



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

V. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2023ko maiatzaren 17, 18 eta 19a
Donostia, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)



Aitortu-PartekatuBerdin 3.0

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**Tse5, bakterioen arteko lehian
arrakastarako giltza**

*Jon Altuna Alvarez,
Amaia González Magaña
eta David Albesa Jové*

255-262 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.v.05.32>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



LAGUNTZAILEAK:



Tse5, bakterioen arteko lehia arrakastarako giltza

Jon Altuna Alvarez¹, Amaia González-Magaña¹, David Albesa-Jové¹

Biofisika Bizkaia Fundazioa (FBB) eta Biokimika eta Biologia Molekularreko departamentua, Biofisika Institutua (CSIC, UPV/EHU), Euskal herriko Unibertsitatea, Leioa (48940), Espainia.
jon.altunaa@ehu.eus

Laburpena

Bakterioek bere lehiakideetatik libratzeko hainbat mekanismo garatu dituzte, euren artean *Pseudomonas aeruginosa*, erasorako toxina anitzak garatu ditu. Proteina efektoreen artean Tse5 efektorea lehia horretan pieza klabea da. Ikerketa lan honetan Tse5-CT domeinu toxikoaren efektua eta itu zelularra aztertu da. Eskuratutako emaitzek Tse5-CT domeinuak itu zelularen mintzean txertatzeko ahalmena duela deskribatu da. Baita mintzaren despolarizazioa eragiteko kapazitatea duela aurkeztu da.

Hitz-gakoak: *P. aeruginosa*, T6SS, bakterio-efektorea, Tse5, mintzaren despolarizazioa

Abstract

Bacteria have developed several mechanisms to get rid of their competitors, including Pseudomonas aeruginosa, which has developed multiple toxins to attack. Among the effector proteins, the Tse5 effector is a key piece in this competition. In this research work, the effect of the Tse5-CT toxic domain and its cellular fate have been analyzed. The obtained results have described the potential of Tse5-CT domains to insert into the cell membrane. It has also been shown to have the capacity to cause membrane depolarization.

Keywords: P. aeruginosa, T6SS, bacterial effector, Tse5, membrane depolarisation

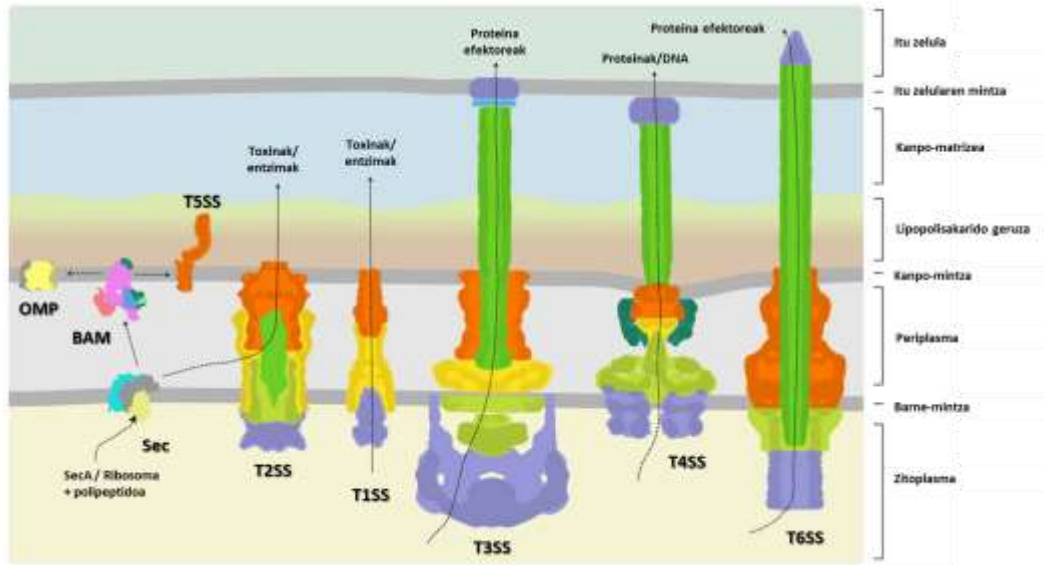
1. Sarrera eta motibazioa

Bakterioak gerra iraunkor batean daude bere inguruneke beste zelulekin, horretarako mekanismo errepertorio zabala garatu dute eboluzioan zehar, bere kolonizazioa eta biziraupena bermatzeko. Beste espezien aurkako borrokarako mekanismoen artean proteinak jariatzeko sistemak daude. Sistema hauek infekzioaren hainbat etapetan funtsezkoak dira, hala nola: toxinen jariatzean, geneen transferentzia-horizontalean eta zelula ostalariaren inbasioan. Orain arte bakterio Gram-negatiboen barnean sei jariatze-sistema mota aurkitu dira, Itik VI izendatuak (T1SS-T6SS, ingelesezko sigleetatik). Sistema hauek DNA zein proteinak jaria dezakete zelularen kanpo-mediora edota itu zelularen barnera (**1. irudia**).

