2x TEVsitio - INK4C

<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 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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - 2x TEVsitio - ET1

<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	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
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> YopE1-138 - TEV proteasa S219V

<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
370 375 380

<210> 43

<211> 332

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> YopE1-138 - 2x TEVsitio - Bandera - INK4C

<400> 43

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 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 tactgtaca gctcgccat 30
 <210> 46
 <211> 29
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador No.: Si_287
 30 <400> 46
 cggggtacct caactaatg accgtggg 29
 <210> 47
 <211> 43
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador No.: Si_288
 40 <400> 47
 gttaaagctt ttcgaatcta gactcgagcg 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
 cagtttcgaa ttaatttga ttgctttgac 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
 20 gttaaagctt tcaggaggca ttctgaag 28
 <210> 52
 <211> 28
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador No.: Si_299
 30 <400> 52
 cagtctcgag caggccatca agtgtgtg 28
 <210> 53
 <211> 33
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador No.: Si_300
 40 <400> 53
 cagtttcgaa tcattttctc ttctcttct tca 33
 <210> 54
 45 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador No.: Si_301
 <400> 54
 cagtctcgag gctgccatcc ggaa 24
 55 <210> 55
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador No.: Si_302
 <400> 55
 65 cagtttcgaa tcacaagaca aggcaccc 28
 <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
 20 cagtctcgag caaatacaga gcttctatca ctacg 35
 <210> 58
 <211> 35
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador No.: Si_308
 30 <400> 58
 gttaaagctt tcaagatgtg attaatgaag aaatg 35
 <210> 59
 <211> 29
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador No.: Si_317
 40 <400> 59
 cagtttcgaa cccataaaaa agccctgtc 29
 <210> 60
 45 <211> 37
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador No.: Si_318
 <400> 60
 gttaaagctt ctactctatc atcaaacgat aaaatgg 37
 55 <210> 61
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador No.: Si_324
 <400> 61
 65 cagtctcgag ttactcaag aaacgcaa 29
 <210> 62

<211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador No.: Si_339
 <400> 62
 cagtttcgaa ttttctcttc ctcttctca cg 32
 10 <210> 63
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador No.: Si_341
 <400> 63
 20 cgtatctaga aaaatgatga aaatggagac tg 32
 <210> 64
 <211> 28
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador No.: Si_342
 30 <400> 64
 gttaaagctt ttagctggag acggtgac 28
 <210> 65
 <211> 29
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador No.: Si_346
 40 <400> 65
 cagtctcgag ttccagatcc cagagtttg 29
 <210> 66
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador No.: Si_347
 <400> 66
 gttaaagctt tcactgggag gggg 24
 55 <210> 67
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador No.: Si_351
 <400> 67
 cagtctcgag ctcgagttat ctactcatag aaactacttt tgcag 45
 65 <210> 68

<211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador No.: Si_352
 <400> 68
 cgcggtatcct cagtgtctct gcggcatta 29
 10 <210> 69
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador No.: Si_353
 <400> 69
 20 catttattcc tcctagttag tcacagcaac tgctgtcct ttc 43
 <210> 70
 <211> 43
 <212> ADN
 25 <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 attgcttct cattattccc tccaggtact a 41
 <210> 72
 45 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador No.: Si_356
 <400> 72
 tagtacctgg aggaataat gagaaagcaa tccgtgaatc g 41
 55 <210> 73
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador No.: Si_357
 <400> 73
 65 cgtatctaga cggctttaag tgcgacattc 30
 <210> 74

<211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador No.: Si_364
 <400> 74
 10 cgtatctaga ctaaagtatg aggagagaaa attgaa 36
 <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 tgggtc 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
 65 cgtatctaga tcaggacgct tcggaggtag 30
 <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 ccatttctg 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 tgggtg 25
 <210> 86

<211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador No.: Si_413
 <400> 86
 cagtttcgaa tcactgcagc atgatgtc 28
 10 <210> 87
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador No.: Si_417
 <400> 87
 20 cagtctcgag agtgggttg atgatgacat g 31
 <210> 88
 <211> 40
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador No.: Si_420
 30 <400> 88
 cagtttcgaa ttagtgataa aaatagagtt ctttgtgag 40
 <210> 89
 <211> 33
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador No.: Si_423
 40 <400> 89
 cagtctcgag atgcacataa ctaatttggg att 33
 <210> 90
 45 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador No.: Si_424
 <400> 90
 cagtttcgaa ttatacaaat gacgaatacc cttt 34
 55 <210> 91
 <211> 52
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador No.: Si_425
 <400> 91
 gttaaagctt ttacaccttg cgcttcttct tgggcgggct ggagacggtg ac 52
 65 <210> 92

<211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador No.: Si_428
 <400> 92
 cgtatctaga atggacttca acaggaactt t 31
 10 <210> 93
 <211> 28
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador No.: Si_429
 <400> 93
 20 cgtatctaga ggacatagtc caccagcg 28
 <210> 94
 <211> 29
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador No.: Si_430
 30 <400> 94
 gttaaagctt tcagttggat ccgaaaaac 29
 <210> 95
 <211> 34
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador No.: Si_433
 40 <400> 95
 cgtatctaga gaattaaaaa aaacactcat ccca 34
 <210> 96
 45 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador No.: Si_434
 <400> 96
 cgtatctaga ccaaaggcaa aagcaaaaa 29
 55 <210> 97
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador No.: Si_435
 <400> 97
 gttaaagctt ttagctagcc atggcaagc 29
 65 <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
 20 gttaaagctt ctaccaccg tactgtcaa t 31

<210> 100
 <211> 31
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador No.: Si_438

30 <400> 100
 cgtatctaga atgtctgaca cgtccagaga g 31

<210> 101
 <211> 32
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador No.: Si_439

40 <400> 101
 gttaaagctt tcattctt cgcaggaaaa ag 32

<210> 102
 45 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 50 <223> Cebador No.: Si_445

<400> 102
 cgcggatcct tatgggttct cacagcaaaa 30

55 <210> 103
 <211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Cebador No.: Si_446

<400> 103
 catttatcc tcctagttag tcaaggcaac agccaatcaa gag 43

65 <210> 104

<211> 43
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador No.: Si_447
 <400> 104
 ctcttgattg gctgttgctt tgactaacta ggaggaataa atg 43
 10 <210> 105
 <211> 41
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador No.: Si_448
 <400> 105
 20 ttgattgcag tgacatgggtg cattattccc tccaggtact a 41
 <210> 106
 <211> 41
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador No.: Si_449
 30 <400> 106
 tagtacctgg aggggaataat gcaccatgtc actgcaatca a 41
 <210> 107
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador No.: Si_450
 40 <400> 107
 cgtatctaga tagccgcaga tgttggtatg 30
 <210> 108
 45 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador No.: Si_451
 <400> 108
 cgtatctaga gatcaagtcc aactggtgg 29
 55 <210> 109
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador No.: Si_463
 <400> 109
 cagtctcgag gaaagcttgt ttaaggggc 29
 65 <210> 110

<211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> Cebador No.: Si_464
 <400> 110
 cagtttcgaa ttagcgacgg cgacg 25
 10 <210> 111
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 15 <220>
 <223> Cebador No.: Si_476
 <400> 111
 20 gttaaagctt ttactgtac agctcgcca t 31
 <210> 112
 <211> 25
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador No.: Si_477
 30 <400> 112
 cgtatctaga gtgagcaagg gcgag 25
 <210> 113
 <211> 37
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador No.: Si_478
 40 <400> 113
 cagtctcgag atggaagatt ataccaaaat agagaaa 37
 <210> 114
 45 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador No.: Si_479
 <400> 114
 gttaaagctt ctacatcttc ttaatctgat tgtcca 36
 55 <210> 115
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador No.: Si_482
 <400> 115
 65 cgtatctaga atggcgctgc agct 24
 <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
 20 cgtatctaga atggagccgg cggcg 25
 <210> 118
 <211> 27
 <212> ADN
 25 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador No.: Si_487
 30 <400> 118
 gttaaagctt tcaatcgggg atgtctg 27
 <210> 119
 <211> 30
 35 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cebador No.: Si_492
 40 <400> 119
 cgtatctaga atgcgcgagg agaacaaggg 30
 <210> 120
 45 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 50 <223> Cebador No.: Si_493
 <400> 120
 gttaaagctt tcagtcacct gtggctgtgc 30
 55 <210> 121
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial
 60 <220>
 <223> Cebador No.: Si_494
 <400> 121
 cgtatctaga atggccgagc cttg 24
 65 <210> 122

ES 2 754 508 T3

<211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador No.: Si_495

<400> 122
 gttaaagctt ttattgaaga 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 cccaccgtac 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

ES 2 754 508 T3

	<400> 127	
	cgtatctaga gaaaatctgt attttcaaag tgaaaatctg tattttcaaa gtgtgagcaa	60
	gggcgag	67
5	<210> 128 <211> 91 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador No.: Si_512	
	<400> 128	
	cgtatctaga gaaaatctgt attttcaaag tgaaaatctg tattttcaaa gtccgccgaa	60
	aaaaaacgt aaagttgtga gcaaggcgga g	91
15	<210> 129 <211> 55 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador No.: Si_513	
25	<400> 129 gttaaagctt taaacttta cggtttttt tcggcggtt gtacagctg tccat 55	
30	<210> 130 <211> 90 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Cebador No.: Si_515	
	<400> 130	
	cgtatctaga gaaaatctgt attttcaaag tgaaaatctg tattttcaaa gtgattataa	60
	agatgatgat gataaaatgg ccgagccttg	90
40	<210> 131 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador No.: Si_558	
45	<400> 131 cgtatctaga atgaccagt ttgaagatgc 30	
50	<210> 132 <211> 31 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
55	<220> <223> Cebador No.: Si_559	
	<400> 132 gttaaagctt tcatgactca tttcatcca t 31	
60	<210> 133 <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 ctacaccccc 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
 30 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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138 - BepG 715-end

<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 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>

10 <223> YopE1-138 - Rac1 Q61E - MycHis

<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>

10 <223> YopE1-138 - Parte de Y. enterocolitica con codones optimizados para Bax BH3 murina

<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

<210> 141

15 <211> 210

<212> PRT

<213> Salmonella entérica

<220>

20 <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 entérica

<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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SopE1-81 tBid murina con codones optimizados para *S. enterica*

<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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> SopE1-105 - tBid murina con codones optimizados para *S. enterica*

<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

ES 2 754 508 T3

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 Gly Ser Gln Ala Ser
 100 105 110
 Arg Ser Phe Asn Gln Gly Arg Ile Glu Pro Asp Ser Glu Ser Gln Glu
 115 120 125
 Glu Ile Ile His Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Ile Gly Asp Glu
 130 135 140
 Met Asp His Asn Ile Gln Pro Thr Leu Val Arg Gln Leu Ala Ala Gln
 145 150 155 160
 Phe Met Asn Gly Ser Leu Ser Glu Glu Asp Lys Arg Asn Cys Leu Ala
 165 170 175
 Lys Ala Leu Asp Glu Val Lys Thr Ala Phe Pro Arg Asp Met Glu Asn
 180 185 190
 Asp Lys Ala Met Leu Ile Met Thr Met Leu Leu Ala Lys Lys Val Ala
 195 200 205
 Ser His Ala Pro Ser Leu Leu Arg Asp Val Phe His Thr Thr Val Asn
 210 215 220
 Phe Ile Asn Gln Asn Leu Phe Ser Tyr Val Arg Asn Leu Val Arg Asn
 225 230 235 240

Glu Met Asp

<210> 148

<211> 82

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador No.: Si_677

10

<400> 148

ttactatttcg aagaaattat tcataatatt gcccgccatc tggcccaaatt tggatgatgaa 60

atggatcatt aagcttggag ta 82

<210> 149

15

<211> 82

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> Cebador No.: Si_678

<400> 149

tactccaagc ttaatgatcc atttcatcac caatttgggc cagatggcgg gcaatattat 60

gaataatttc ttcgaatagt aa 82

25

<210> 150

<211> 73
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Cebador No.: Si_682

<400> 150
 ttactactcg agaaaaaact gagcgaatgt ctgcgccgca ttggtgatga actggatagc 60
 taagcttgga 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 ctcagttttt 60
 tctcgagtag taa 73

20 <210> 152
 <211> 34
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Cebador No.: Si_580

30 <400> 152
 catgccatgg atttatggc atagatatga cctc 34

35 <210> 153
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Cebador No.: Si_612

<400> 153
 cgggggtacca tgaggtagct tatttctga taaag 35

45 <210> 154
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Cebador No.: Si_613

<400> 154
 cgggggtacca taattgtcca aatagttatg gtagc 35

55 <210> 155
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Cebador No.: Si_614

<400> 155
 catgccatggc ggcaaggctc ctc 24

 5 <210> 156
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 10 <220>
 <223> Cebador No.: Si_615

