

# Rol de la Tropomiosina y del Adaptador NEDD9 durante la invasión celular de *Listeria monocytogenes*

Tropomyosin and NEDD9 adapter during cell invasion by *Listeria monocytogenes*

Kattia Núñez-Montero<sup>1</sup>  
Andreas Kühbacher<sup>2</sup>  
Johnny Peraza<sup>3</sup>  
Pascale Cossart<sup>4</sup>  
Javier Pizarro-Cerdá<sup>5</sup>

Fecha de recepción: 15 de febrero del 2014  
Fecha de aprobación: 27 de marzo del 2014

Núñez-Montero, K; Kühbacher, A; Peraza, J; Cossart, P; Pizarro-Cerdá, J. Rol de la Tropomiosina y del Adaptador NEDD9 durante la invasión celular de *Listeria monocytogenes*. *Tecnología en Marcha*. Edición Especial Movilidad Estudiantil 2014. Pág 41-48.

- 1 Ingeniera en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. Correo electrónico: kmontero.nu@gmail.com.
- 2 Investigador, PhD. Biología. Instituto Pasteur, Unidad de Interacción Bacteria-Célula. Paris, Francia. Correo electrónico: andreas.kuehbacher@pasteur.fr
- 3 Docente Investigador, MSc. Bioquímica. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. Cartago, Costa Rica. Correo electrónico: jperaza@gmail.com.
- 4 Director de departamento, PhD. Ciencias Físicas. Instituto Pasteur, Unidad de Interacción Bacteria-Célula. Paris, Francia. Correo electrónico: pascale.cossart@pasteur.fr
- 5 Investigador, PhD. Inmunología. Instituto Pasteur, Unidad de Interacción Bacteria-Célula. Paris, Francia. Correo electrónico: javier.pizarro-cerda@pasteur.fr.

## Palabras Clave

Tropomiosina; NEDD9; invasión bacteriana; *Listeria monocytogenes*; patogénesis; nucleación de actina.

## Resumen

*Listeria monocytogenes* es un patógeno de animales y humanos que logra invadir el espacio intracelular gracias a la interacción entre proteínas bacterianas de superficie y receptores en células hospedero, lo que permite activar cascadas de señalización que promueven la internalización de esta bacteria. El silenciamiento de la expresión génica en células de mamífero gracias a la técnica de transfección de ARNs pequeños de interferencia (siARN) ha permitido recientemente asociar nuevos efectores moleculares al proceso de internalización de distintos patógenos intracelulares en células eucariotas. Esta investigación hace uso de esta técnica para determinar la posible contribución de la tropomiosina (TPM) y de la proteína adaptadora NEDD9 a la invasión celular por parte de *L. monocytogenes*, así como de *Salmonella typhimurium* y de una cepa de *Escherichia coli* que expresa la invasina de *Yersinia pseudotuberculosis*. Utilizando ensayos de invasión se demuestra que el silenciamiento de la expresión de TPM, pero no de NEDD9, reduce significativamente la entrada de los tres patógenos intracelulares estudiados. Mediante microscopía de fluorescencia se observa que el silenciamiento de TPM y NEDD9 afecta en forma diferente la morfología celular y la distribución de los filamentos de actina. Estos resultados sugieren que TPM puede modular la entrada de patógenos bacterianos mediante una modificación de las propiedades de reorganización de la membrana plasmática dependientes del citoesqueleto de actina, propiedades que difieren de aquellas afectadas por NEDD9.

## Keywords

Tropomyosin; NEDD9; bacterial invasion; *Listeria monocytogenes*; pathogenesis; actin nucleation.