Prozesu patogenikoetako gogortasuna dela eta, interes handia dago VI. motako jariatze-sisteman (T6SS, *Type VI Secretion System*), batez ere giza bakterio patogenoetan, hala nola: *Vibrio cholerae* (Pukatzki *et al.*, 2006), *Salmonella enterica* (Wang *et al.*, 2011), *Serratia marcescens* (Murdoch *et al.*, 2011) eta, bereziki, *Pseudomonas aeruginosa* (Mougous *et al.*, 2006), lan honetako zentroa.

T6SS sistema 2006. urtean aurkitu zen (Mougous *et al.*, 2006; Pukatzki *et al.*, 2006) xiringa formako nano-erraminta da. Nitxo ekologikoa kontrolatzeko funtsezko pieza gisa nabarmendu zen. Hala, toxinak itu zelularen periplasma edo zitoplasman zuzenean txertatzeko ahalmena du (Cianfanelli *et al.*, 2016).

1. irudia. Gram-negatiboen jariatzen-sistema nagusien arkitektura (Gunasinghe *et al.*, 2017).



P. aeruginosa antibiotikoekiko erresistentzia mekanismo anitzak garatu dituen patogeno Gram-negatiboa da. Hori dela eta, Munduko Osasunaren Erakundeak (MOE) patogenoen aurkako antibiotiko berriak garatzeko lehentasunaren zerrendan bigarren postuan kokatzen du (WHO, 2017). Gizakiengan infekzio oportunistak sortzeko ahalmen handia du; azala, odola, gernu-sistema, entzumen-organo eta arnas bideak infektatuz, azken honetan pneumonia sortuz. *P. aeruginosa* gaixotasun nosokomialen eragile nagusietako bat da, hilgarria izan daiteke zainketa intentsiboetako unitatean (ZIU) ingratutako paziente, fibrosi kistikoa gaixo eta immuno-arriskuan dauden pertsonengan. Infektatzeko gaitasuna bakterio honek duen T6SS sistemarekin lotuta dago, baita honen bidez jariatzen diren efektoreei (Mougous *et al.*, 2006).

T6SS honen bidez jariatzen diren efektoreak jarduten duten funtzio toxikoaren eta bere itu zelularren arabera sailkatzen dira. Orain arte, hurrengo jarduera toxikoa duten efektoreak deskribatu dira:

- **Tse1** eta **Tse3** (Russell *et al.*, 2011) bakterioen paretan zelularra degradatzen dituzten efektoreak dira, hauek endopeptidasa (Benz *et al.*, 2012; Chou *et al.*, 2012) eta muramidasa (Lu *et al.*, 2013) funtzioa dute, hurrenez hurren.
- **Tse2** eta **Tse6** NAD(P)⁺ molekularen degradazioaren bidez itu zelulan efektu bakterioestatikoa kausatzen duten entzimak dira (Robb *et al.*, 2016; Whitney *et al.*, 2014), NAD(P)⁺ molekularrekin erlazionatutako inhibizioak zelula-orekaren galera sortzen dutelarik.
- **Tse4** mintz-zelularra eraso eta barne-mintzaren ioiekiko iragazkortasuna emendatzen duen proteina poro eragilea da (Whitney *et al.*, 2014).
- **Tse7** DNA itu bezala duen endonukleasa entzima da, azido nukleikoak degradatuz zatiketa zelularra blokeatzen duena (Pissaridou *et al.*, 2018; Whitney *et al.*, 2014).
- **Tse8** amida taldeak hidrolizatzeko gaitasuna duen entzima da, proteinen sintesiarekin loturiko arazoak sor ditzakeena (González-Magaña *et al.*, 2020; Nolan *et al.*, 2021).
- **Tse5** 2014. urtean deskribatu zen lehenengo aldiz Alan Filouxen (Hachani *et al.*, 2014) eta Joseph Mougousen taldeengatik (Whitney *et al.*, 2014). Bi taldeek Tse5 efektorearen jarduera bakteriolotikoa deskribatu zuten, baina honen jarduera molekularra deskribatu gabe gelditu zen. Tse5 pisu molekular handiko toxina da (145 kDa), hiru domeinutan banatzen dena: N-

muturra (Tse5-NT), domeinu zentrala (Tse5-Rhs) eta C-muturra (Tse5-CT). Tse5-CT efektorearen eskualde toxikoa da, hori dela eta lan honen muina bihurtu da.

