

铜绿假单胞菌 *popN*⁻ 突变子 III 型分泌水平及与蛋白酶关系的研究 Type III Secretion Study of *popN*⁻ Mutant of *Pseudomonas aeruginosa* and Proteases Degradation

杨洪江, 魏东盛, 李明春, 邢来君*

YANG Hong-Jiang, WEI Dong-Sheng, LI Ming-Chun and XING Lai-Jun*

南开大学微生物系, 天津市微生物功能基因组学重点实验室, 天津 300071

Tianjin Key Laboratory of Microbial Functional Genomics, Department of Microbiology, Nankai University, Tianjin 300071, China

摘 要 铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) III 型分泌系统(type III secretion system, TTSS)是重要的细菌致病因子之一,能够
将酶蛋白直接注入到宿主细胞内,导致细胞损害的发生。重点研究了 TTSS 中的 *popN* 基因的功能,通过构建 *popN*⁻ 突变子,发
现该突变子在非诱导条件下,能够分泌酶蛋白,显示 *popN* 基因编码的蛋白对 TTSS 蛋白的分泌具有负调控作用。进一步研究
发现, *popN*⁻ 突变子在不同培养基中 TTSS 的分泌水平存在着显著差异,影响对 *popN* 基因的功能的判断。为了解决这一矛盾,
从几个方面分析了造成表型差异的可能因素,确定蛋白酶对 TTSS 分泌蛋白的降解作用,是表型差异存在的主要原因,从而首
次系统地阐明 *popN*⁻ 突变子在不同培养基中都具有 TTSS 组成型表达的表型,对于深入研究 TTSS 的调控机制具有重要意义。

关键词 *popN*⁻ 突变子,组成型表达,蛋白酶抑制剂,铜绿假单胞菌

中图分类号 Q814 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)05-0846-06

Abstract *Pseudomonas aeruginosa* is an important opportunistic human pathogen. It encodes many virulence factors and one of them is type III secretion system (TTSS). Effectors proteins can be delivered into host cells directly by this system, causing necrosis or apoptosis. *popN* gene is the first gene in the *popN* operon of TTSS gene cluster. To investigate its function, *popN* gene deletion mutant was generated in this study, and we found this mutant can secrete effectors proteins constitutively under non-inducing condition in DMEM medium containing serum. The results indicated that PopN is a negative regulator of the TTSS expression. However, no secreted effector proteins were detectable when the *popN*⁻ mutant was grown in LB medium under non-inducing condition. To investigate the possible reasons, effects of growth status and protease(s) inhibitors on the TTSS were investigated. We present evidences that indicate protease mediated degradation of secreted effector proteins played a key role in the phenotypic inconsistency of *popN*⁻ mutant.

Key words *popN*⁻ mutant, constitutive expression, protease inhibitor, *Pseudomonas aeruginosa*

铜绿假单胞菌广泛存在于各种环境中,同时也是人类重要的机会致病菌。在各种免疫力低下的患者中存在长期感染的现象,包括纤维肺疾病患者(cystic fibrosis, CF),艾滋病患者,烧伤病人等^[1]。铜绿假单胞菌拥有多种致病因子,其中包括由 III 型分

泌系统分泌的四种蛋白,即 ExoS、ExoT、ExoY 和 ExoU。前两种蛋白具有 ADP 核糖基转移酶活性,其中 ExoS 修饰宿主细胞 Ras 家族蛋白,能够导致细胞凋亡的发生;ExoT 修饰 CrkI/II 蛋白,抑制细胞的分裂。ExoY 具有宿主特异的腺苷酸环化酶的活性,

ExoU 是急性细胞毒素 ,具有脂酶的活性^[2,3,4]。

研究表明 ,有两种环境信号能够导致 TTSS 表达的发生 ,即低钙环境或与宿主细胞接触。铜绿假单胞菌 TTSS 涉及大约 38 个基因 ,分别属于 5 个操纵子。它们所编码的蛋白分别具有调控、结构、伴娘蛋白和酶蛋白等功能。所有这些基因的表达受 TTSS 主调控因子 ExsA 的控制 ,而 ExsC ,ExsD 和 ExsE 等调节因子通过调节 ExsA 的有效浓度 ,来调节 TTSS 的表达^[5]。