## Abstract

*Listeria monocytogenes* is an animal and human pathogen that it is able to invade the intracellular space due to the interaction between bacterial surface proteins and host cell receptors, activating signaling cascades that promote pathogen internalization. Gene expression silencing in mammalian cells by transfection of small interfering RNAs (siRNA) has recently allowed the implication of novel molecular effectors to the internalization process of different intracellular pathogens in eukaryotic cells. The present work takes advantage of this technique to determine to potential contribution of tropomyosin (TPM) and the adaptor protein NEDD9 to cell invasion by *L. monocytogenes*, as well as *Salmonella typhimurium* and an *Escherichia coli* strain that expresses the invasins from *Yersinia pseudotuberculosis*. Using gentamicin invasion assays, it is shown that only TPM expression silencing reduces significantly the entry in HeLa cells of the three investigated bacterial pathogens. Fluorescence microscopy demonstrates that TPM and NEDD9 silencing affects differently HeLa cell morphology and the distribution of actin filaments. These results suggest that TPM may modulate the entry of bacterial pathogens by modifying the reorganization properties of the plasma membrane which are dependent on the actin cytoskeleton, and that these properties differ from those affected by NEDD9.

## Introducción

*L. monocytogenes*, un bacilo Gram positivo de amplia distribución en la naturaleza, es el agente etiológico de la listeriosis, una infección de origen alimentario que afecta tanto animales como humanos; esta enfermedad pleiotrópica está caracterizada por distintos cuadros clínicos según la condición inmune del paciente, incluyendo problemas gastrointestinales leves en individuos normales o complicaciones severas como meningitis, sepsis y aborto en pacientes inmuno-comprometidos (Larraín de la C & Carvajal, 2008). Los diferentes cuadros clínicos asociados a la listeriosis están directamente relacionados a la capacidad de *L. monocytogenes* para atravesar diferentes barreras inmunológicas en los huéspedes infectados, y para invadir el espacio intracelular (Doran et al. 2013, Pizarro-Cerdá et al. 2012).

Diferentes factores de virulencia participan en cada etapa del ciclo invasivo de esta bacteria: (i) el locus *inlAB* codifica por las proteínas de superficie InlA e InlB que interactúan con los receptores celulares E-cadherina y c-Met respectivamente para activar cascadas de señalización necesarias a la internalización bacteriana; (ii) la disrupción de la membrana fagosomal y el escape de *L. monocytogenes* al citoplasma esta mediado por la toxina formadora de poros listeriolisina O (codificada por el gen *hly*) y las fosfolipasas PlcA y PlcB; (iii) la proteína de superficie ActA participa en la polimerización de la actina celular para generar una estructura denominada 'cometa de actina' que provee la fuerza motriz que permite a la bacteria desplazarse en el citoplasma de las células infectadas y dispersarse a células adyacentes. Los genes *hly*, *plcA*, *plcB* y *actA* se encuentran en el locus principal de virulencia que codifica igualmente por PrfA, un activador transcripcional de los principales factores de virulencia bacterianos; la transcripción de PrfA es termoregulada, por lo que su máxima expresión se da a 37°C, temperatura que concuerda con la de los organismos hospederos de *L. monocytogenes* (Cossart 2011).

Diversos estudios han permitido determinar las principales cascadas de señalización activadas por InlA e InlB que conducen a la internalización de *L. monocytogenes* en células hospedero: modificaciones post-traduccionales de los receptores E-cadherina y c-Met (Bonazzi et al. 2008, Veiga et al. 2005) permiten reclutar una plataforma molecular asociada a la clatrina (Veiga et al. 2007, Bonazzi et al. 2011),

favoreciendo la modificación de la membrana celular alrededor de *L. monocytogenes* durante su internalización gracias a la polimerización de la actina (Bierne et al. 2001). A pesar de que se han descrito múltiples factores celulares que regulan positivamente (Ireton et al. 1999, Bierne et al. 2005, Pizarro-Cerda et al. 2007) o negativamente (Kühbacher et al. 2012) los rearrreglos del citoesqueleto durante el proceso de captación de la bacteria, muchas funciones y mecanismos de acción del infectoma humano continúan siendo estudiados. El uso de sistemas biológicos basados en la inactivación de grupos de genes utilizando el silenciamiento con ARNs pequeños de interferencia (siARN), ha abierto nuevas vías para el análisis global de las cascadas de señalización del hospedero en el contexto de funciones celulares específicas, incluyendo fagocitosis e internalización de patógenos (Pizarro-Cerda et al, 2012). La presente investigación aprovecha el uso de esta técnica para investigar la posible contribución de las proteínas tropomiosina (TPM) y NEDD9 a la invasión celular por parte de *L. monocytogenes*, estudiando además el impacto de la inactivación de la expresión de estas proteínas en el citoesqueleto de actina.