T6SS jariapen-sistemari asoziatutako efektoreek bakterio-zelula zein zelula-eukariotoen gainean efektu toxikoa dute. Efektu toxikoa efektorea ekoizten duen zeluletan edo ahizpa-zeluletan (espezie berdinekoak diren zelulak) galarazteko immunitate-proteinak garatu dituzte. Immunitate-proteinek efektorea zehazki ezagutzen dute, bere toxikotasuna neutralizatuz.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

P. aeruginosa eragin handiko patogeno oportunistak bat da. Efektore kopuru handiak eta haien aniztasun funtzionalak garrantzi handia dute bakterio Gram-negatibo honek eragindako infekzioaren birulentzian. Horregatik, garrantzi handia du *P. aeruginosa*ren efektore ezberdinen ekintza-mekanismoa eta funtzioa ikertzeak eta ulertzeak.

Lan honetan, Tse5 efektorearen domeinu toxikoaren (Tse5-CT) funtzio biologikoa zehaztu nahi dugu, *P. aeruginosa* bakterioaren VI. motako jariatze sistemaren (T6SS) menpeko toxina bat. Gure hipotesi nagusia da Tse5-CT domeinuak bere jarduera toxikoa mintz zitoplasmatikoan egiten duela, bere immunitate-proteina (Tsi5) bakterio Gram-negatiboaren barne-mintzean kokatzen dela deskribatu baita (Whitney *et al.*, 2014). Horri gehituta Tse5-CT peptido oso hidrofoboa da, mintzean ere sar litekeela iradokitzen duena.

Domeinu toxikoaren funtzio biologikoa eta itu zelularra ikertzeko hainbat helburu eta estrategia desberdin finkatu dira. Lehenik Tse5-CT peptidoaren efektua *Pseudomonas putida* zeluletan deskribatzea da. Baita, domeinu toxikoak permeabilizazio edota despolarizazio efektuak aztertzea da. Azkenik, mintz biologikoetan txertatzeko ahalmena deskribatzea da.

3. Ikerketaren muina

3.1. Tse5-CT domeinuak *P. putida* zeluletan eragin bakteriolitikoa du, Tsi5 immunitate-proteinaren koadierazpenarekin inhibitu daitekeena.

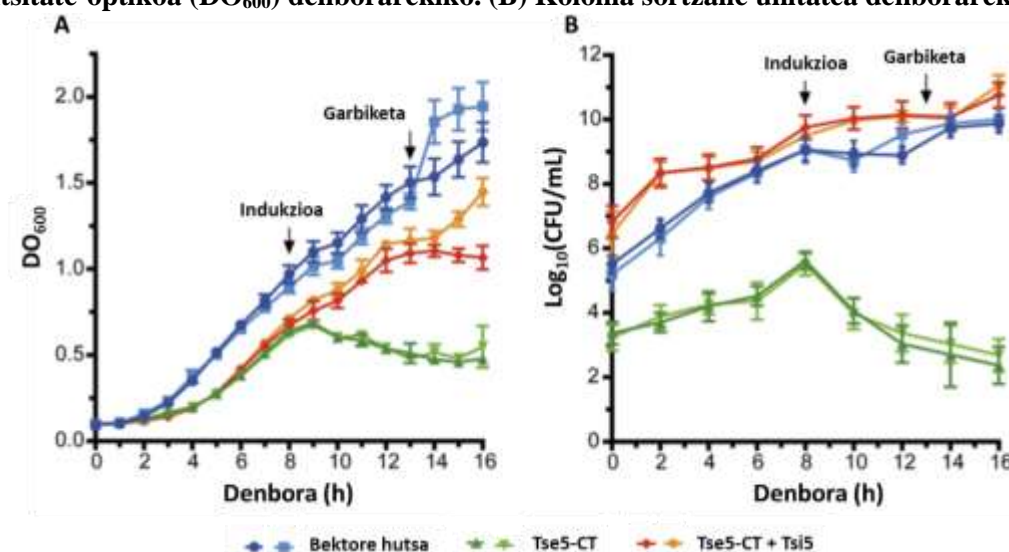
Tse5 efektorearen domeinu toxikoak *P. putida* zelulen gainean duen efektua deskribatzeko zelula-kultiboaren dentsitate optikoa (DO₆₀₀) eta kolonia sortzaile unitatea mililitroko (CFU/mL) jarraitu da. Teknika honek toxinak bakterioen gainean efektu bakteriolitikoa (zelulen apurtzea) edo bakterioestatikoa (zelula zatiketaren inhibizioa) desberdintzeko aukera ematen digu.