 <400> 156
 cgggggtacct ttattgtca acactgccc 29

 15 <210> 157
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 20 <220>
 <223> Cebador No.: Si_616

 <400> 157
 cgggggtacct gcgggggtctt tactcg 26

 25 <210> 158
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 30 <220>
 <223> YopE1-138-Y. Enterocolitica con codones optimizados Ink4A 84-103

 <400> 158
 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

 35

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>

10 <223> YopE1-138-Y. codón enterocólico optimizado p107/RBL1 657-662 (AAA02489.1)

<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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138-Y. codón enterocólico optimizado p21 141-160 (AAH13967.1)

<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

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> YopE1-138-Y. codón enterocólico optimizado p21 145-160 (AAH13967.1)

<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

<210> 162

<211> 161

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

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
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
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
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 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 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>

10 <223> SopE1-105-Ink4a-MychHis

<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

225 230 235 240
 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 <400> 167
 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

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

<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	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>

10 <223> SteA-CdkI-MychHis

<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 1	Thr	Lys	Ile	Thr	Leu	Ser	Pro	Gln	Asn	Phe	Arg	Ile	Gln	Lys	Gln
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	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
 Ile Asp Gln Leu Phe Arg Ile Phe Arg Ala Leu Gly Thr Pro Asn Asn
 325 330 335
 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

His

<210> 172

<211> 95

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador No.: Si_745

10

<400> 172

catgctcgag ggtgccatcg atgatgccgc ccgcgaaggt tttctggata ccctggtggt 60

gctgcatcgc gccggtgccc gctaattcga acatg 95

<210> 173

15 <211> 95

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

20 <223> Cebador No.: Si_746

ES 2 754 508 T3

	<400> 173	
	catgttcgaa ttagcgggca ccggcgcgat gcagcaccac cagggatatcc agaaaacctt	60
	cgcgggcggc 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
	ggtgaaaacgc cgcctgtttg gttaattcga acatg	95
15	<210> 175	
	<211> 95	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
20	<220>	
	<223> Cebador No.: Si_748	
	<400> 175	
	catgttcgaa ttaaccaaac aggcggcgtt tcaccggacc gcggcggcgt tggcggcgtt	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 ataaacgccg ccaaaccagc atgaccgcct tttatcatag	60
	caaacgccgc ctgattttta gctaattcga acatg	95
	<210> 177	
	<211> 95	
40	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> Cebador No.: Si_750	
45	<400> 177	
	catgttcgaa ttagctaaaa atcaggcggc gtttgctatg ataaaaggcg gtcatgctgg	60
	tttggcggcg tttatcgatg gcaccctcga gcatg	95
	<210> 178	
50	<211> 83	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
55	<223> Cebador No.: Si_753	
	<400> 178	

ES 2 754 508 T3

	catgctcgag ggtgccatcg ataccagcat gaccgccttt tatcatagca aacgccgcct	60
	gatttttagc taattcgaac atg	83
5	<210> 179 <211> 83 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador No.: Si_754	
	<400> 179 catgttcgaa ttagctaaaa atcagggcggc gtttgctatg ataaaaggcg gtcgatgctgg	60
	tatcgatggc accctcgagc atg	83
15	<210> 180 <211> 86 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Cebador No.: Si_755	
	<400> 180 catgctcgag ggtgccatcg atgcctgtcg ccgcctgttt ggtccggtgg 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 ttaatcgcg ctcagttggt cgctatccac cggaccaaac aggcggcgac	60
35	aggcatcgat ggcaccctcg agcatg	86
40	<210> 182 <211> 62 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador No.: Si_757	
	<400> 182 catgctcgag ggtgccatcg attgggaact ggtggtgctg ggtaaactgt aattcgaaca	60
45	tg	62
50	<210> 183 <211> 62 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Cebador No.: Si_758	
55	<400> 183	

	catgttcgaa ttacagttta cccagcacca ccagttccca atcgatggca ccctcgagca	60
	tg	62
5	<210> 184 <211> 27 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Cebador No.: Si_703 <400> 184 gacatggaat tcatggagcc ggcggcg 27	
15	<210> 185 <211> 28 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
20	<220> <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 gacatggaat tcatggccga gccttgggg 29	
35	<210> 187 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Cebador No.: Si_706 <400> 187 gttaacatca gcttgaaact ccagcaaagt ctgtaaagtg tccaggaaac c 51	
45	<210> 188 <211> 51 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Cebador No.: Si_707 <400> 188 gggttcctgg acactttaca gactttgctg gagtttcaag ctgatgttaa c 51	
55	<210> 189 <211> 30 <212> ADN <213> Secuencia artificial	
60	<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

35 <400> 192
gacatggaat tcatggaaga ttataccaaa atagagaa 38

<210> 193
<211> 34
40 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador No.: Si_712

45 <400> 193
catgaagctt catctctta atctgattgt ccaa 34

<210> 194
<211> 276
50 <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

<220>

5 <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

10

<210> 196

<211> 419

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

5 <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

<210> 198

15 <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

<220>

5 <223> Cebador No.: Si_588

<400> 199

cagtttcgaa gattataaag atgatgatga taaatggcc gagccttg 48

REIVINDICACIONES

1. 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 el 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 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.

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.

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.

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*.

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.

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.

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:

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 segrega hacia el sobrenadante del cultivo.

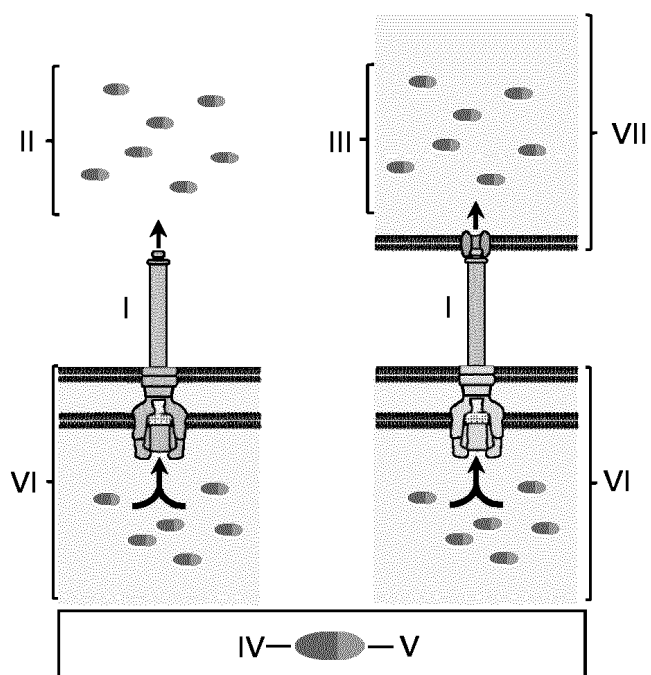
5 11. La cepa bacteriana Gram-negativa recombinante de una cualquiera de las reivindicaciones 2-6, para el uso en el transporte de una proteína heteróloga como un medicamento o una vacuna a un sujeto.

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

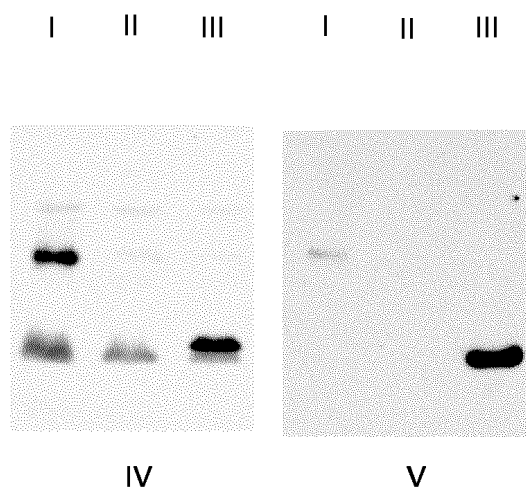
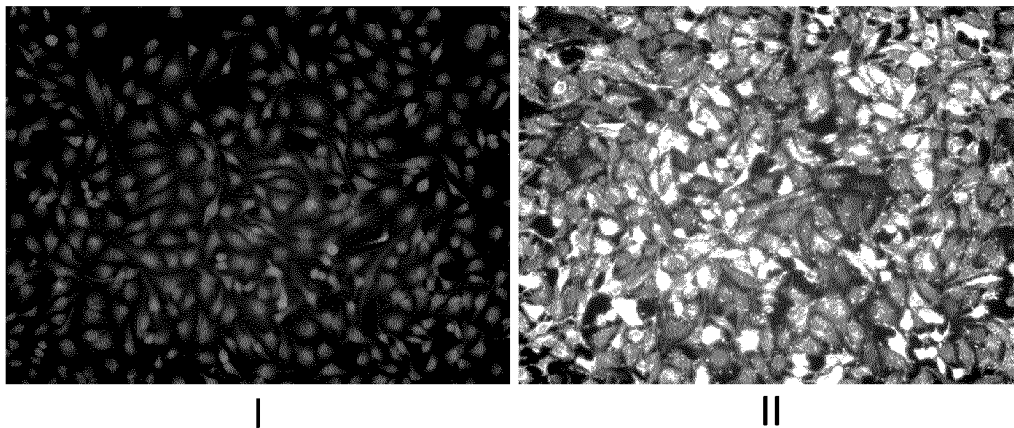
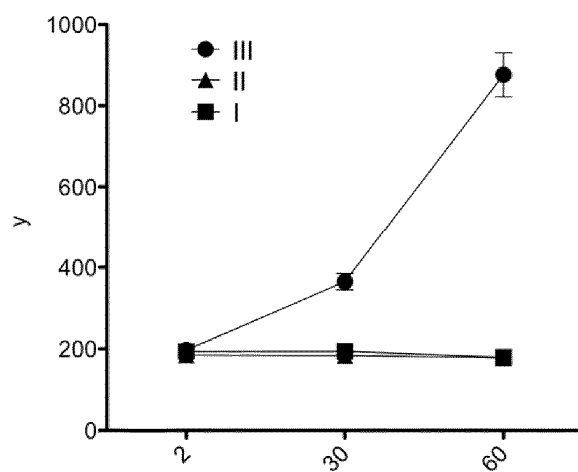