## Materiales y Métodos

### Líneas celulares y bacterias

Se utilizó la línea celular HeLa ATCC CCL2 cultivada en medio de crecimiento DMEM suplementado con 10% de FBS y Glutamax (Invitrogen) en ausencia de antibióticos. *L. monocytogenes* cepa EGD.PrfA\* (BUG3057) fue cultivada en medio BHI (Gibco); *S. typhimurium* y *E. coli* + invasina fueron cultivadas en medio LB (Gibco).

### Transfección de siARNs

Se utilizaron conjuntos de 4 siARNs de tipo 'Smartpool' (Dharmacon) dirigidos contra TPM y NEDD9, así como una secuencia control de siARN aleatorio que no está dirigida contra ningún gen de mamífero. Se mezclaron 200 nM del siARN de interés y 0.2 µl del agente de transfección Lipofectamina ARNiMAX en medio DMEM + Glutamax sin suero y se mantuvo durante 1h a temperatura ambiente para permitir la formación del complejo siARN-Lipofectamina; seguidamente, se realizó una suspensión de células HeLa, de forma que se cultivó en cada pozo (placas de 96 o 24 pozos)  $5,4 \times 10^4$

células/ml en medio de crecimiento con un 10% de solución de transfección y se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada al 10% con CO<sub>2</sub> durante 72 horas para permitir la transfección. Para verificar la eficiencia de cada inactivación, se obtuvieron lisados celulares digiriendo en una solución Laemmli 2X células control así como células inactivadas para TPM o NEDD9: estos lisados se sonicaron durante 3 segundos a una amplitud de 20% y las proteínas se migraron en un gel de poli(acrilamida) al 12% durante 15 minutos a 77V y 60 min a 120V, utilizando el marcador de peso molecular All Blue (BioRad). Se realizó una transferencia semi-seca a membrana PVDF durante una hora a 32mA y seguidamente se realizó el marcaje con anticuerpos primarios por 12 horas a 4°C utilizando un anticuerpo anti-TPM de conejo o un anticuerpo anti-NEDD9 de ratón (se utilizó un marcaje de histonas como control de la cantidad de lisado celular). Después de tres lavados de 5 min con leche 5%, se incubó la membrana con anticuerpos secundarios anti-ratón o anti-conejo acoplados a la HRP durante 2 horas a temperatura ambiente. El marcaje se reveló con el método de película utilizando la solución Super Signal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific).

### Ensayos de invasión

El medio de cultivo de células HeLa transfectadas con siARNs en placas de 96 pozos (5 pozos por tratamiento, 5 repeticiones por ensayo) se reemplazó con 100 µl de una suspensión bacteriana de *L. monocytogenes* EGDe PrfA\*, *E. coli* + invasina de *Yersinia pseudotuberculosis* o *Salmonella typhimurium* a una concentración de 2x10<sup>6</sup> células/ml en medio DMEM al 1% de FBS sin antibióticos. Se incubó durante 1 hora a 37°C y en una atmósfera humidificada al 10% con CO<sub>2</sub>. Para estimar la cantidad de bacterias inoculadas, se efectuó un conteo en placa, realizando diluciones de 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup> del inóculo y cultivando en placas de agar BHI, agar LB+Cloranfenicol (30µg/ml) y medio LB respectivamente (Kühbacher 2013, Kühbacher et al. 2013, 2014). A continuación, se removió el medio de *L. monocytogenes* de cada pocillo y se agregó 100 µl de medio DMEM suplementado con 10% de FBS y 50 µg/ml de gentamicina para eliminar las bacterias extracelulares. Se incubó la placa durante 1h a 37°C en una atmósfera humidificada al 10% con CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se lavaron las células de cada pozo una vez con 100 µl de medio de crecimiento para