Entsegu honetan *P. putida* zelulak Tse5-CT kodifikatzen duten plasmidoekin transformatu dira, baita inolako proteinarik adierazten ez duten plasmidoekin, kontrol negatibo bezala. Bestaldetik, Tsi5 immunitate-proteina adierazten duten plasmidoekin kotransformatu dira, efektorearen toxikotasuna inhibitzeko gaitasuna ikertzeko erabili dira.

2A. irudian adierazi bezala, Tse5-CT ekoizten duten zeluletan (berdea) zelula-kultiboaren dentsitate-optikoa murrizten da, Tse5-CT toxikoa dela bermatuz. Bestetik, inolako proteina kodifikatzen ez duten plasmidoekin transformatutako zelula-kultiboaren (urdina) dentsitate-optikoa areagotu egiten da, inolako efektu toxikorik erakutsi gabe. Azkenik, Tse5-CT eta Tsi5 adierazten duten plasmidoak dituzten zelula-kultiboetan (gorri-laranja) ikusi daiteke toxina eta immunitate-proteina koadieraztean dentsitate-optikoa areagotu egiten da, immunitate-proteinak toxinaren efektua blokeatzeko gai dela berretsiz.

2B. irudian emaitza berdina lortzen ditugu, kolonia sortzaile unitatea aztertuz Tse5-CT (berdea) proteinaren efektu toxiko berdina deskribatzen da, zelula-kultiboan dagoen kolonia sortzaile unitatea txikiagotzen baita toxina adierazi orduko. Tse5-CT toxinak *P. putida* zelulen gainean efektu bakteriolitikoa duela konfirmatuz. Baita immunitate-proteinaren presentzian efektu toxikoa neutralizatzen dela (gorri-laranja), kolonia sortzaile unitatea areagotzen baita.

2. irudia. Tse5-CT-aren adierazpenak eragindako efektu biologikoa *P. putida* zeluletan. (A) Dentsitate-optikoa (DO₆₀₀) denborarekiko. (B) Kolonia sortzaile unitatea denborarekiko.



3.2. Tse5-CT toxinak *P. putida* zelulen despolarizazioa eragiten du, Tsi5 peptidoaren bidez blokeatu daitekeena.

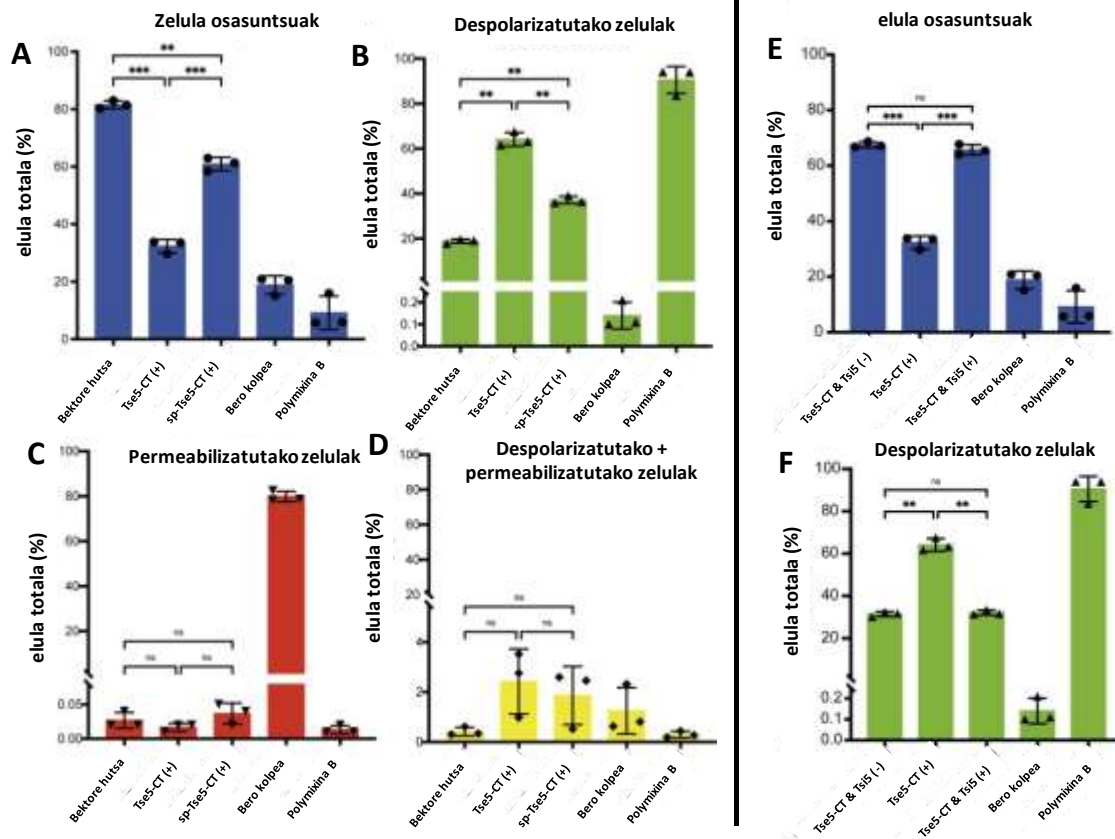
Tse5-CT toxinak *P. putida* zelulen mintza permeabilizatzeko edota despolarizatzeko ahalmena aztertu da. Horretarako, bi sonda fluoreszenteen seinalea neurtu da. SytoxTM Deep Red (permeabilizazioa) DNA molekuletara batzen den sonda gorria da, mintza zeharkatzeko ahalmena ez duena. Beraz, zelula osasuntsuetan; hau da, mintzaren integritatea mantentzen dutenak, ez ditu markatuko, bai honen mintzean poroak sortu diren zeluletan. Bestetik, DiBAC₄(3) (despolarizazioa) zitoplasmako proteinak batzen dituen sonda anioniko berdea da. Zelula osasuntsuetan zitoplasmak karga neto negatiboa du, beraz, aldarapen elektrostatiakoaren eraginagatik ez ditu zelulak markatuko, baina mintz-potentzialaren asaldurak gertatzen direnean zelulak markatuko ditu. Bero kolpea eta polimixina B kontrol positibo bezala erabili dira, SytoxTM Deep Red (permeabilizazioa) eta DiBAC₄(3) (despolarizazioa) sondak ongi funtzionatzen dutela bermatzeko.