Figura 2

A



B



C

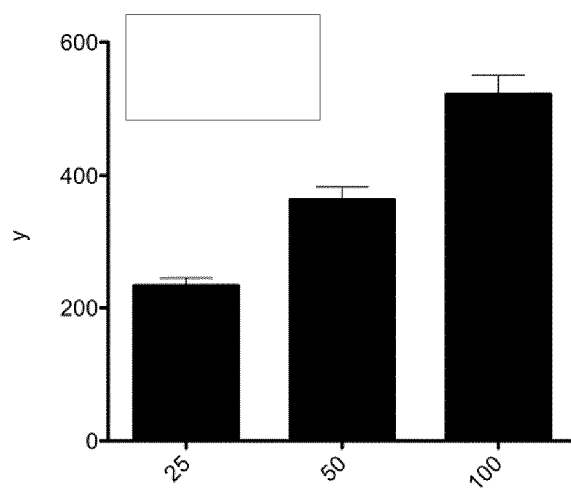


Figura 3

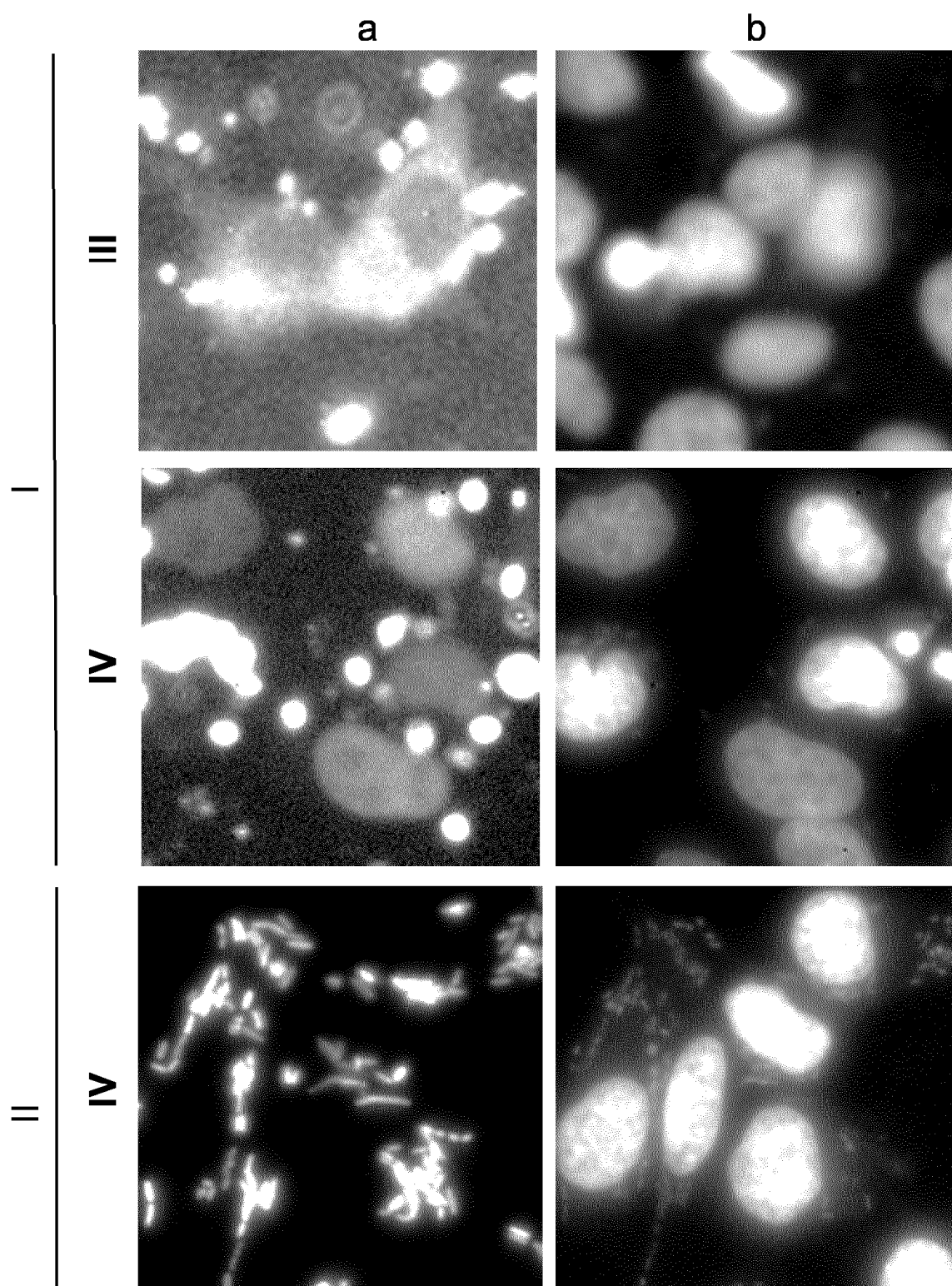


Figura 4

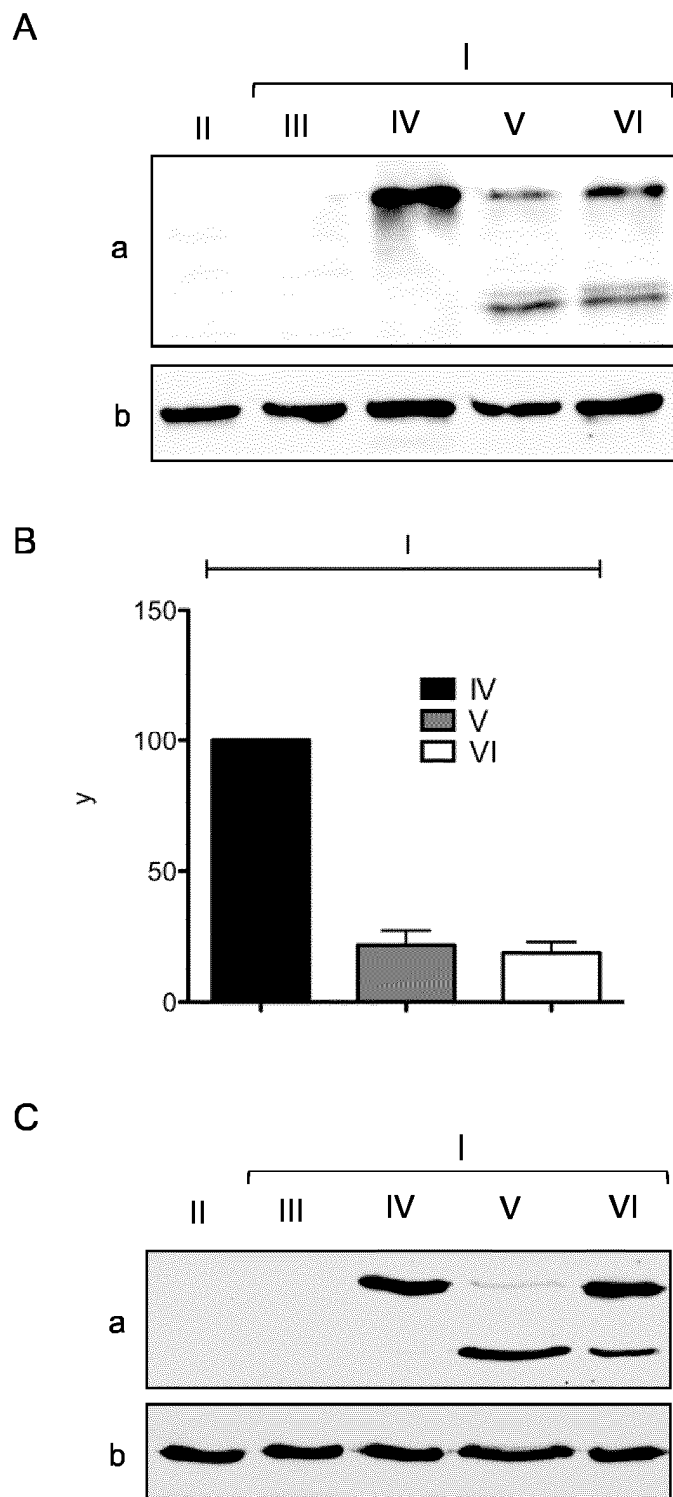


Figura 5

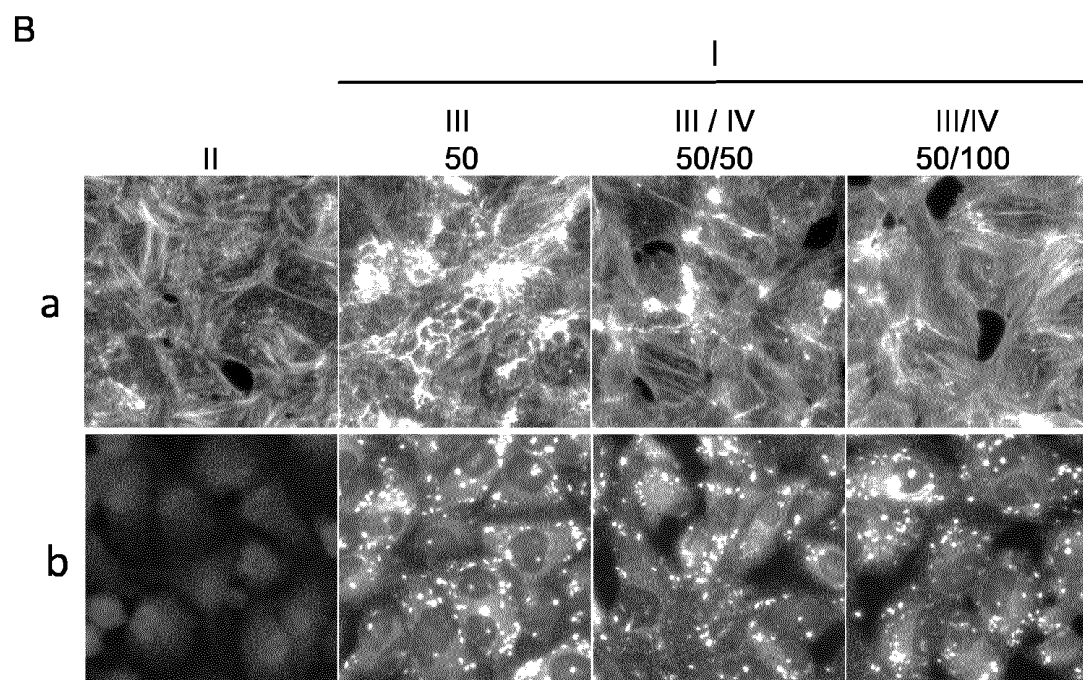
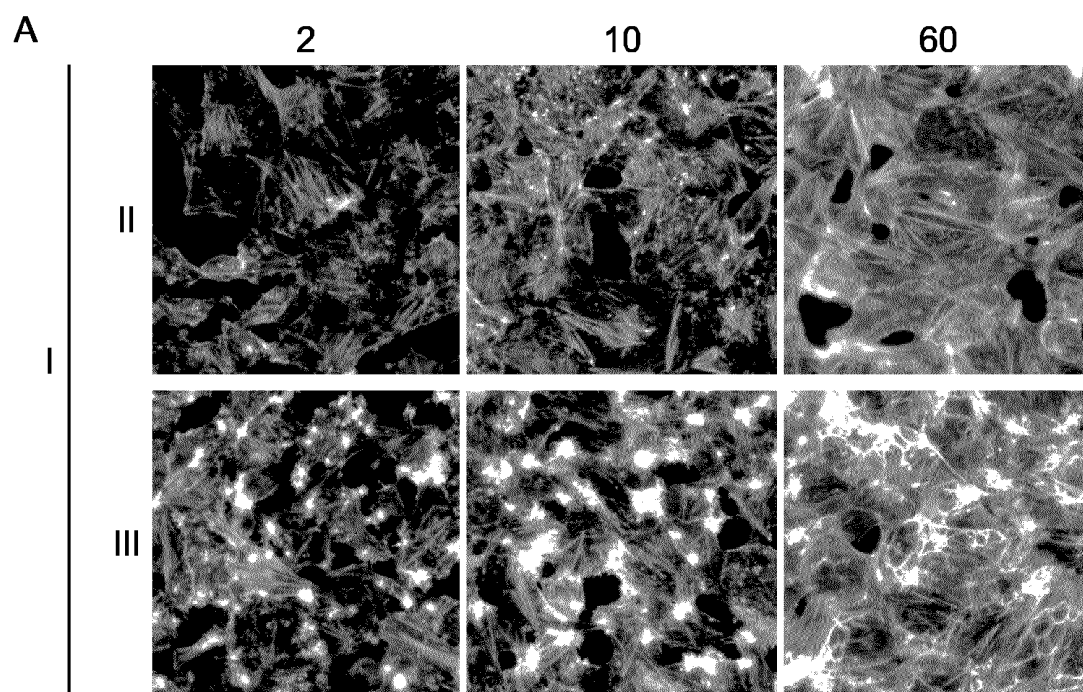