本文重点研究了 TTSS 中的 *popN* 基因的功能 ,该基因是 *popN* 操纵子 7 个基因的第一位 ,大小为 867bp。TTSS 研究发现 ,*popN* 基因突变子在非诱导条件下 ,能够分泌酶蛋白 ,显示 *popN* 基因编码的蛋白对 TTSS 蛋白的分泌具有负调控作用。但是研究过程中发现 ,*popN*⁻ 突变子表型存在着明显的不一致性 ,一些实验结果显示 TTSS 表达不需要环境中的诱导信号 ,为组成型表达 ,但是另外一些实验的结果和结论却相反 ,实验结果随着使用培养基的不同而发生变化。为了解决这一问题 ,我们从几个方面分

析了造成 *popN*⁻ 突变子表型不一致的可能原因 ,发现蛋白酶对 TTSS 分泌蛋白的降解作用 ,是造成表型差异存在的重要因素 ,从而首次系统地阐明 ,*popN*⁻ 突变子在不同培养基中都具有 TTSS 组成型表达的表型。

1 材料与方法

1.1 实验菌株 ,质粒和培养基

表 1 所列为实验所用菌株和质粒。常用培养基为 LB ,Nutrition agar 用于 Mating 实验 ,铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 使用 LB 或 DMEM (Dulbecco 's Modified Eagle Medium)培养基。当需要加入抗菌素时 ,大肠杆菌(*Escherichia coli*)使用浓度 ($\mu\text{g/mL}$) 分别为 :Ampicillin 100 ,Kanamycin 50 ,Tetracycline 10 ,培养铜绿假单胞菌使用浓度($\mu\text{g/mL}$) 分别为 :Carbenicillin 150 ,Tetracycline 100。TOPO 克隆试剂盒购自 Invitrogen 公司 ,蛋白酶抑制剂购自 Roche Diagnostic 公司。ExoS-Flag 蛋白由本实验室纯化。

表 1 菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strain/plasmid	Description	References or source
<i>E. coli</i>		
BW20767	RP4-2-Tc :Mu-1 kan :Tn7 integrant leu-63 :IS10 <i>recA zbf-5 creB510 hsdR17 endA1 thi uidA</i> (Δ Mlu I):: <i>pir</i> ⁺	Stratagene
<i>P. aeruginosa</i>		
PAK	Wild-type <i>P. aeruginosa</i> strain	[6]
PAK Δ <i>popN</i>	PAK deleted of the <i>popN</i> gene	This study
Plasmids		
pCR2.1-TOPO	Cloning vector for the PCR products	Invitrogen
pUCP19	Broad host range shuttle vector ; Ap ^r	[7]
pEX18Tc	Gene replacement vector ; Tc ^r , <i>oriT</i> ⁺ <i>sacB</i> ⁺	[8]
pPopNExT	A fragment containing <i>popN</i> gene in pEX18Tc ,Tc ^r	This study
pPopNDT	<i>popN</i> gene with <i>Sea</i> I / <i>Hinc</i> III deletion on pPopNExT ,Tc ^r	This study
pPopN	<i>PopN</i> gene with its own promoter on pUCP19 ,Ap ^r	This study

1.2 铜绿假单胞菌 *popN*⁻ 突变子的构建

设计引物 ,采用 PCR 方法克隆包括 *popN* 的 2.8kb DNA 片段 ,引物序列为 P1 : 5'-GCCGAA ATACTCGGCGATGCTGGTGGCGACGAAAC-3' ;P2 : 5'-CAACAAGCTTTGTTGCGTCGGTTTCAACGTCATCG-3'。PCR 产物直接克隆到载体 pCR2.1-TOPO ,测序确认后将该片段克隆到反向筛选质粒 pEx18Tc 上 ,然后采用 *Hinc* II 和 *Sac* I 内切酶消化 ,除去 *popN* 基因内部 209bp 的 DNA 片段 ,自连后转化到 XL-1 中 ,提取质粒签定 ,将正确的质粒转化进入宿主 BW20767 中。挑取单菌落过夜培养至对数生长期(*OD*₆₀₀ 读

数为 0.8 左右) ,与于 42℃ 过夜培养的 PAK 菌混合 ,离心后弃上清 ,将细菌沉淀物转移至无菌滤膜上 ,在 nutrition agar 平板上培养 5 ~ 7h。取细菌混合物在含有抗菌素的 LB 平板上划线 ,过夜培养后出现的单菌落为单交换突变子。按照 Hoang 的方法 ,进一步筛选双交换突变子^[8]。