eliminar el antibiótico y se agregaron 100µl de agua destilada para lisar las células. En una nueva placa de 96 pozos se prepararon diluciones del lisado de 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> y 10<sup>-3</sup>; 10µl de cada dilución se colocó en placas de agar respectivo y se incubaron a 37°C durante la noche, para permitir el crecimiento de unidades formadoras de colonias (CFUs). Dividiendo el número de CFUs entre el número de bacterias inoculadas se obtuvo el porcentaje promedio de invasión, y se realizó un análisis estadístico con la prueba de t-Student para determinar la significancia de los resultados.

### Microscopia de fluorescencia

Con el fin de determinar el efecto de la inactivación de TPM y NEDD9 sobre la organización de citoesqueleto de actina, se procedió a silenciar la expresión de estas proteínas en células HeLa cultivadas en cubre-objetos de 12 mm de diámetro; células inactivadas y células control se fijaron y se permeabilizaron con una solución de formaldehído al 4% por 15 minutos y medio de permeabilización (PBS + BSA al 1% + 0,1% Tritón X100) por 4 minutos, respectivamente, en un volumen final de 200 µl. Posteriormente, se efectuó el marcaje de la actina con faloidina Alexa-546 (1:200) diluida en PBS+1%BSA mediante incubación en una cámara húmeda durante 30 minutos. Los cubre-objetos se fijaron utilizando la resina Fluoromount-G y las muestras se analizaron utilizando un microscopio invertido de tipo 'wide-field' con luz blanca y con fluorescencia roja (546 nm).

### Resultados

La eficiencia de la inactivación de TPM y NEDD9 en células HeLa se corroboró mediante transferencia a membrana de vinilideno, resultando en la eliminación de una banda cercana a 37 kDa en el caso de TPM (figura 1A) y una banda entre 100 y 150 kDa en el caso de NEDD9 (figura 2A). El resultado de la reducción en la expresión de TPM se asocia a una reducción del 61% (±31) en el porcentaje de invasión de *L. monocytogenes* EGDe.PrfA\* respecto al inóculo (figura 1B). Para investigar si este resultado es específico a la cascada de señalización InIb-Met utilizada por *L. monocytogenes* en células HeLa, se estudió en paralelo el efecto de la inactivación de TPM en la entrada de otros dos patógenos intracelulares: *Escherichia coli* expresando la invasina de

*Yersinia pseudotuberculosis*, y *Salmonella typhimurium*; como se puede observar en la Figura 1B, la inactivación de TPM también reduce en forma significativa ( $59\% \pm 26$  y  $41\% \pm 29$ , respectivamente) la entrada de estas dos bacterias en células HeLa. En contraste, la inactivación de la proteína adaptadora NEDD9 conduce solo a una leve reducción, no significativa, de la entrada de los tres patógenos intracelulares estudiados:  $22\% \pm 13$  en el caso de *L. monocytogenes* EGDe PrfA\*,  $13\% \pm 16$  en caso de *E. coli* + invasina y  $29\% \pm 19$  en el caso de *S. typhimurium* (figura 2B).

Para comprender el mecanismo molecular responsable de la reducción en la entrada de patógenos durante la inactivación principalmente de TPM, se estudió el impacto de esta inactivación en la distribución del citoesqueleto de actina, un componente crítico durante el proceso de invasión celular por patógenos bacterianos. La inactivación de TPM conduce a una modificación drástica en el número, estructura y direccionalidad de las fibras de estrés de actina con respecto a células control: mientras que en células control estas fibras están ampliamente distribuidas en el citoplasma, son alargadas y siguen globalmente una misma dirección, en células carentes de TPM hay una disminución importante en la densidad de fibras de estrés, y en aquellas

fibras que permanecen se observa una menor longitud y menor organización espacial; en forma consecuente, la morfología de células carentes de TPM es más poligonal. La inactivación de NEDD9 conlleva igualmente a la aparición de células poligonales, pero la densidad de fibras de estrés es mayor que en células carentes de TPM, aunque la organización de las mismas parece alterada (figura 3).