Figura 6

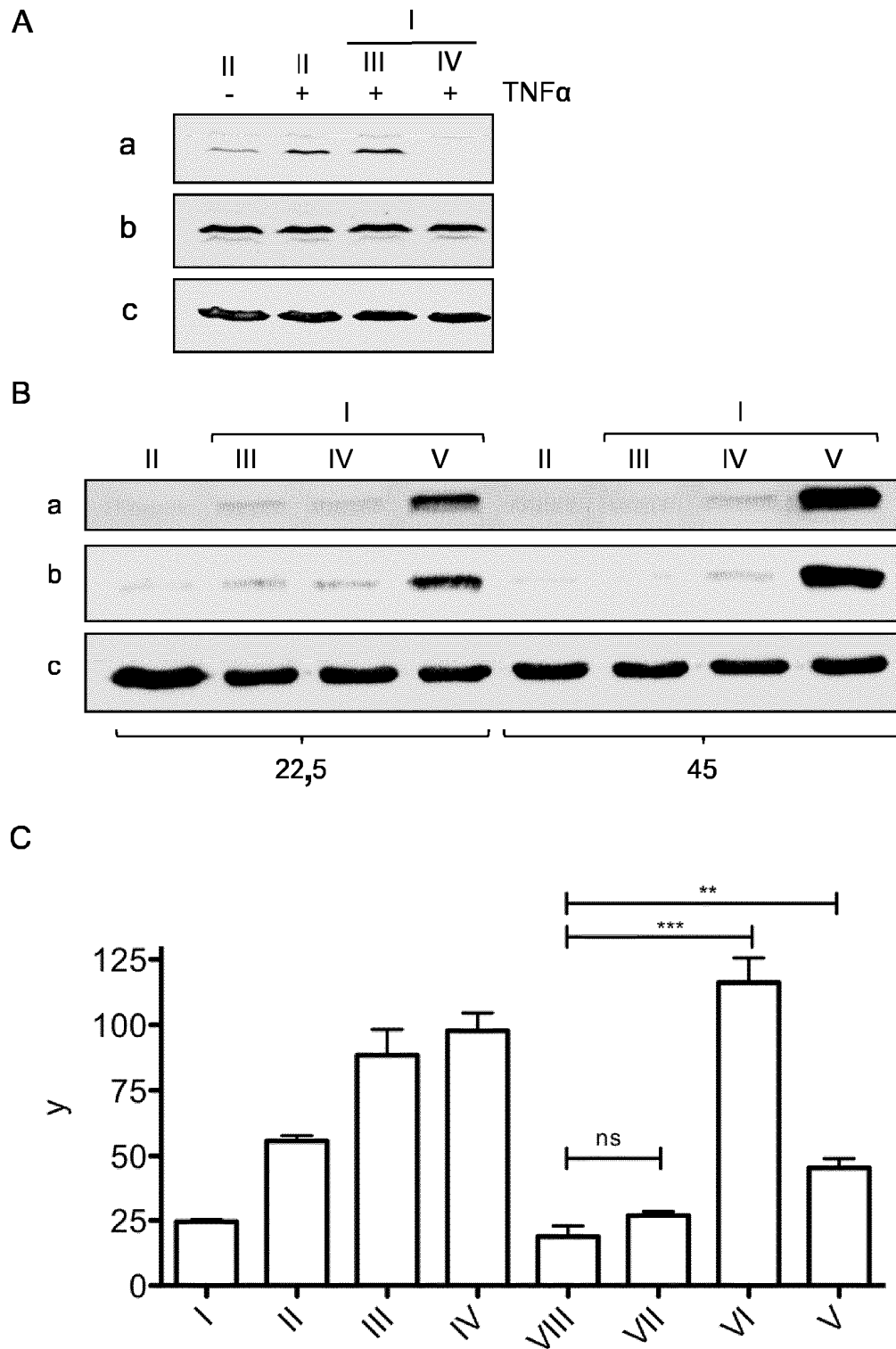


Figura 7

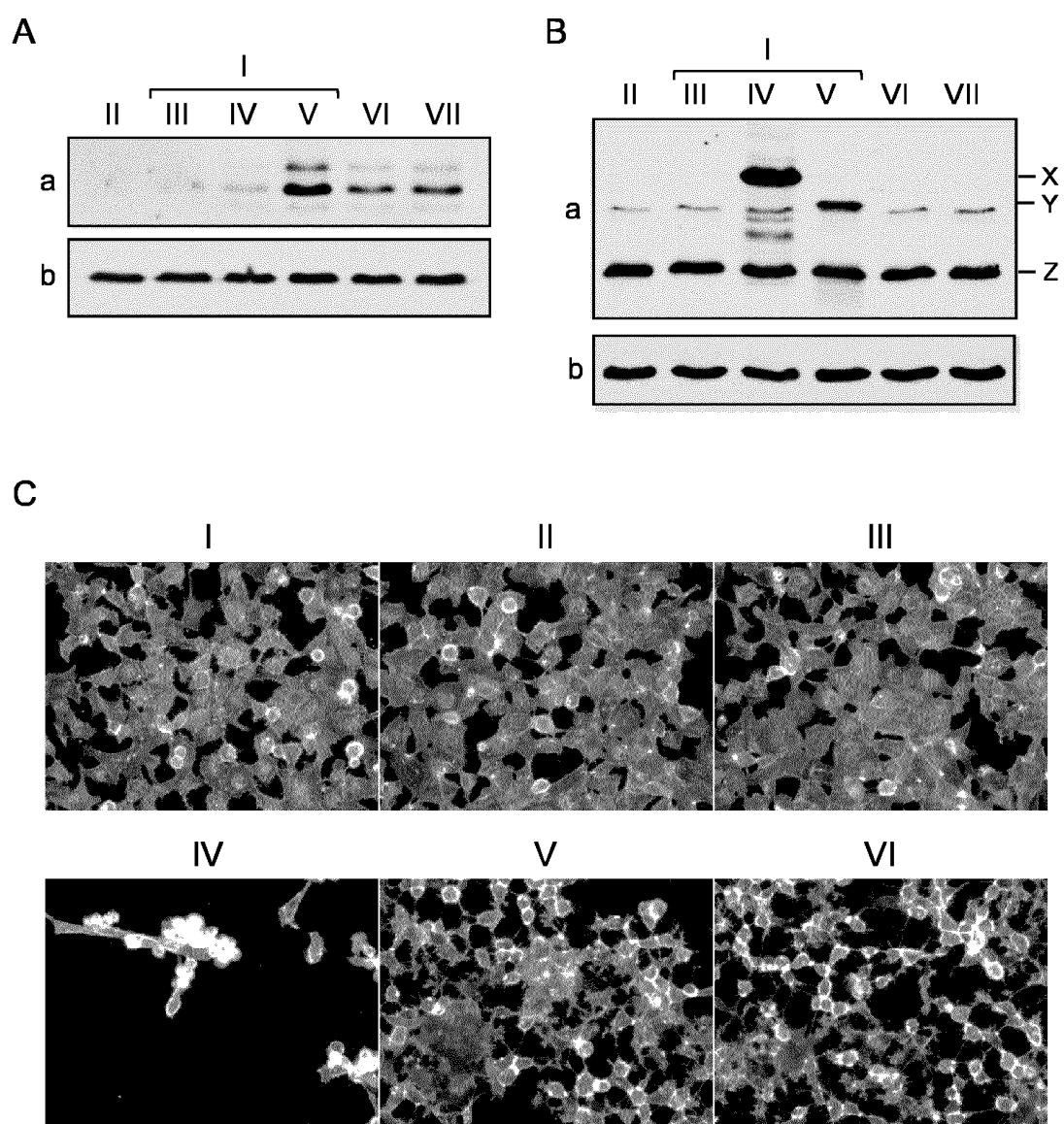


Figura 8

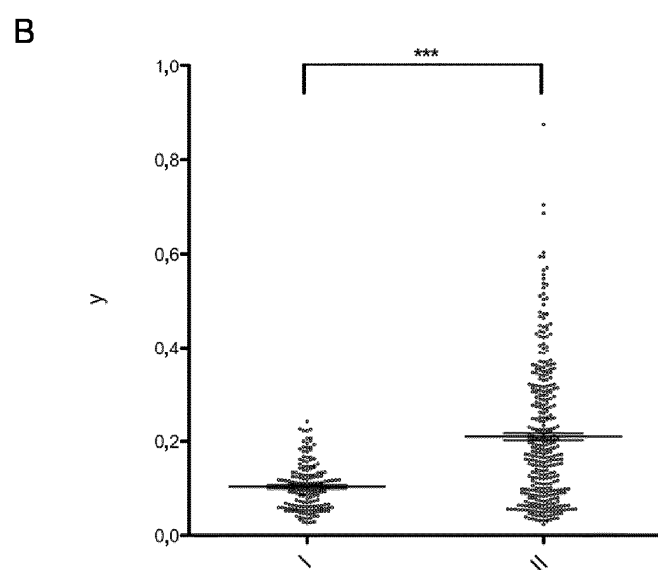
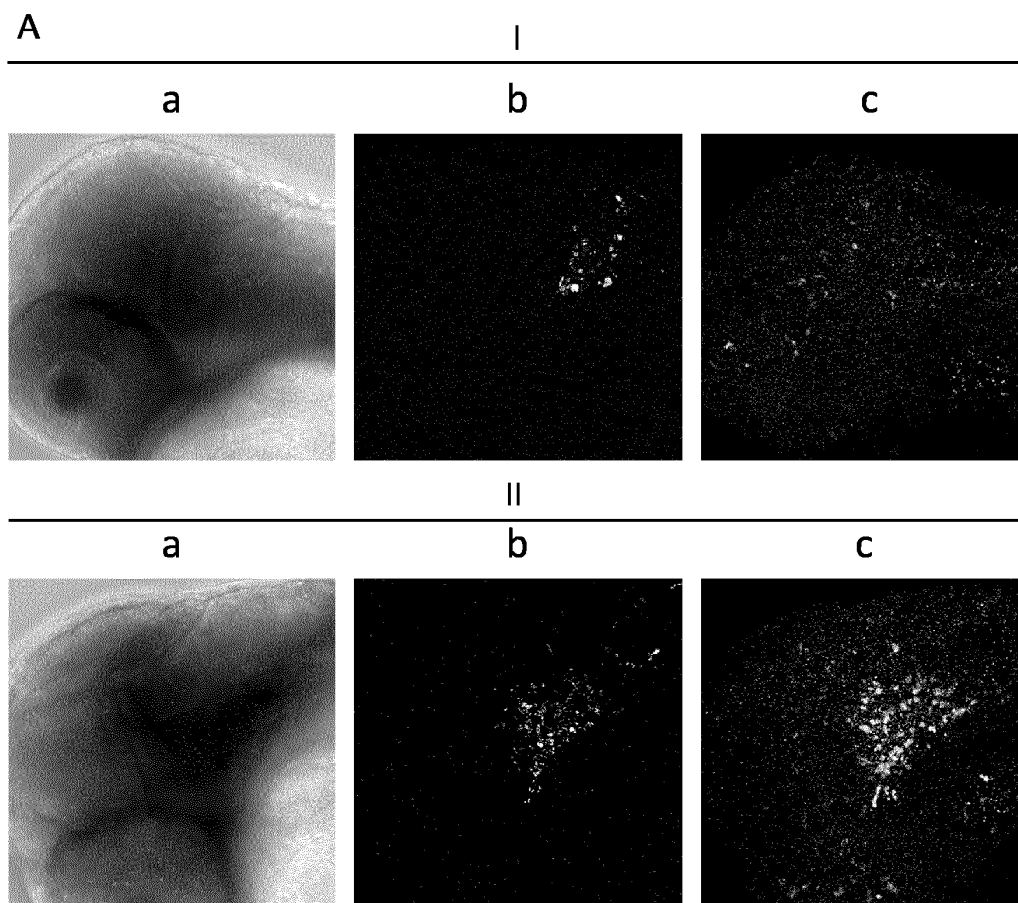
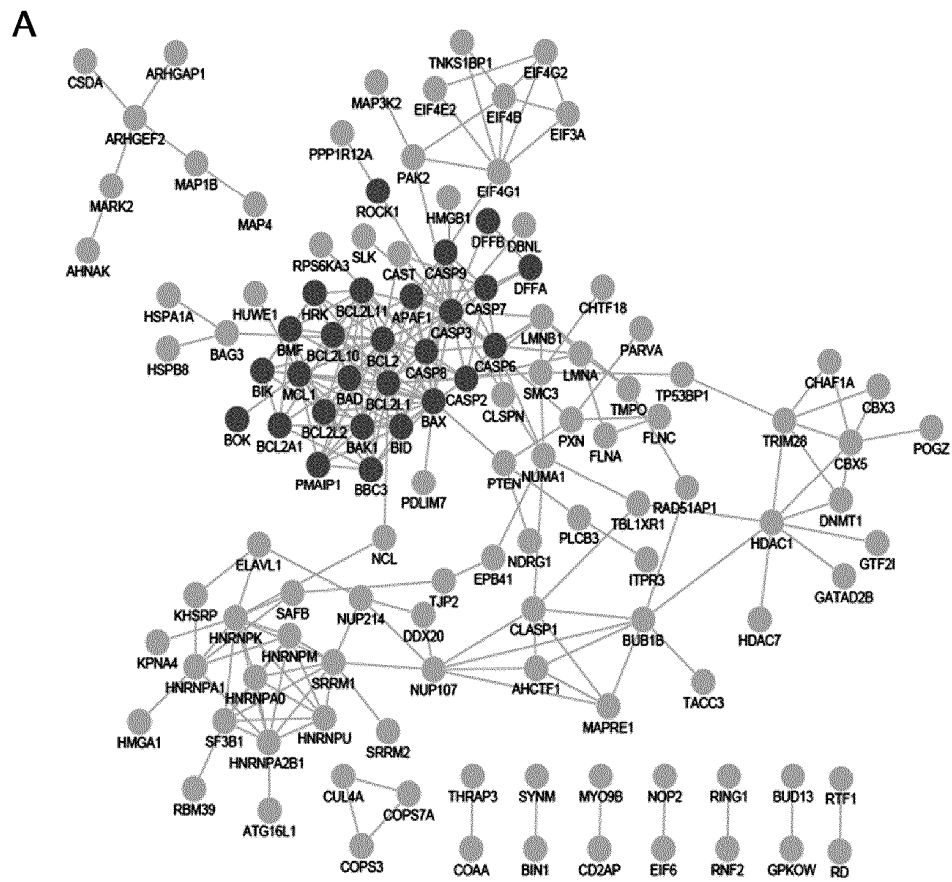