将含有 *popN* 基因的 DNA 片段克隆到载体 pUCP19 上 ,该片段含有完整的 *popN* 基因启动子区和编码区 ,用于 *popN* 基因突变子的互补实验。

1.3 Ⅲ型分泌系统的诱导实验及 Western blot 分析

采用补加钙离子螯合剂 EGTA 的方法 ,进行

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

TTSS 诱导实验。铜绿假单胞菌过夜培养物按 1% 的接种量转接到含 5mmol/L EGTA 的 LB 液体培养基或含有 5% 胎牛血清 FBS (fetal bovine serum) 的 DMEM 培养基中,于 37℃ 诱导 3h。前者在摇床中振荡培养,后者在二氧化碳培养箱中静止培养。收取培养物离心沉淀,上清液直接与等体积 2× 蛋白质上样缓冲液混合,煮沸 10min 后进行 SDS-PAGE,采用 Bio-Rad 半干转膜仪将蛋白样品转移到 PVDF-PLUS 膜上,进行 Western 杂交。抗体采用兔抗 ExoS 血清,二抗采用 HRP 标记的羊抗兔血清,采用 GE Healthcare 公司 ECL-PLUS 试剂盒和 Hyper Film 进行荧光显色反应和曝光,或用 PhosphorImager STORM 直接扫描并分析实验结果。当上清液需要浓缩时,加入 15% 的 TCA (trichloroacetic acid),冰浴 30min 后高速离心。沉淀用冷的丙酮洗 1 次后,加入原来上清 1/10 体积的 1× 蛋白质上样缓冲液,煮沸 10min 后进行 SDS-PAGE。

1.4 蛋白酶抑制实验

Complete mini protease inhibitors (with or without EDTA) 购自 Roche Diagnostic,按说明书要求,将一片蛋白酶抑制剂溶解到 10mL LB 培养基中,此时培养基中蛋白酶抑制剂浓度为 1×,接着用 LB 倍比稀释,浓度依此为 1/2,1/4,1/8,1/16,直接用于 TTSS 诱导实验。

2 结果

2.1 铜绿假单胞菌 *popN*⁻ 突变子的构建

提取铜绿假单胞菌 PAK 染色体 DNA 作为 PCR 反应模板,扩增含 *popN* 的 2.8kb DNA 片段,直接克隆到载体质粒 pCR2.1-TOPO 上。测序确定后,将 2.8kb 的片段亚克隆到反向筛选质粒 pEx18Tc 上,按照材料和方法中所述,除去 *popN* 基因编码区 209bp 的 DNA 片段,筛选的单交换突变子,并在含有 5% 蔗糖的 LB 平板上筛选双交换突变子。然后对平板上出现菌落进行鉴定,确认是否为真正的双交换突变子,首先排除具有四环素抗性的菌落,然后用 PCR 方法挑选扩增产物为 2.6kb 的菌落,即 *popN* 基因发生缺失的突变子。

2.2 铜绿假单胞菌 *popN*⁻ 突变子表型的研究及互补实验

过夜培养野生型菌株 PAK 和 *popN*⁻ 突变子,按 1% 比例转接到含 5% FBS 的 DMEM 培养基中,进行 TTSS 的诱导实验,结果如图 1 所示。野生型 PAK 菌株只有在补加 EGTA 的情况下,才能检测到 ExoS 和

ExoT 蛋白,而 *popN*⁻ 突变子在非诱导条件下,却能够分泌大量的 ExoS 和 ExoT 蛋白,该结果表明 *popN*⁻ 突变子中 TTSS 表达的发生,不需要诱导信号低钙环境的存在,为组成型表达,所以 *popN* 基因产物对 TTSS 具有负调控的功能。

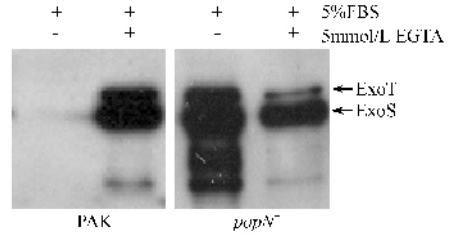


图 1 DMEM 培养基中 *popN*⁻ 突变子 TTSS 分泌状况的检测

Fig.1 TTSS induction experiments in DMEM medium

Wild type strain PAK as control. Supernatants of both strains were separated with SDS-PAGE and subjected to Western blot. Anti-ExoS rabbit serum was used as first antibody, HRP conjugated sheep anti rabbit serum as secondary antibody. ExoS and ExoT share 76% primary amino acid homology and that is why rabbit anti-ExoS serum can detect both proteins by Western blot.