## Discusión

En este trabajo se comparó la infección de células HeLa por parte de *L. monocytogenes*, con la invasión del enteropatógeno *S. typhimurium* y con la entrada de una cepa de *E. coli* que expresa la invasina de *Y. pseudotuberculosis*. Tanto *L. monocytogenes* como *E. coli* + invasina utilizan receptores de membrana en células HeLa ( $\alpha$ -Met y  $\beta$ 1-integrina, respectivamente) para activar cascadas de señalización que conducen a un cambio local del citoesqueleto de actina, permitiendo la entrada de estas bacterias en las células hospedero (Cossart & Sansonetti, 2004; Pizarro-Cerda & Cossart, 2006). *S. typhimurium*, por el contrario, utiliza un sistema de secreción de tipo III que permite a la bacteria inyectar proteínas efectoras en el citoplasma de la célula huésped,

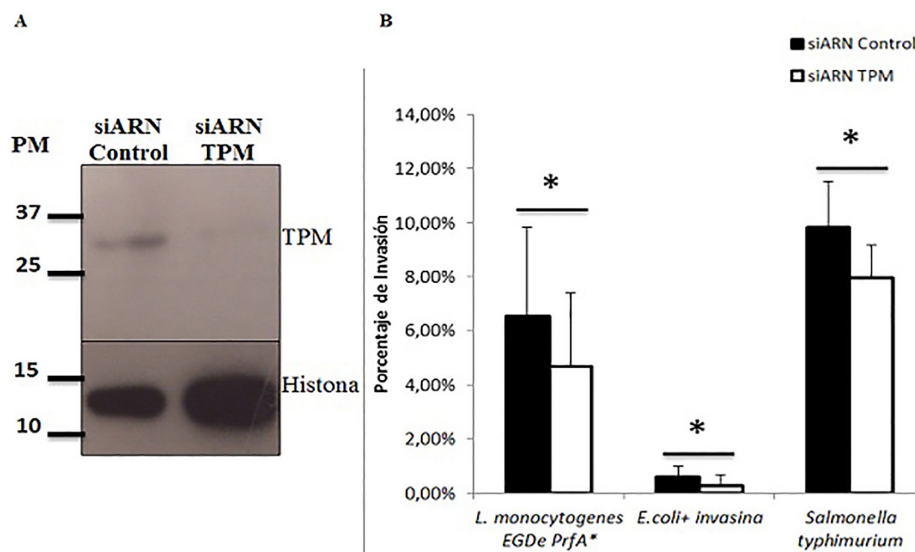


Figura 1. Comportamiento de la invasión bacteriana en células HeLa inactivadas para TPM. A. Resultado de la transfección de siARN TPM y siARN control en la expresión de la proteína TPM. B. Porcentajes de invasión de las bacterias *L. monocytogenes* EGDe PrfA\*, *E. coli* + invasina y *S. typhimurium* en células control y células con inactivación de TPM. Prueba de t-Student: \* $p < 0,05$ .