Figura 9



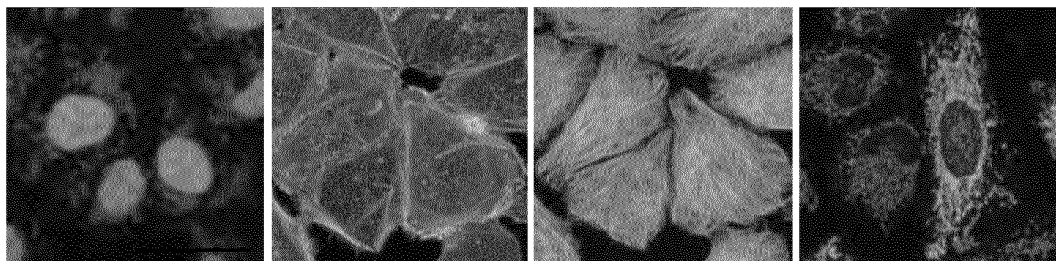
B

a

b

C

d



1

11

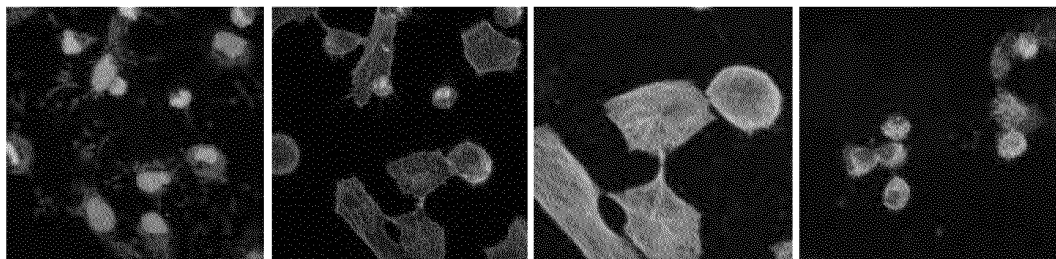
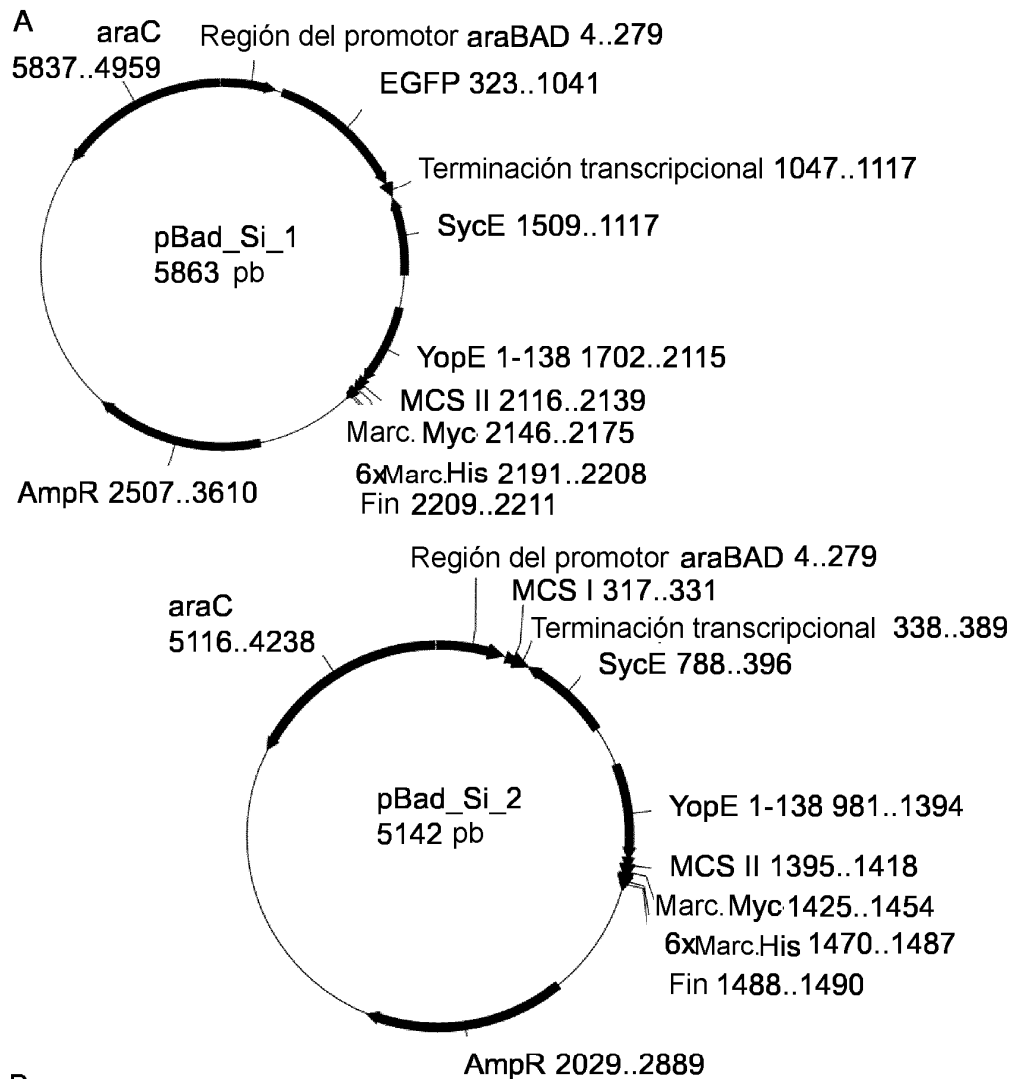


Figura 10



B

YopE1-138 XhoI XbaI BstBI

GTTCGCCACG CTCGAGTCTA GATTCGAA

HindIII epitopo *myc*

AAGCTTGGGC CCGAACAAAA ACTCATCTCA

GAAGAGGATCTGAATAGCGC CGTCGACCAT

6x Marc. His * * *

CATCATCATC ATCATTGAGT TTAAACGGTC

TCCAGCTTGG CTGTTTTGG C

Figura 11

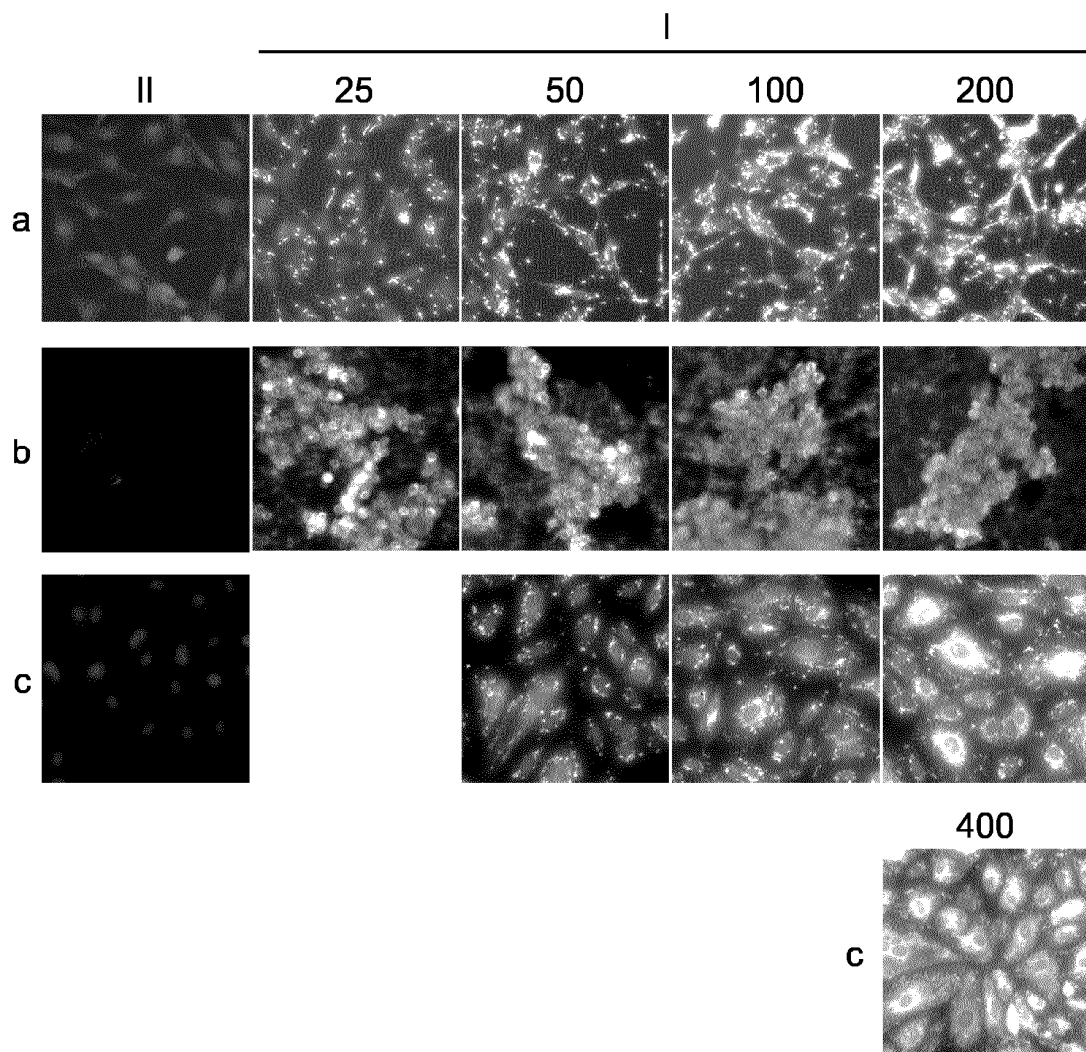


Figura 12

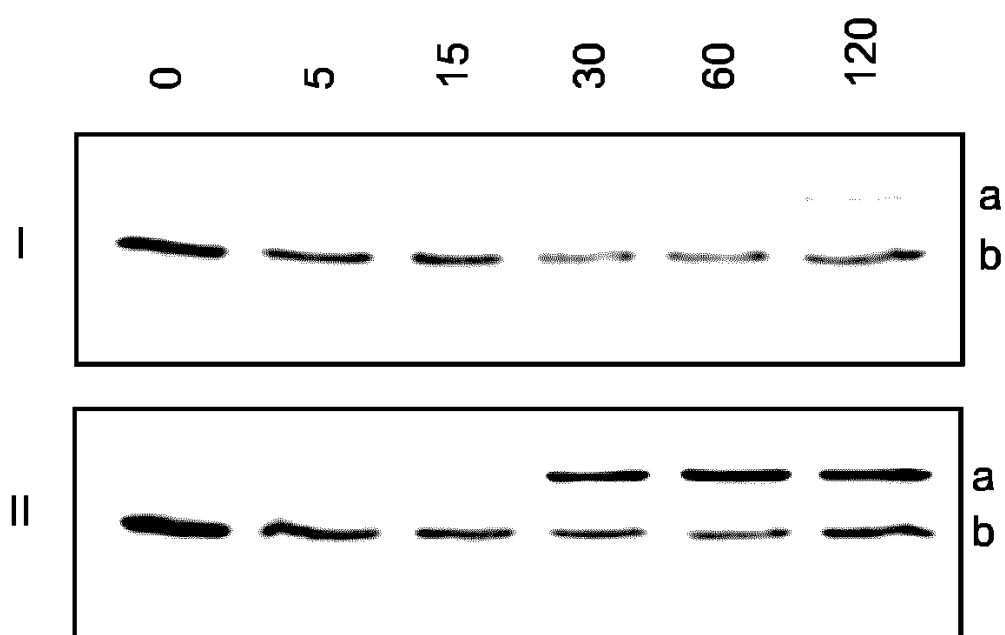
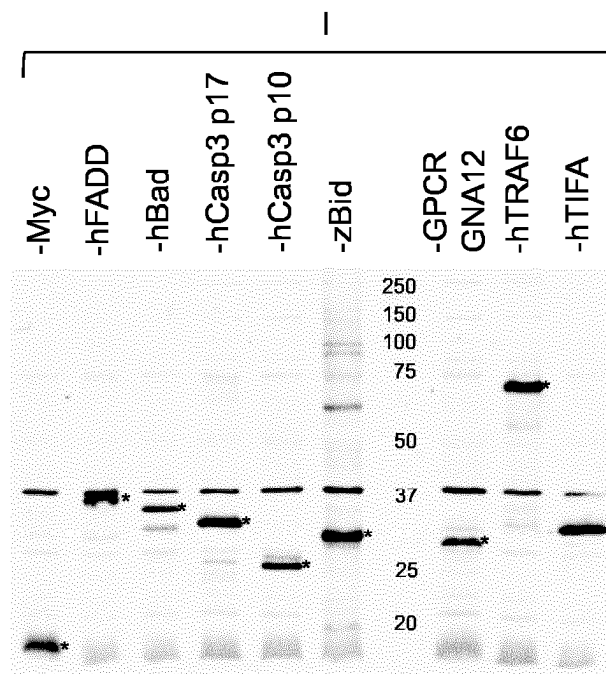