2.3 *popN*⁻ 突变子的互补实验

将携带 *popN* 基因的质粒 pPopN 转化进入 *popN*⁻ 突变子,在 DMEM 培养基中进行 TTSS 诱导实验,结果如图 2 所示,*popN*⁻ 突变子能够被质粒 pPopN 互补,恢复与野生型菌株 PAK 相同的表型,证实我们构建的 *popN*⁻ 突变子是正确的。

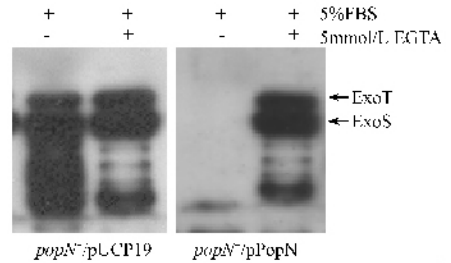


图 2 DMEM 培养基中 *popN*⁻ 突变子的互补实验

Fig.2 Complementation of the *popN*⁻ mutant

Plasmid pPopN carries an intact *popN* gene driven by its own promoter, vector pUCP19 as a control. Supernatants of both strains were separated on SDS-PAGE and subjected to Western blot. Rabbit anti-ExoS serum was used as first antibody, HRP conjugated sheep anti rabbit serum as secondary antibody.

2.4 *popN*⁻ 突变子在 LB 培养基中 TTSS 分泌状况的检测

在 LB 培养基中进行 TTSS 表达实验,结果如图 3 所示,PAK 和 *popN*⁻ 突变子,在非诱导的条件下,无法检测到 ExoS 和 ExoT 蛋白;而补加 EGTA 的样品中,均能够检测到 ExoS 和 ExoT。*popN*⁻ 突变子的表

型与野生型菌株 PAK 相同 ,与前面的结果似乎相互矛盾。同时我们也发现 *popN*⁻ 突变子的上清液样品中 ,一些分子量较低的蛋白能够与兔抗 ExoS 血清反应 这显示上清液中 ExoS 和 ExoT 蛋白存在着降解现象。

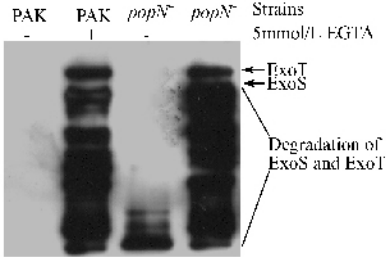


图3 *popN*⁻ 突变子在 LB 培养基中分泌 ExoS 和 ExoT 的状况

Fig.3 TTSS secretion of *popN*⁻ mutant in LB medium
Supernatants were concentrated by TCA precipitation. The lower bands are the degradations of ExoS and ExoT proteins.

2.5 细菌生长期对 TTSS 分泌的影响

我们同时注意到 ,*popN*⁻ 突变子在 DMEM 培养基中 ,不加 EGTA 时的上清液样品 ,在检测到完整 ExoS 和 ExoT 蛋白的同时 ,同样存在着大量的 ExoS 和 ExoT 蛋白降解现象(图 1 2)。 一般情况下 ,细菌蛋白酶的分泌发生在对数生长后期或平衡期 ,为了验证细胞浓度是否影响分泌蛋白的降解 ,我们改变接种量 ,按 1/600 的比例将过夜培养菌加入到新鲜 LB 培养基中 ,进行 TTSS 诱导。收集 *popN*⁻ 突变子在 LB 培养基中不同生长阶段的上清液样品 ,结果发现 ,在对数生长早期(*OD*₆₀₀ = 0.3)收集的样品中 ,非常容易检测到 ExoS 和 ExoT 蛋白 ,不需要补加螯合剂 EGTA(图 4A)。而在平衡期(*OD*₆₀₀ > 1.6)收集的样品中 ,则很难检测到完整的 ExoS 和 ExoT 蛋白 (图 3)。我们将上清液与 ExoS-Flag 蛋白混合 ,发现 ExoS-Flag 蛋白被上清液降解 ,而对照 LB 培养基中的 ExoS-Flag 蛋白则没有被降解(图 4B) ,该结果进一步证实 ,培养过程中细菌能够分泌蛋白酶 ,降解分泌到上清液中的 ExoS 和 ExoT 蛋白。