Tse5-CT toxinarenean bi aldaera erabili dira, bata basatia eta bestea peptido-seinale bat gehitu zaio, periplasmara translokaturaz izateko. Hau, toxina zitoplasman edo periplasman efektu toxikoa ote duen deskribatzeko erabili da.

3. irudian azaltzen den bezala Tse5-CT toxinarenean adierazpenak zelula osasuntsuen kopurua bortizki murrizten du, **3A irudian** aurkeztuta. Aldi berean, Tse5-CT peptidoaren adierazpenak despolarizatutako zelulen kopurua sendoki areagotzen du, **2B irudia**. Permeabilizatutako eta permeabilizatutako + despolarizatutako zelula kopuruetan ez da inolako aldaketarik nabarmentzen, **3C eta 3D irudiak**.

Immunitate-proteina adierazi diren kasuetan ikusi daiteke zelula osasuntsuen kopurua berreskuratu daitekeela, **3E. irudia**. Aldi berean despolarizatutako zelulen kopurua murrizten da, **3F. irudia**. Beraz, immunitate-proteinak toxinarenean efektua neutralizatu dezake, modu honetan toxina ekoizten duen zelula babesten da.

3. irudia. Tse5-CT eta Tsi5 proteinen adierazpenak eragindako efektua *P. putida* zeluletan. (A, E) zelula osasuntsuak. (B, F) despolarizatutako zelulak. (C) permeabilizatutako zelulak. (D) despolarizatutako eta permeabilizatutako zelulak.



3.3. Tse5-CT domeinuak itu zelulen mintz biologikoetan txertatzeko gaitasuna du.

Mintz zeharkako domeinuak nabarmenki aminoazido hidrofobikoz osotutako eta mintza zeharkatzen duten motiboak dira. Sekuentzia hauek aurkitzeko, algoritmo sinplea erabilia Tse5-CT sekuentziaren aminoazido bakoitzeko joera hidrofobikoa aztertu da (Jones, 2007). Datu hauek kontuan hartuta bost mutante diseinatu dira (K1229, A1269, A1281, K1300 eta Q1317, aminoazido zenbakia erreportari duala non fusionatu den adierazten du, **4A.** eta **4B.** irudietan adierazita.

Behinik zonalde hidrofobikoak definituagoak genituenean PhoA-LacZa erreportari duala erabili zen. Mekanismo honen bidez mutante ezberdinen C-muturra zitoplasman edo periplasman aurkitzen ote den ezagutuko dugu (Karimova *et al.*, 2009). Erreportari dual hau bi proteinen arteko fusio estrategikoa da. Alde batetik, fosfata alkalinoak (PhoA) bakarrik periplasman aurkitzen denean seinalea emango du, bertan medio oxidatiboak disulfuro zubien sortzea faboratuko du, PhoA entzima gai delarik X-Pho (edo *p*-NPP) konposatua degradatzeko, koloniei kolore urdina emanik. Bestetik, β -galaktosidasaren α -peptidoak (LacZa) zitoplasman funtzionatuko du, bertan genomikoki ekoizten den β -galaktosidasaren ω -peptidorekin (LacZ ω) batuko da, β -galaktosidasa funtzionala ekoitziz, kasu honetan Red-Gal (edo ONPG) konposatua degradatuko du, koloniarik kolore gorria emanik. Hurbilketa esperimental hau *in vivo* zein *in vitro* jarraitu daiteke, lehenengo kasuan agar plaka baten kolonien kolorea aztertze da, bigarren kasuan aldiz, mutante bakoitzeko aktibitate-entzimatiko normalizatua (AEN) jarraitzen da (**1. formula**). Esperimentuak *E. coli* DH5 α zelula anduian burutu izan dira.