Figura 13

A



B

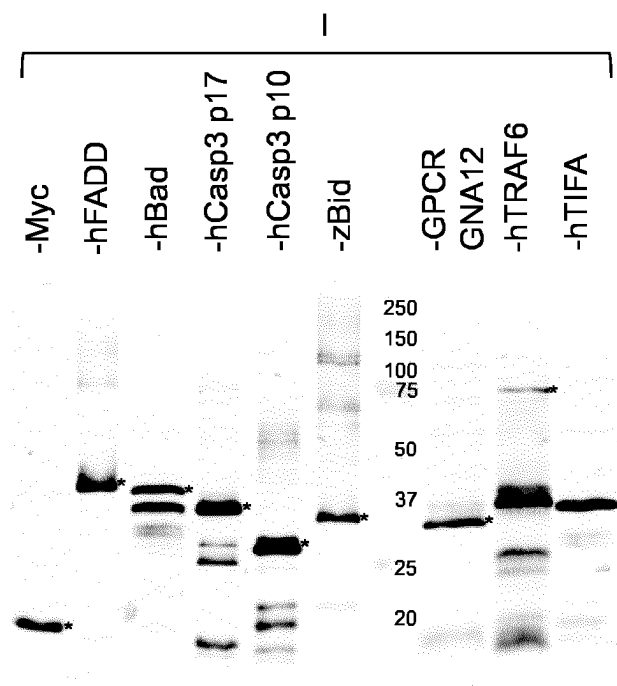
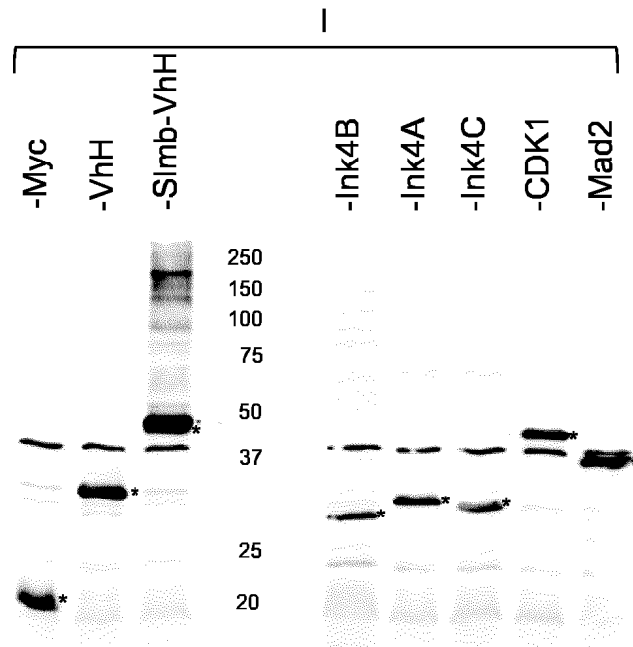


Figura 14

A



B

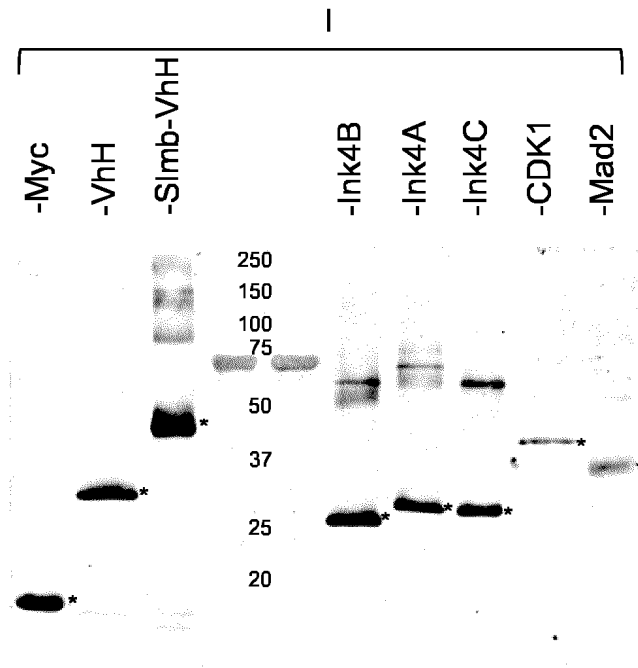


Figura 15A

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	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T	MRS40 pIML421 [yopHΔ1-352, yopOΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]					Nal	Iriarte y Cornelis, 1998
ΔHOPEMT asd yopB	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T ΔyopB	MRS40 pIML421 [yopBΔ89-217, yopHΔ1-352, yopOΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]					Nal Kan	
ΔHOPEMT asd	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd	MRS40 asdΔ292-610 pIML421 [yopHΔ1-352, yopOΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]					Nal	Kudryashev et al., 2013
ΔHOPEMT asd inv	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd ΔinvA	MRS40 asdΔ292-610 invAΔ352-2225::aphA-3 pIML421 [yopHΔ1-352, yopOΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]				445/446, 447/448, 449/450	Nal Kan	
ΔHOPEMT asd inv yadA	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd ΔinvA ΔyadA	MRS40 asdΔ292-610 invAΔ587-836 (vector de cointegración) yadAΔ89-354::aphA3 pIML421 [yopHΔ1-352, yopOΔ65-558, yopP23, yopE21, yopM23, yopT135]				352/353, 354/355, 356/357	Nal Kan Tet	

Figura 15B

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
Δ HOPEMT asd pBad_Si1	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ 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	
Δ HOPEMT asd pBad_Si2	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ asd	fragmento SycE-YopE1-138-MycHis	YopE1- 138- MycHis	pBad- MycHisA (Invitrogen)	pBad_Si_2	287/288 (sycE- YopE1- 138)	Nal Amp	
Δ HOPEMT asd pSi_16	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ asd		YopE1- 138- IpgB1	pBad_Si_2	pSi_16	292/293	Nal Amp	
Δ HOPEMT asd pSi_20	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ asd		YopE1- 138- SopE	pBad_Si_2	pSi_20	296/297	Nal Amp	
Δ HOPEMT asd pSi_22	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ asd		YopE1- 138- Rac1 Q61L	pBad_Si_2	pSi_22	299/300	Nal Amp	
Δ HOPEMT asd pSi_24	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ 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:	Resistencia	Referencia bibliográfica
Δ HOPEM T asd pSi_28	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ asd		YopE1-138-SopE-MyxHis	pBad_Si_2	pSi_28	296/306	Nal/Amp	
Δ HOPEM T yopB asd pSi_28	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ yopB Δ asd		YopE1-138-SopE-MyxHis	pBad_Si_2	pSi_28	296/306	Nal/Amp	
Δ HOPEM T asd pSi_30	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ asd		YopE1-138-SopB	pBad_Si_2	pSi_30	307/308	Nal/Amp	
Δ HOPEM T asd pSi_37	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ asd		YopE1-138-FADD	pBad_Si_2	pSi_37	367/386	Nal/Amp	
Δ HOPEM T asd pSi_38	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ asd		YopE1-138-OspF	pBad_Si_2	pSi_38	317/318	Nal/Amp	
Δ HOPEM T asd pSi_43	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ asd		YopE1-138-BepG 715-end	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:	Resis- tencias	Referencia bibliográfica
ΔHOPEMT asd pSi_51	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Rac1 Q61L- MycHis	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- MycHis	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:	Resis- tencias	Referencia bibliográfica
ΔHOPEMT asd pSi_85	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Bid	pBad_Si_2	pSi_85	387/391	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_87	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-t-Bid	pBad_Si_2	pSi_87	389/391	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_97	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Caspasa3 p17	pBad_Si_2	pSi_97	403/406	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_103	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-GPCR GNA12	pBad_Si_2	pSi_103	410/413	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_106	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Caspasa3 p10/12	pBad_Si_2	pSi_106	417/420	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_111	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-IpgD	pBad_Si_2	pSi_111	423/424	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_112	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138-Slmb1- VhH4-NLS	pBad_Si_2	pSi_112	341/425	Nal Amp	

Figura 15F

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:	Resis- tencias	Referencia : bibliográfica
Δ HOPEMT asd pSi_116	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M, T Δ asd		YopE1-138-z-Bid	pBad_Si_2	pSi_116	428/430	Nal Amp	
Δ HOPEMT asd pSi_117	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M, T Δ asd		YopE1-138-z-t-Bid	pBad_Si_2	pSi_117	429/430	Nal Amp	
Δ HOPEMT asd pSi_118	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M, T Δ asd		YopE1-138-BepA E305- end	pBad_Si_2	pSi_118	433/435	Nal Amp	
Δ HOPEMT asd pSi_119	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M, T Δ asd		YopE1-138-BepA	pBad_Si_2	pSi_119	434/435	Nal Amp	
Δ HOPEMT asd pSi_120	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M, T Δ asd		YopE1-138-ET1	pBad_Si_2	pSi_120	436/437	Nal Amp	
Δ HOPEMT asd pSi_121	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M, T Δ asd		YopE1-138-z-BIM	pbad_Si_1	pSi_121	438/439	Nal Amp	
Δ HOPEMT asd pSi_124	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M, T Δ asd		YopE1-138-VhH4 nanocuerpo que reconoce EGFP	pBad_Si_2	pSi_124	451/373	Nal Amp	

Figura 15G

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:	Resis- tencias	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	Inserción/ características importantes	Proteína que va a ser transportada por T3SS	Esqueleto del plásmido	Nombre del plásmido resultante	Cebadores, SEQ NO:	Resistencias	Ref. bibliográfica
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 15I

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:	Resis- tencias	Referencia bibliográfica
ΔHOPEMT asd pSi_318	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138- parte BH3 de tBid murino con codones optimizados para Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_318	677/678	Nal Amp	
ΔHOPEMT asd pSi_322	Y. enterocolitica ΔyopH,O,P,E,M,T Δasd		YopE1-138- parte BH3 de Bax murino con codones optimizados para Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_322	682/683	Nal Amp	
S. enterica SL1344 ΔaroA	S. enterica subsp. enterica serovar Typhimurium SL1344 ΔaroA							Hoiseth y Stocker, 1981
S. enterica ΔaroA pSi_266	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA1-20	pBad- MycHisA (Invitrogen)	pSi_266	580/612	Amp	
S. enterica ΔaroA pSi_267	S. enterica SL1344 ΔaroA		SteA	pBad- MycHisA (Invitrogen)	pSi_267	580/613	Amp	

Figura 15J

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:	Resis- tencias	Ref. biblio.
S. enterica Δ aroA pSi_268	S. enterica SL1344 Δ aroA		SopE1-80	pBad- MycHisA (Invitrogen)	pSi_268	614/615	Amp	
S. enterica Δ aroA pSi_269	S. enterica SL1344 Δ aroA		SopE1-104	pBad- MycHisA (Invitrogen)	pSi_269	614/616	Amp	
S. enterica Δ aroA pSi_270	S. enterica SL1344 Δ aroA		SteA1-20- tBid murino con codones optimizados para S. enterica	pSi_266	pSi_270	construcción sintética	Amp	
S. enterica Δ aroA pSi_271	S. enterica SL1344 Δ aroA		SteA- tBid murino con codones optimiz. para S. enterica	pSi_267	pSi_271	construcción sintética	Amp	
S. enterica Δ aroA pSi_272	S. enterica SL1344 Δ aroA		SopE1-80- tBid murino con codones optimizados para S. enterica	pSi_268	pSi_272	construcción sintética	Amp	
S. enterica Δ aroA pSi_273	S. enterica SL1344 Δ aroA		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. biblió.
Δ HOPEMT asd pSi_362	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ asd		YopE1-138-Ink4A 84-103 con codones optimizados para Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_362	745/746	Nal Amp	
Δ HOPEMT asd pSi_363	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ asd		YopE1-138-péptido inhibidor de ciclina I/Cdk2 con codones optimizados para Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_363	747/748	Nal Amp	
Δ HOPEMT asd pSi_364	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ asd		YopE1-138-p21 de péptido 10 (DtoA) con codones optimizados para Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_364	749/750	Nal Amp	
Δ HOPEMT asd pSi_366	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ asd		YopE1-138-centro p21 de péptido 10 y 11 con codones optimizados para Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_366	753/754	Nal Amp	
Δ HOPEMT asd pSi_367	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ asd		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	Inserción/ características importantes	Proteína que va a ser transportada por T3SS	Esqueleto del plásmido	Nombre del plásmido resultante	Cebadores, SEQ NO:	Resis- tencias	Ref. biblio.
Δ HOPEMT asd pSi_368	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ asd		YopE1-138- pep5 de G1/S ciclina D2 con codones optimizados para Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_368	757/758	Nal Amp	
S. enterica Δ aroA pSi_333	S. enterica SL1344 Δ aroA		SteA-Ink4a-MycHis	pSi_267	pSi_333	703/704	Amp	
S. enterica Δ aroA pSi_334	S. enterica SL1344 Δ aroA		SopE1-104-Ink4a- MycHis	pSi_269	pSi_334	703/704	Amp	
S. enterica Δ aroA pSi_335	S. enterica SL1344 Δ aroA		SteA-Ink4c-MycHis	pSi_267	pSi_335	705/706; 707/708; 705/708	Amp	
S. enterica Δ aroA pSi_336	S. enterica SL1344 Δ aroA		SopE1-104-Ink4c- MycHis	pSi_269	pSi_336	705/706; 707/708; 705/708	Amp	
S. enterica Δ aroA pSi_337	S. enterica SL1344 Δ aroA		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 Δ aroA pSi_338	S. enterica SL1344 Δ aroA		SopE1-104-Mad2-MycHis	pSi_269	pSi_338	709/710	Amp	
S. enterica Δ aroA pSi_339	S. enterica SL1344 Δ aroA		SteA-Cdk1-MycHis	pSi_267	pSi_339	711/712	Amp	
S. enterica Δ aroA pSi_340	S. enterica SL1344 Δ aroA		SopE1-104-Cdk1-MycHis	pSi_269	pSi_340	711/712	Amp	
Δ HOPEMT asd pSi_315	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ asd		YopE1-138-tBid murino con codones optimizados para Y. enterocolitica	pBad_Si_2	pSi_315	construcción sintética	Nal Amp	
Δ HOPEMT asd pSi_236	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ asd		YopE1-138-Ubiquitina	pBad_Si_2	pSi_236	585/586	Nal Amp	
Δ HOPEMT asd pSi_237_II	Y. enterocolitica Δ yopH,O,P,E,M,T Δ asd		YopE1-138-Ubiquitina-Flag-INK4C-MycHis	pSi_236	pSi_237_II	588/509	Nal Amp	