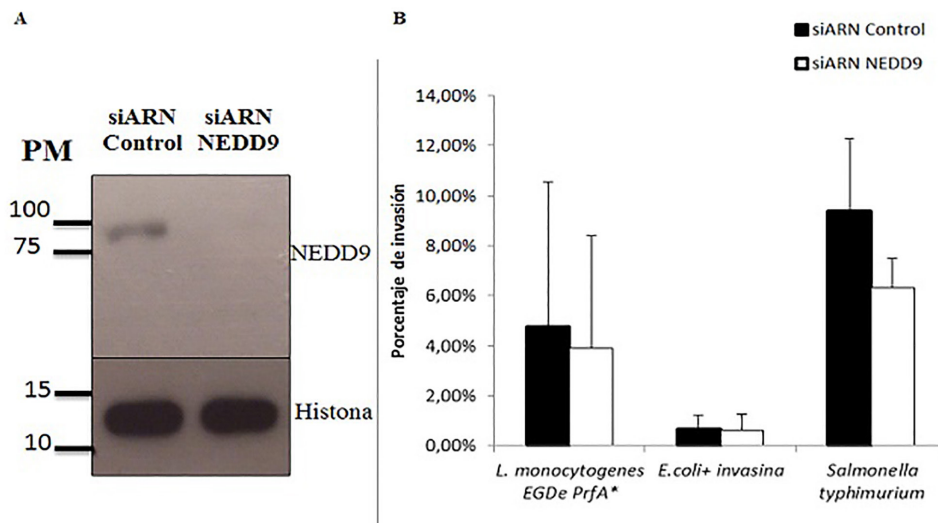


Figura 2. Comportamiento de la invasión bacteriana en células HeLa inactivadas para NEDD9. A. Resultado de la transfección de siARN NEDD9 y siARN control en la expresión de la proteína NEDD9. B. Porcentajes de invasión de las bacterias *L. monocytogenes* EGDe PrfA\*, *E. coli* + invasina y *S. typhimurium* en células control y células con inactivación de NEDD9.

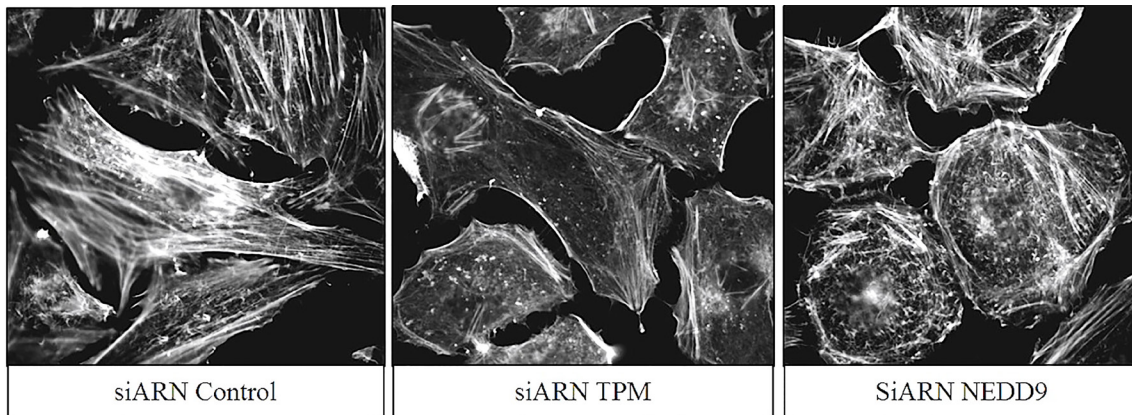


Figura 3. Immunofluorescencia de actina celular marcada con faloidina en células HeLa sin inactivación de proteínas (siARN Control), células inactivadas para la proteína TPM (siARN TPM) y células con inactivación de la proteína NEDD9 (siARN NEDD9). Imagen tomada con objetivo 100X.

manipulando rutas de señalización desde el interior de la célula que conducen a rearrreglos masivos del citoesqueleto de actina que también conducen a la internalización del patógeno (Pizarro-Cerda & Cossart, 2006).

Nuestro trabajo muestra que la inactivación de TPM mediante la técnica de transfección de siARNs disminuye en forma significativa la entrada tanto de *L. monocytogenes* como de *S. typhimurium* y de *E. coli* + invasina en células HeLa (figura 1). Como se ha mencionado anteriormente, estas tres bacterias

invasivas, a pesar de activar cascadas de señalización distintas, coinciden en una manipulación molecular del citoesqueleto de actina para lograr modificar la membrana plasmática y favorecer su internalización en células huésped. Los resultados expuestos anteriormente sugieren que la inactivación de TPM modifica una cascada global de señalización común a estos tres patógenos, probablemente ligada al control del citoesqueleto de actina. En efecto, TPM es una proteína citoplasmática de 32 kDa, de la cual existen cinco isoformas que regulan, estabili-