1. formula. PhoA-LacZa mutanteen aktibitate-entzimatiko normalizatua (AEN).

$$A = 1000 \cdot (DO_{405}lagina - DO_{405}kontrola) / (DO_{600}lagina - DO_{600}kontrola) \cdot t(\text{min})^{-1}$$

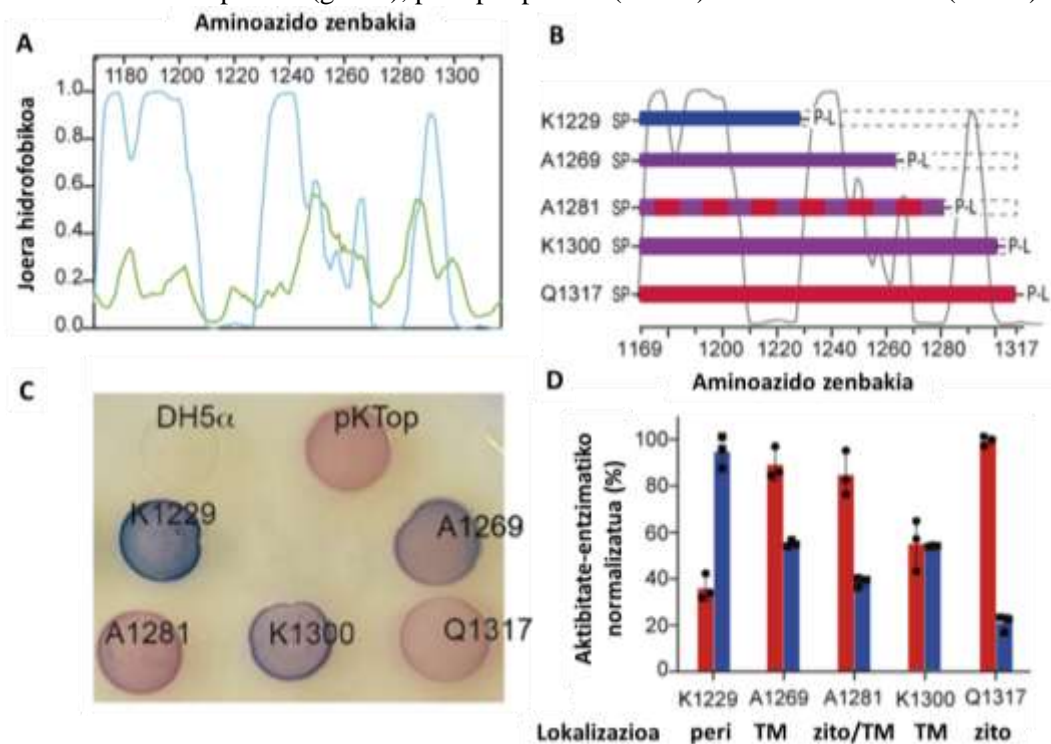
4C. irudian *E. coli* DH5 α zelula mutante ezberdinekin transformatuak izan direnak, agar plaka baten erein dira, plaka honetan konposatu kromogenoak dituelarik. K1229 mutanteak

kolore urdineko koloniak sortzen ditu, C-muturra periplasman dagoela konfirmatuz. Kontrako aldean, Q1317 mutantea, Tse5-CT osoa adierazten duena, kolore gorriko koloniak sortzen ditu, C-muturra zitoplasman dagoelarik. Bi hauen artean aurkitzen diren beste mutanteak, kolore morea aurkezten dute, kasu honetan mutantea mintz zeharkako domeinu baten moztu izan delako, eta horregatik C-muturra zitoplasman, zein periplasman aurkitu dezakegu, kolore gorria eta urdina ematen duten konposatu kromogenoen koloreak batzen baitira (gorria + urdina = morea).

Kontrol negatibo bezala *E. coli* DH5 α zelulak erabili dira, PhoA-LacZ α entzimen gabeziagatik kolore zuria dute. Eta kontrol positibo bezala pKTop plasmido basatiarekin transformatutako *E. coli* DH5 α zelulak, LacZ entzimaren aktibitatea bakarrik ikusi daiteke.