Figura 16

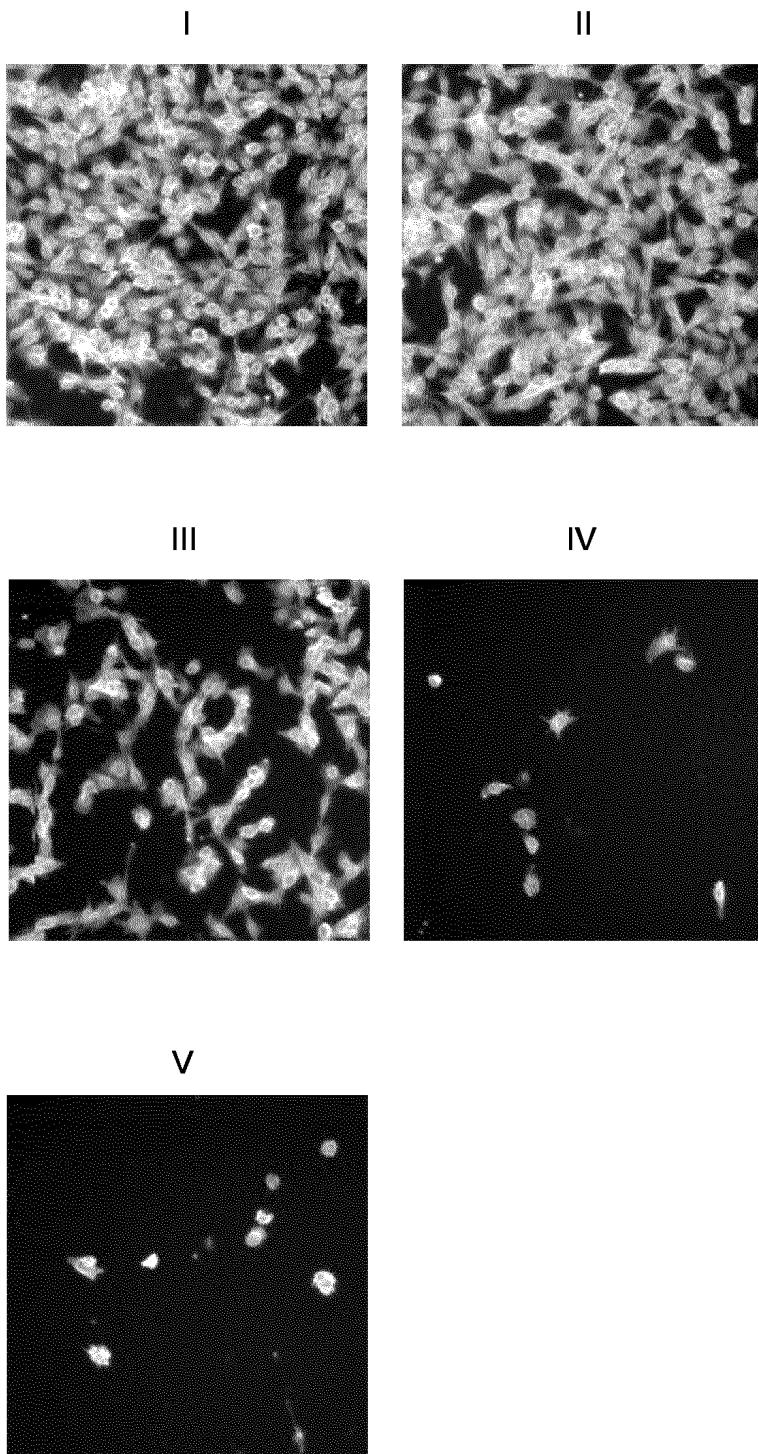


Figura 17

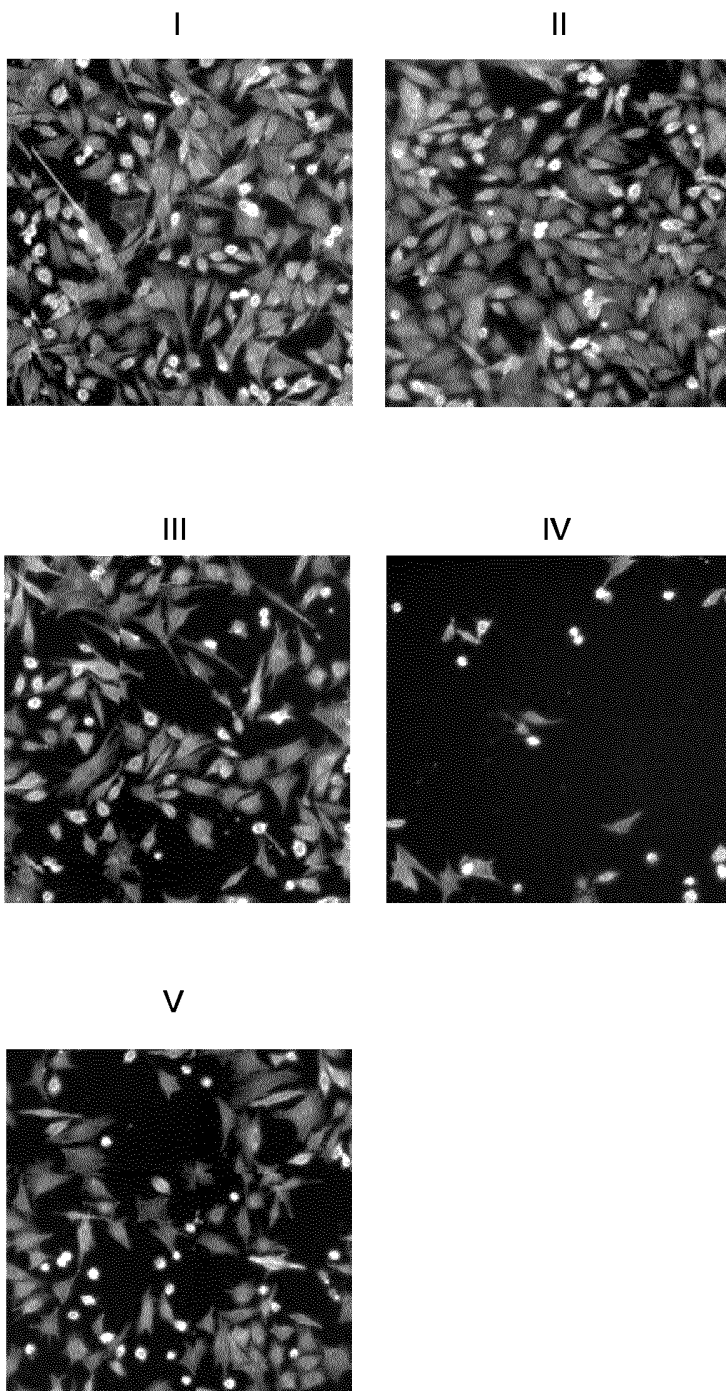


Figura 18

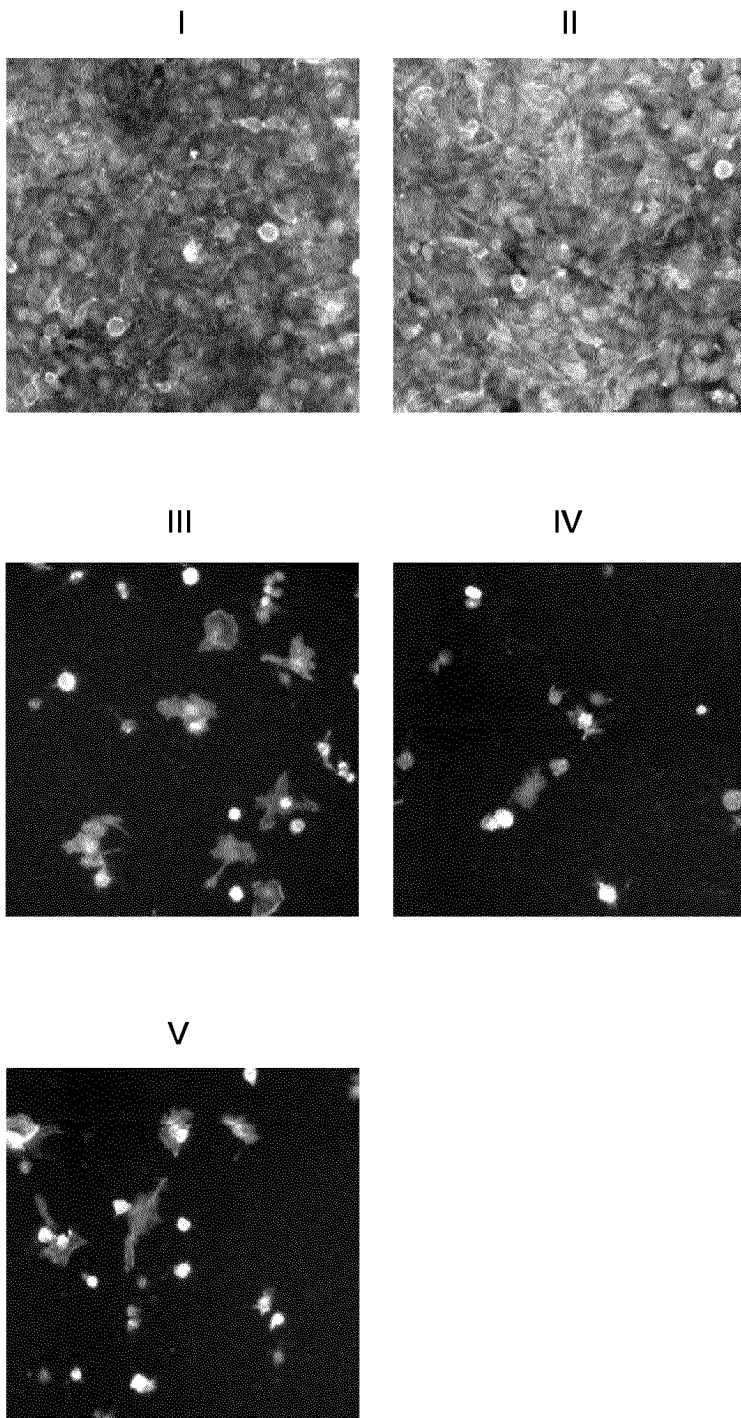


Figura 19

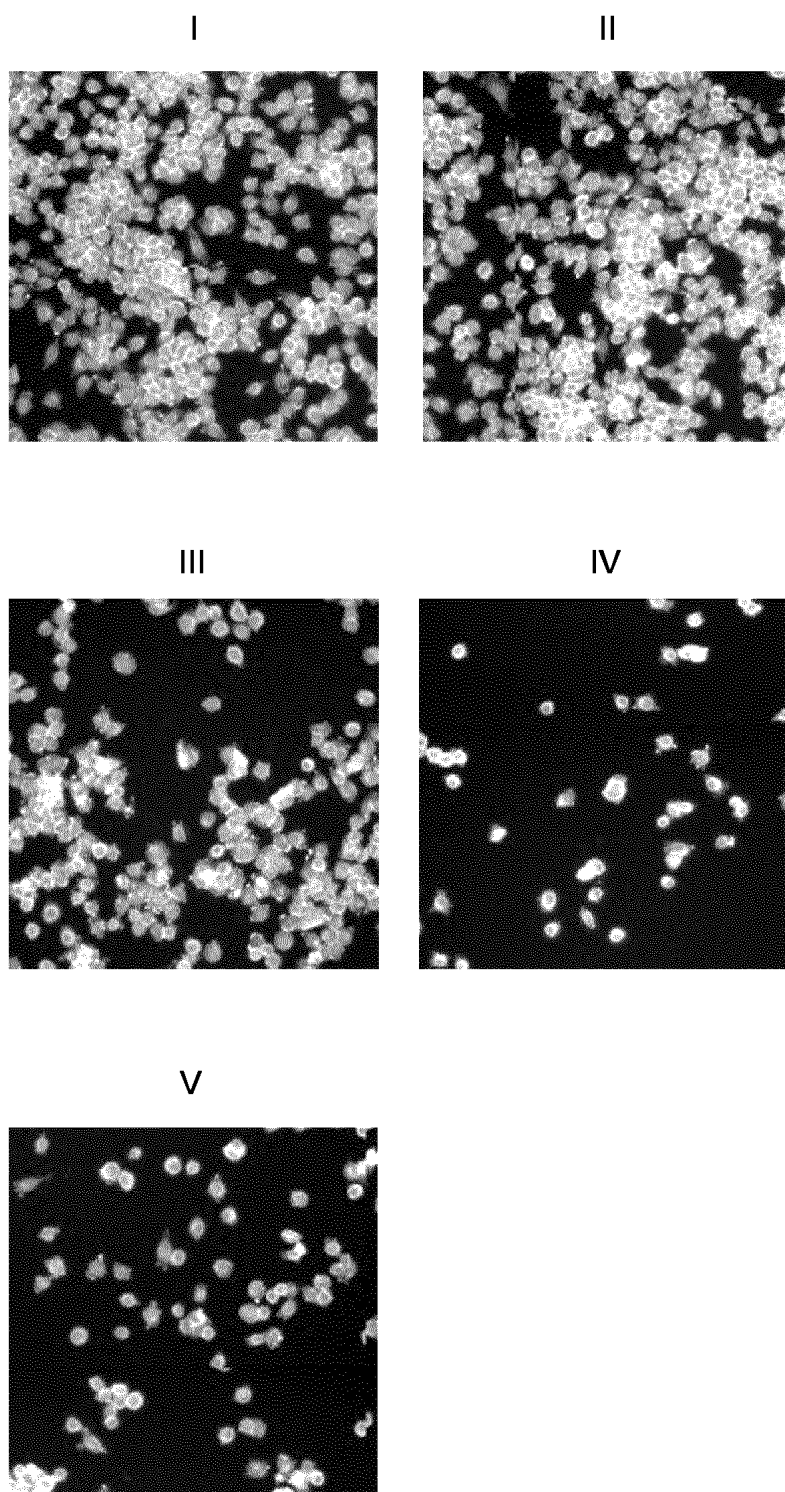