2.6 金属蛋白酶降解 ExoS 和 ExoT 蛋白

为了进一步确认 ExoS 和 ExoT 蛋白的降解 ,是由于蛋白酶的分泌造成的 ,在诱导 TTSS 表达的同时 ,补加不同的蛋白酶抑制剂 ,观察蛋白酶抑制剂是否能够阻止 ExoS 和 ExoT 蛋白降解的发生。预实验结果(图 5)显示 ,蛋白酶抑制剂能够阻止 ExoS 和 ExoT 蛋白的降解 ,但同时一定程度上抑制细菌的正常生长 ,因此在实验中我们将蛋白酶抑制剂稀释

后使用。

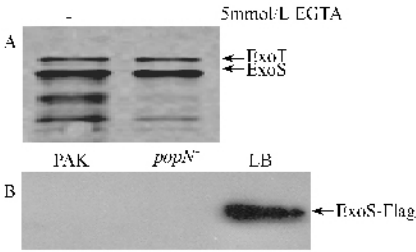


图4 LB 培养基中细菌生长期对 *popN*⁻ 突变子 TTSS 分泌的影响

Fig.4 Effect of growth phase on the secretion of effector proteins by *popN*⁻ mutant in LB medium
Early log phase samples were collected around *OD*₆₀₀ reading of 0.3. All samples were precipitated with TCA (A). Degradation of ExoS-Flag protein with supernatant from bacterial cultures without adding EGTA ,LB was used as control ,and anti-Flag monoclonal antibody was used to detect ExoS-Flag (B).

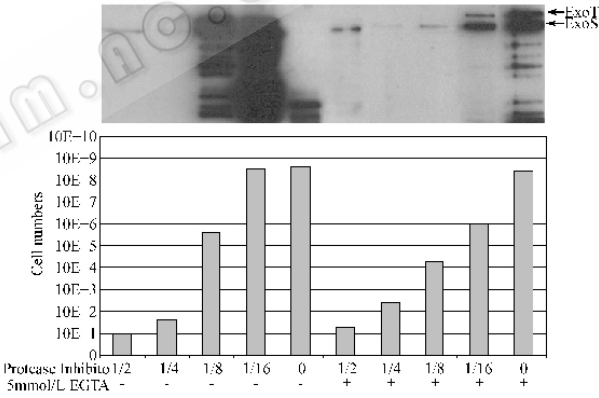


图5 蛋白酶抑制剂对细菌生长和 TTSS 表达的影响
Fig.5 Protease inhibitors affect both the growth of bacteria and the secretion of TTSS

One tablet *complete mini* + EDTA protease inhibitor was dissolved in LB and used as 1 × . Serially dilute the solution with LB to make the solutions with concentration of protease inhibitors as 1/2 ,1/4 ,1/8 ,and 1/16. All these solutions were used directly in TTSS induction assay with or without EGTA.

实验结果如图 6A 所示 ,补加含有 EDTA 蛋白酶抑制剂 ,能够显著地减少 ExoS 和 ExoT 蛋白降解的发生 ,降低抑制剂浓度 ,完整 ExoS 和 ExoT 蛋白的数量则越来越少 ,低分子量的蛋白越来越多。而不含 EDTA 蛋白酶抑制剂 ,则完全不能抑制蛋白酶的活性 ,ExoS 和 ExoT 蛋白全部被降解(图 6B)。以上实验数据表明 ,EDTA 对蛋白酶活性的抑制发挥了主要作用。为了验证这一结论 ,我们单独加入相同浓度的 EDTA 进行实验 ,发现 EDTA 能够达到相同