4D. irudian K1229 eta Q1317 mutanteak muturretako kasuak dira, lehengoa periplasman kokatzen da, eta bigarrena zitoplasman. Muturretako kasu hauek gertatzeko bi puntu hauen artean gutxienez mintz zeharkako domeinu bat aurkitu behar da. Hau berretsi egiten da bi mutante hauen artean dauden beste mutanteetan lortutako emaitzekin, hauen aktibitate-entzimatikoa normalizatua mugan aurkitzen baita, mintz zeharkako domeinu baten parte bezala deskribatuz.

4. irudia. (A) Domeinu toxikoaren aminoazido bakoitzeko joera hidrofobikoa. (B) Diseinatutako mutante ezberdinak. (C) *In vivo* agar plakako emaitzak. (D) *In vitro* PhoA-LacZ α sistemarekin aktibitate-entzimatikoa normalizatua eta mutante bakoitzeko lokalizazioa zito: zitoplasma (gorria), peri: periplasma (urdina) eta TM: transmintz (morea).



4. Ondorioak

Eskuratutako emaitzei esker badakigu Tse5 efektorearen domeinu toxikoak (Tse5-CT) *P. putida* zeluletan adierazten denean efektu bakteriolitiko duela, Tsi5 immunitate-proteinaren koadierazpenaren bidez alderantzikatu daitekeena. Bestetik, mintz-potentziala deuseztatzeko (zelulak despolarizatze) gaitasuna du, mintz plasmatikorearen iragazkortasuna konprometitu gabe (zelulak permeabilizatu gabe), hau ere Tsi5 proteinaren adierazpenarekin blokeatu daiteke. Azkenik, Tse5-CT domeinua kapaza da mintz biologikoetan txertatzeko, gutxienez mintz zeharkako domeinu bat deskribatu baitugu.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ikerketa honetan lortutako emaitzek Tse5 proteinaren ekintza-mekanismoaren lehen froga esperimentalak eskaintzen dute. Emaitza hauek bereziki esanguratsuak dira Tse5 efektorearen jardura bakteriolitikoa eta *P. aeruginosa* patogenoaren garrantzi biomedikoa kontuan hartuta.

Etorkizunera begira, orain arte ikertu ez diren edo bere funtzioa ezezaguna den toxinak hobeto ezagutzeko lagundu dezake. Gainera, gure aurkikuntzek Tse5-CT domeinua imitatzen duten peptido antimikrobianoak garatzeko estrategian lagun dezakete.

6. Erreferentziak

- Benz, J., Sendmeier, C., Barends, T. R. M., & Meinhart, A. (2012). Structural insights into the effector - immunity system Tse1/Tsi1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040453>
- Chou, S., Bui, N. K., Russell, A. B., Lexa, K. W., Gardiner, T. E., LeRoux, M., Vollmer, W., & Mougous, J. D. (2012). Structure of a Peptidoglycan Amidase Effector Targeted to Gram-Negative Bacteria by the Type VI Secretion System. *Cell Reports*, 1(6), 656–664. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.05.016>
- Cianfanelli, F. R., Monlezun, L., & Coulthurst, S. J. (2016). Aim, Load, Fire: The Type VI Secretion System, a Bacterial Nanoweapon. In *Trends in Microbiology* (Vol. 24, Issue 1, pp. 51–62). <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.10.005>
- González-Magaña, A., Altuna, J., Queralt-Martín, M., Largo, E., Velázquez, C., Montánchez, I., Bernal, P., Alcaraz, A., & Albasa-Jové, D. (2022). The *P. aeruginosa* effector Tse5 forms membrane pores disrupting the membrane potential of intoxicated bacteria. *Communications Biology*, 5(1), 1189. <https://doi.org/10.1038/s42003-022-04140-y>
- González-Magaña, A., Sainz-Polo, M. Á., Pretre, G., Çapuni, R., Lucas, M., Altuna, J., Montánchez, I., Fucini, P., & Albasa-Jové, D. (2020). Structural insights into *Pseudomonas aeruginosa* Type six secretion system exported effector 8. *Journal of Structural Biology*, 212(3), 107651. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107651>
- Gunasinghe, S. D., Webb, C. T., Elgass, K. D., Hay, I. D., & Lithgow, T. (2017). Super-resolution imaging of protein secretion systems and the cell surface of gram-negative bacteria. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 7, Issue MAY). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00220>
- Hachani, A., Allsopp, L. P., Oduko, Y., & Filloux, A. (2014). The VgrG proteins are “à la carte” delivery systems for bacterial type VI effectors. *Journal of Biological Chemistry*, 289(25), 17872–17884. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.563429>
- Jones, D. T. (2007). Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information. *Bioinformatics*, 23(5), 538–544. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl677>
- Karimova, G., Robichon, C., & Ladant, D. (2009). Characterization of YmgF, a 72-residue inner membrane protein that associates with the *Escherichia coli* cell division machinery. *Journal of Bacteriology*, 91(1), 333–346. <https://doi.org/10.1128/JB.00331-08>
- Lu, D., Shang, G., Yu, Q., Zhang, H., Zhao, Y., Cang, H., Gu, L., Xu, S., & Huang, Y. (2013). Expression, purification and preliminary crystallographic analysis of the T6SS effector protein Tse3 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 69(5), 524–527. <https://doi.org/10.1107/S1744309113007148>