Figura 20

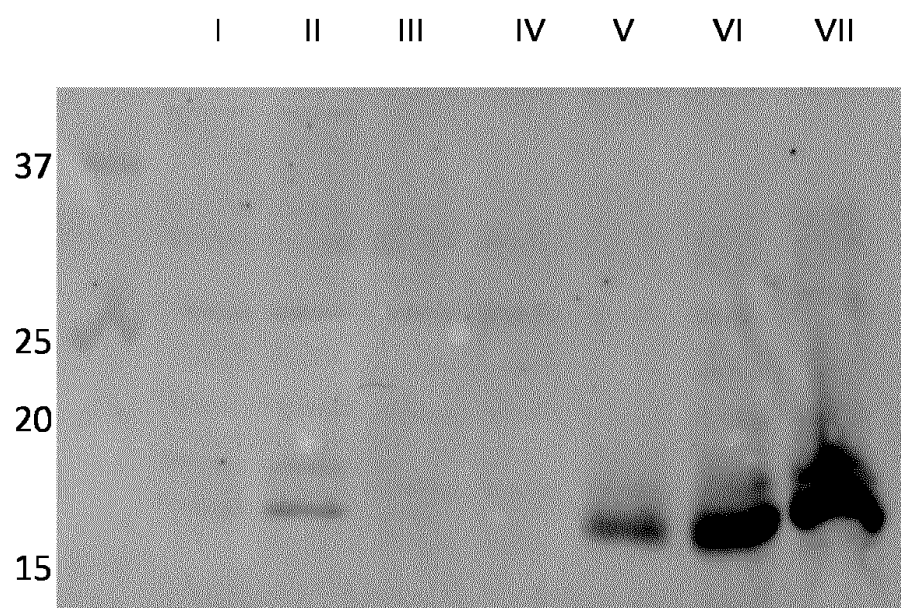


Figura 21

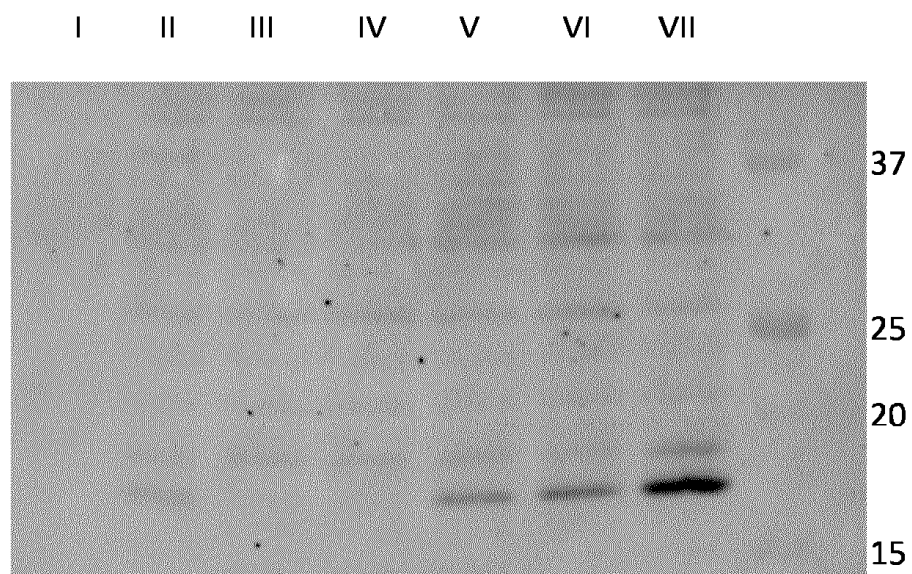


Figura 22

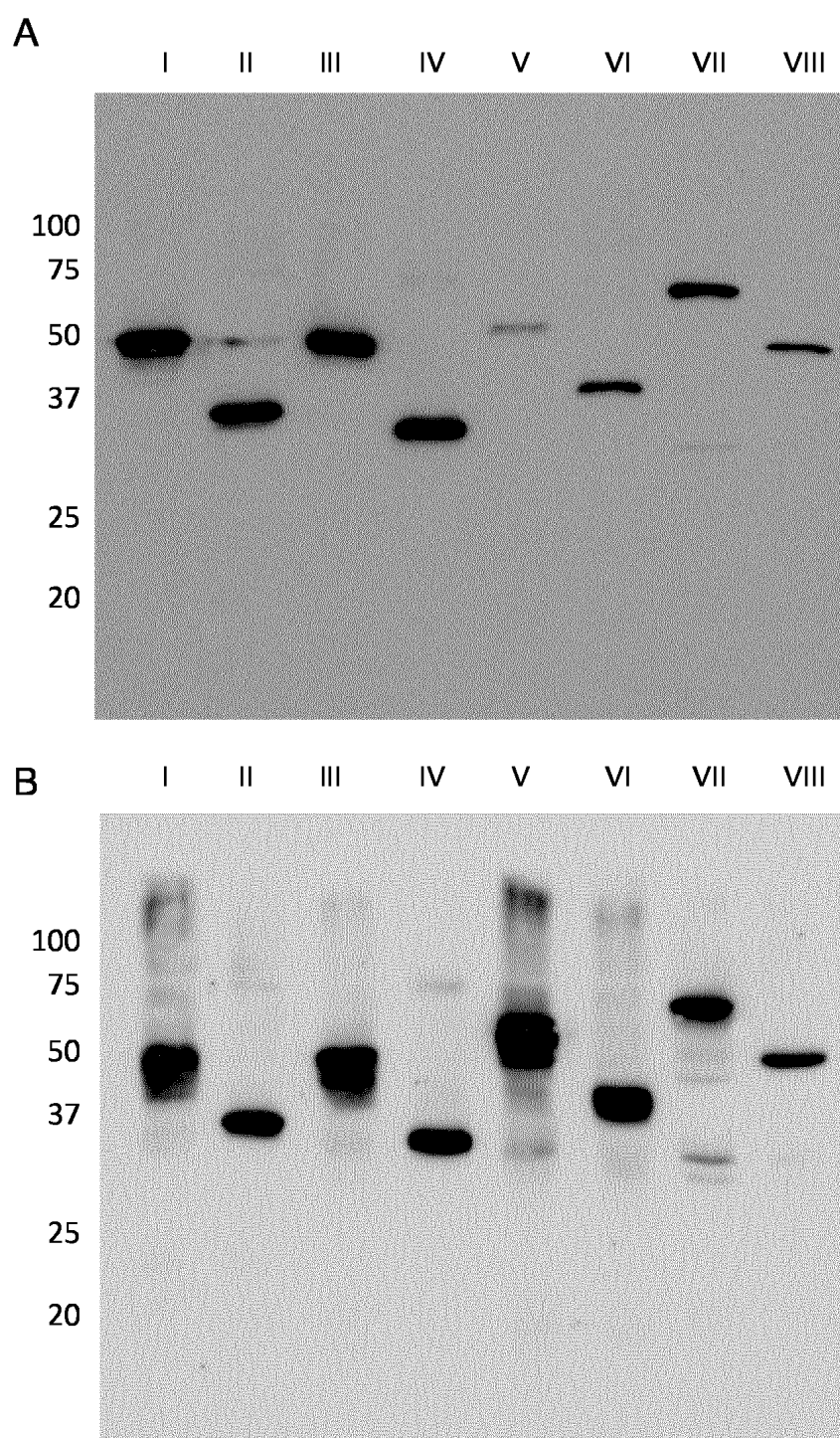


Figura 23

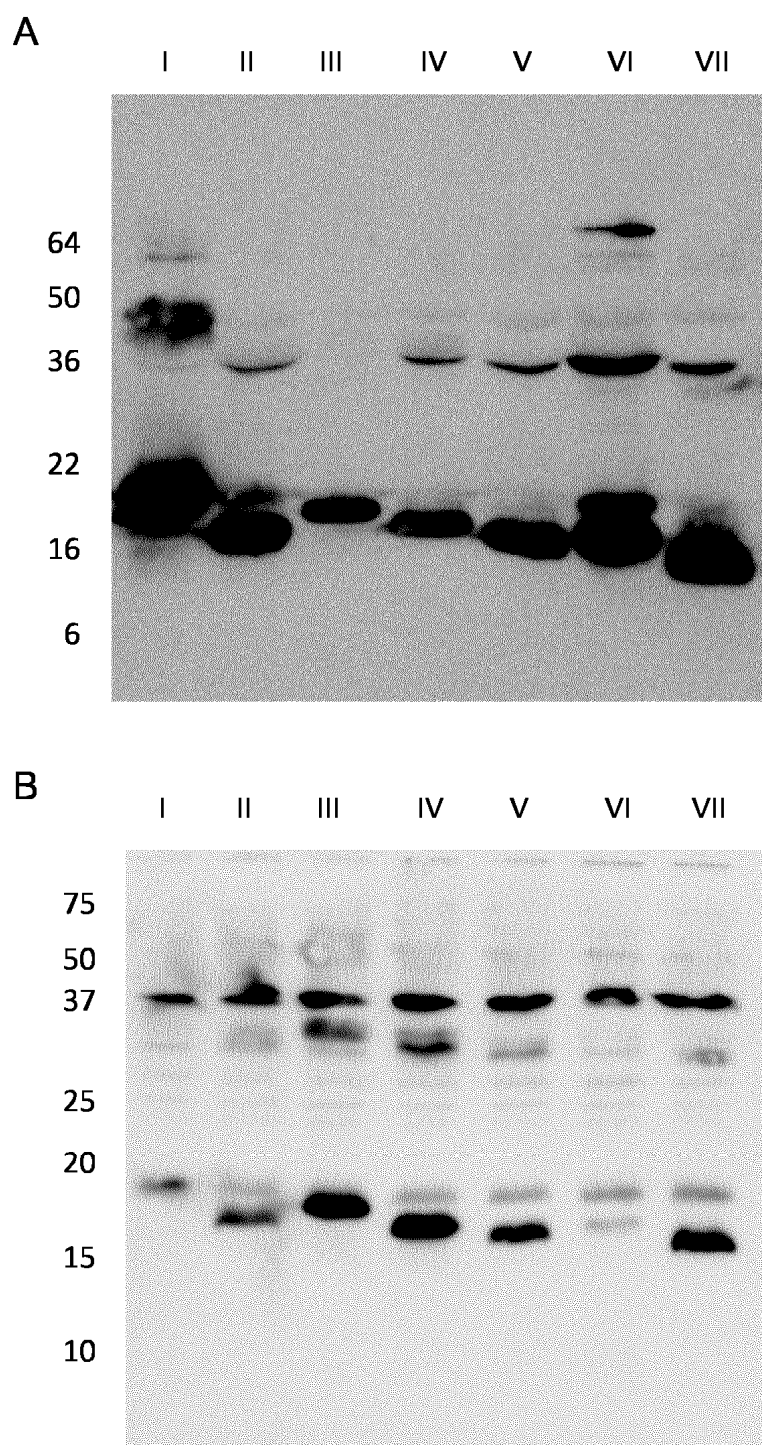


Figura 24