zan y reorganizan los filamentos de actina (Kubo *et al.*, 2012). El análisis de la morfología celular y la distribución del citoesqueleto de actina en células carentes de TPM indican que la inactivación de esta proteína conduce a la aparición de células con morfología más poligonal en comparación con las células control, en las cuales las fibras de estrés prácticamente desaparecen o presentan una importante desorganización vectorial (Figura 3); dentro de este contexto, es posible sugerir como hipótesis que estos cambios estructurales en células HeLa podrían estar asociados a un defecto mayor en la capacidad de rearrreglos de la membrana plasmática que impide la internalización de patógenos tan distintos como *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* o *E. coli* + invasina.

Los resultados obtenidos con la proteína NEDD9 indican que esta hipótesis requiere un análisis más detallado. NEDD9 es una proteína de 93 kDa ubicada tanto en el núcleo como en el citoplasma celular, y se considera como una molécula reguladora de la migración celular y de la dinámica de las adhesiones focales en asociación a las integrinas (Aquino *et al.* 2009, Zhong *et al.* 2012). La inactivación de NEDD9 provoca, al igual que en el caso de la inactivación de TPM, cambios importantes en la morfología celular y en la distribución de filamentos de actina (Figura 3). La carencia de NEDD9, sin embargo, no afecta en forma significativa la entrada de los tres patógenos bacterianos utilizados en este trabajo, a pesar de que se observa una leve reducción en la entrada de *L. monocytogenes* y *S. typhimurium* en células HeLa inactivadas comparadas con células control (figura 2). Un examen detallado del citoesqueleto de actina en células carentes de TPM y NEDD9 sugiere que la densidad de fibras de estrés es menos importante durante la inactivación de TPM (figura 3), lo que podría estar directamente asociado a la disminución en la invasión celular, pero una cuantificación objetiva de la distribución y densidad de estas estructuras con el uso de programas de análisis de imágenes como ImageJ o Icy (de Chaumont *et al.* 2012, Schneider *et al.* 2012) es necesario para poder establecer conclusiones definitivas.

Mientras que NEDD9 modifica la distribución de los filamentos de actina en forma indirecta, TPM tiene la capacidad de regular directamente la organización de estas estructuras. El uso de técnicas bioquímicas como la inmuno-precipitación o técnicas microscó-

picas como el análisis de distribución y colocalización de proteínas citoplasmáticas, permitirá identificar los efectores moleculares activados en las cascadas de señalización manipuladas por *L. monocytogenes*, *S. typhimurium* y *E. coli* + invasina que podrían interactuar directamente con TPM durante los procesos de rearrreglo de la actina celular, favoreciendo la comprensión de la contribución de esta molécula al proceso de invasión bacteriana y modificación de las propiedades estructurales de la membrana celular.