的抑制效果(图 6C)。综上所述,铜绿假单胞菌培养过程中分泌的金属蛋白酶,是 ExoS 和 ExoT 蛋白的

降解主要原因,也是造成 *popN*⁻ 突变子在不同实验中表型存在差异的根本原因。

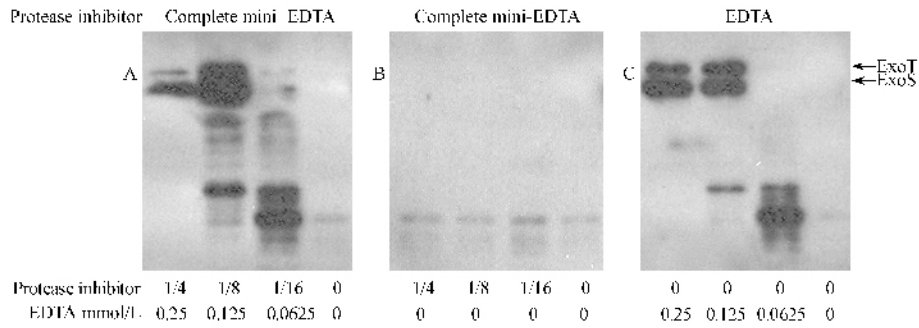


图 6 蛋白酶抑制剂阻止 TTSS 分泌蛋白 ExoS 和 ExoT 的降解

Fig.6 Protease inhibitors can block degradation of TTSS effector proteins

Dissolve one tablet *complete mini* + EDTA protease inhibitor in LB and used as 1 × . Serially dilute the solution with LB to make the solutions with concentration of protease inhibitors as 1/2, 1/4, 1/8 and 1/16. All these solutions were used directly in TTSS induction assay without EGTA (A & B). EDTA solution was added to LB and its concentration is the same as the corresponding samples with two kinds of protease inhibitors (C).

3 讨论

关于细菌接收环境信号后,TTSS 如何开始启动表达,目前没有明确的结论。耶尔森氏菌(*Yersinia enterocolitica*)TTSS 的研究比较深入,人们推测 TTSS 的表达调控有两种模型,一种为“帽子结构”(cap structure)模型,即 YopN 蛋白本身或与其它蛋白一起,在 TTSS 分泌器顶部形成类似帽子的结构,从外面阻挡 TTSS 表达和分泌的发生。另一种模型为 YopN 蛋白本身或与其它蛋白一起在细菌胞内形成“塞子结构”(plug structure),从内部堵住分泌的发生。*yopN* 基因缺失后,突变子能够在非诱导条件下分泌各种 Yops 因子,为组成型表达^[9,10,11]。

DNA 序列比较显示,*popN* 基因与 *yopN* 基因具有很高的同源性,它们可能具有相似的功能。本研究的实验结果确实证实了这一点,*popN*⁻ 突变子在不同培养基中,不需要诱导,持续分泌 ExoS 和 ExoT 蛋白,证明 PopN 蛋白对 TTSS 的表达起负调控作用。结合上述两种调控模型,*popN* 基因缺失后,“帽子结构”或“塞子结构”无法形成,不能阻挡分泌的发生,TTSS 始终表达,为组成型表型。

本文在研究 *popN*⁻ 突变子表型过程中发现,含有 EDTA 的蛋白酶抑制剂或 EDTA 本身能够在很大程度上防止 ExoS 和 ExoT 蛋白的降解,因此推测在 ExoS 和 ExoT 蛋白降解过程中,金属蛋白酶(metalloprotease)发挥了主要作用。同时我们实验证明 TTSS 分泌与细菌生长期存在着密切关系,在 LB

培养基中对数生长早期的 *popN*⁻ 突变子,能够检测到完整的 ExoS 和 ExoT 蛋白,而对数生长晚期或平衡期的细菌则不能。而细菌在 DMEM 培养基中生长缓慢,TTSS 诱导结束时细胞浓度只相当于在 LB 培养基中对数生长早期的浓度,因此我们认为,细菌生长期与 ExoS 和 ExoT 蛋白的降解存在着必然联系,参与降解的蛋白酶的分泌主要发生在对数生长晚期或平衡期。当然 DMEM 培养基中存在大量的牛血清白蛋白(BSA),也能够一定程度上抑制蛋白降解。