- Mougous, J. D., Cuff, M. E., Raunser, S., Shen, A., Zhou, M., Gifford, C. A., Goodman, A. L., Joachimiak, G., Ordoñez, C. L., Lory, S., Walz, T., Joachimiak, A., & Mekalanos, J. J. (2006). A virulence locus of *Pseudomonas aeruginosa* encodes a protein secretion apparatus. *Science*, *312*(5779), 1526–1530. <https://doi.org/10.1126/science.1128393>
- Murdoch, S. L., Trunk, K., English, G., Fritsch, M. J., Pourkarimi, E., & Coulthurst, S. J. (2011). The opportunistic pathogen *Serratia marcescens* utilizes type VI secretion to target bacterial competitors. *Journal of Bacteriology*, *193*(21), 6057–6069. <https://doi.org/10.1128/JB.05671-11>
- Nolan, L. M., Cain, A. K., Clamens, T., Furniss, R. C. D., Manoli, E., Sainz-Polo, M. A., Dougan, G., Albesa-Jové, D., Parkhill, J., Mavridou, D. A. I., & Filloux, A. (2021). Identification of Tse8 as a Type VI secretion system toxin from *Pseudomonas aeruginosa* that targets the bacterial transamidosome to inhibit protein synthesis in prey cells. *Nature Microbiology*, *6*(9), 1199–1210. <https://doi.org/10.1038/s41564-021-00950-8>
- Pissaridou, P., Allsopp, L. P., Wettstadt, S., Howard, S. A., Mavridou, D. A. I., & Filloux, A. (2018). The *Pseudomonas aeruginosa* T6SS-VgrG1b spike is topped by a PAAR protein eliciting DNA damage to bacterial competitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(49), 12519–12524. <https://doi.org/10.1073/pnas.1814181115>
- Pukatzki, S., Ma, A. T., Sturtevant, D., Krastins, B., Sarracino, D., Nelson, W. C., Heidelberg, J. F., & Mekalanos, J. J. (2006). Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(5), 1528–1533. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510322103>
- Robb, C. S., Robb, M., Nano, F. E., & Boraston, A. B. (2016). The Structure of the Toxin and Type Six Secretion System Substrate Tse2 in Complex with Its Immunity Protein. *Structure*, *24*(2), 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.11.012>
- Russell, A. B., Hood, R. D., Bui, N. K., Leroux, M., Vollmer, W., & Mougous, J. D. (2011). Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature*, *475*(7356), 343–349. <https://doi.org/10.1038/nature10244>
- Wang, M., Luo, Z., Du, H., Xu, S., Ni, B., Zhang, H., Sheng, X., Xu, H., & Huang, X. (2011). Molecular characterization of a functional type VI secretion system in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Current Microbiology*, *63*(1), 22–31. <https://doi.org/10.1007/s00284-011-9935-z>
- Whitney, J. C., Beck, C. M., Goo, Y. A., Russell, A. B., Harding, B. N., de Leon, J. A., Cunningham, D. A., Tran, B. Q., Low, D. A., Goodlett, D. R., Hayes, C. S., & Mougous, J. D. (2014). Genetically distinct pathways guide effector export through the type VI secretion system. *Molecular Microbiology*, *92*(3), 529–542. <https://doi.org/10.1111/mmi.12571>
- WHO. (2017). Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug resistant bacterial infections, including tuberculosis. In *Essential medicines and health products*.

7. Eskerrak eta oharrak

Artikulu hau master amaierako lanetik eta publikatutako artikulutik (González-Magaña *et al.*, 2022) eratorria eta moldatua dago. Artikulu hau Jon Altuna ikasleari esleitutako UPV/EHuren Doktorego Tesirako beka bati esker eta David Albesak jasotako Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioi eta Eusko Jaurlaritzako diru-laguntzei esker idatzi da. Eskerrak eman nahi dizkiot Amaia González-Magaña teknika esperimental guztiak irakasteagatik; David Albesa-Jovéri, ideia planteatu eta zuzentzeagatik; Euskal Herriko Unibertsitateari eta Biofisika Institutuari esperimentuak egiteko beharrezko baliabideak eskaintzeagatik.