铜绿假单胞菌能够编码多种蛋白酶,它们通过破坏宿主的组织结构,与疾病的发生密切相关^[12]。弹性蛋白酶(elastase B)是目前研究比较彻底的几种蛋白酶之一,它属于金属蛋白酶,能够被 EDTA 抑制活性^[13]。同时,LasB 蛋白酶的表达受 Quorum sensing 系统的调节,在对数生长晚期或平衡期表达水平升高。近来有研究表明,如果 *lasB* 基因缺失,TTSS 表达水平就会升高,对上皮细胞的侵染能力也会降低^[14,15]。因此,LasB 蛋白酶可能与 ExoS 和 ExoT 蛋白的降解存在一定相关性,但是有待于实验进一步证明。

关于降解发生在什么地方,是细胞内还是细胞外?在实验中,我们的确观察到细胞内存在 ExoS 和 ExoT 蛋白的降解现象,但是这一现象与 TTSS 调控的关系,*popN*⁻ 突变子 TTSS 的表达和分泌是否仍然受 Quorum sensing 的控制^[16],调控如何进行,还有待于更多实验证实。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Bodey GP , Bolivar R , Fainstein V , *et al.* Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* . *Rev Infect Dis* ,1983 **5** 279 – 313 .
- [2] Ganesan AK , Frank DW , Misra RP , *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S ADP-ribosylates Ras at multiple sites . *J Biol Chem* , 1998 **273** :7332 – 7337 .
- [3] Jia J , Alaoui-El-Azher M , Chow M , *et al.* c-Jun NH₂-terminal kinase-mediated signaling is essential for *Pseudomonas aeruginosa* ExoS-induced apoptosis . *Infect Immun* 2003 **71** 3361 – 3370 .
- [4] Sato H , Feix JB , Hillard CJ , *et al.* Characterization of phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type Ⅲ cytotoxin ,ExoU . *J Bacteriol* 2005 **187** :1192 – 1195 .
- [5] Yahr TL , Wolfgang MC . Transcriptional regulation of the *Pseudomonas aeruginosa* type Ⅲ secretion system . *Molecular Microbiology* 2006 **62** :631 .
- [6] Bradley TJ ,Khan NH . The production of extracellular lipids by *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 2000 in stationary liquid media containing macrogols . *J Pharm Pharmacol* ,1974 **26** 900 – 902 .
- [7] Schweizer HP . *Escherichia-Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19 . *Gene* ,1991 **97** :109 – 121 .
- [8] Hoang TT ,Karkhoff-Schweizer RR ,Kutchma AJ ,*et al.* A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences : application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants . *Gene* ,1998 **212** 77 – 86 .
- [9] Forsberg A ,Viitanen AM ,Skurnik M ,*et al.* The surface-located YopN protein is involved in calcium signal transduction in *Yersinia pseudotuberculosis* . *Mol Microbiol* ,1991 **5** 977 – 986 .
- [10] Iriarte M ,Sory MP ,Boland A ,*et al.* TyeA ,a protein involved in control of Yop release and in translocation of *Yersinia* Yop effectors . *EMBO J* ,1998 **17** :1907 – 1918 .
- [11] Kenjale R ,Wilson J ,Zenk SF ,*et al.* The needle component of the type Ⅲ secretion of *Shigella* regulates the activity of the secretion apparatus . *J Biol Chem* 2005 **280** :42929 – 37 .
- [12] Lyczak JB ,Cannon CL ,Pier GB . Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection : lessons from a versatile opportunist . *Microbes Infect* 2000 **2** :1051 – 1060 .
- [13] Hamdaoui A ,Wund-Bisserset F ,Bieth JG . Fast solubilization of human lung elastin by *Pseudomonas aeruginosa* elastase . *Am Rev Respir Dis* ,1987 **135** 860 – 863 .
- [14] Cowell BA ,Twining SS ,Hobden JA ,*et al.* Mutation of *lasA* and *lasB* reduces *Pseudomonas aeruginosa* invasion of epithelial cells . *Microbiology* 2003 **149** 2291 – 2299 .
- [15] Ha U ,Jin S . Growth phase-dependent invasion of *Pseudomonas aeruginosa* and its survival within HeLa cells . *Infect Immun* 2001 , **69** :4398 – 4406 .
- [16] Michael H ,Maximilian R ,Schreff AM ,*et al.* Expression of *Pseudomonas aeruginosa* *exoS* is controlled by quorum sensing and RpoS . *Microbiology* 2004 **150** 843 – 851 .