## Bibliografía

- Aquino, J., Lallemand, F., Marmigère, F., Adameyco, I., Golemis, E. & Ernfors, P. 2009. *The retinoic acid inducible Cas-family signaling protein Nedd9 regulates neural crest cell migration by modulating adhesion and actin dynamics.* *Neuroscience*. 162 (4): 1106-1119.
- Bierne, H., Gouin, E., Roux, P., Caroni, P., Yin, H. L. & Cossart, P. 2001. *A role for cofilin and LIM kinase in Listeria-induced phagocytosis.* *Journal Cell Biology*. 155: 101-112.
- Bierne H., Miki H., Innocenti M, Scita G, Gertler FB, Takenawa T, Cossart P. 2005. *WASP-related proteins, Abi1 and Ena/VASP are required for Listeria invasion induced by the Met receptor.* *Journal of Cell Science* 118(P7): 1537-1547.
- Bonazzi M, Vasudevan L, Mallet A, Sachse M, Sartori A, Prevost MC, Roberts A, Taner SB, Wilbur JD, Brodsky FM, Cossart P. 2011. *Clathrin phosphorylation is required for actin recruitment at sites of bacterial adhesion and internalization.* *Journal of Cell Biology* 195(3): 525-536.
- Bonazzi, M., Veiga, E., Pizarro-Cerdá, J. & Cossart, P. 2008. *Successive post-translational modifications of E-cadherin are required for InlA-mediated internalization of Listeria monocytogenes.* *Cellular Microbiology* 10(11): 2208-2222.
- Cossart, P. 2011. *Illuminating the landscape of host-pathogen interactions with the bacterium Listeria monocytogenes.* *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 108(49): 19484-19491.
- Cossart, P., & Sansonetti, P.J. 2004. *Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens.* *Science* 304 (5668) 242-248.
- de Chaumont F, Dallongeville S, Chenouard N, Hervé N, Pop S, Provoost T, Meas-Yedid V, Pankajakshan P, Lecomte T, Le Montagner Y, Lagache T, Dufour A, Olivo-Marin JC. 2012. *Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research.* *Nature Methods* 9(7): 690-696.
- Doran, K.S., Banerjee A., Disson, O., & Lecuit, M. 2013. *Concepts and mechanisms: crossing host barriers.* *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 3(7): a010090.
- Ireton, K., Payrastra, B., & Cossart, P. 1999. *The Listeria monocytogenes protein InlB is an agonist of mammalian phosphoinositide 3-kinase.* *Journal of Biological Chemistry* 274(24): 17025-17032.

- Kubo, E., Hasanova, N., Fatma, N., Sasaki, K. & Singh, D. 2012. Elevated tropomyosin expression is associated with epithelial-mesenchymal transition of lens epithelial cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 17(1):212-221.
- Kühbacher, A. 2013. Identification of new molecular effectors involved in the internalization of the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* in target cells using high throughput RNAi screening and targeted approaches. Tesis Doctoral (sin publicar). Universidad de París, Francia. Instituto Pasteur. 336p.
- Kühbacher, A., Cossart, P. & Pizarro-Cerdá, J. 2013. Imaging late infection steps by the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *Journal of Visual Experiments* 73: In Press.
- Kühbacher, A., Cossart, P., & Pizarro-Cerdá, J. 2014. Internalization assays for *Listeria monocytogenes*. *Methods in Molecular Biology* 1157: 8-14.
- Kühbacher A., Dambournet D., Echard A., Cossart P., Pizarro-Cerdá J. 2012. Phosphatidylinositol 5-phosphate oculocerebrorenal syndrome of Lowe protein (OCRL) controls actin dynamics during early steps of *Listeria monocytogenes* infection. *Journal of Biological Chemistry* 287(16): 13128-13136.
- Larraín de la C, D. & Carvajal, J. 2008. Aspectos fisiopatológicos y moleculares involucrados en el traspaso de *Listeria monocytogenes* a través de la barrera placentaria. *Boletín Escuela de Medicina Universidad Católica de Chile*. 33 (1):20-30.
- Pizarro-Cerdá, J., & Cossart, P. 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124(4): 715-727.
- Pizarro-Cerdá, J., Kühbacher, A. & Cossart, P. 2012. Entry of *Listeria monocytogenes* in mammalian epithelial cells: An updated view. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2 (11): a010009.
- Pizarro-Cerdá J, Payrastra B, Wang YJ, Veiga E, Yin HL, Cossart P. 2007. Type II phosphatidylinositol 4-kinases promote *Listeria monocytogenes* entry into target cells. *Cellular Microbiology* 9(10): 2381-2390.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S. & Eliceiri, K.W. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods* 9(7): 671-675.
- Vázquez-Boland, J., Kuhn, M., Berche, P., Chak, T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zo, B., Wehland, J. & Kreft, J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*. 14 (3): 584-640.
- Veiga, E. & Cossart, P. 2005. *Listeria* hijacks the clathrin-dependent endocytic machinery to invade mammalian cells. *Nature Cell Biology* 7(9): 894-900.
- Veiga E, Guttman JA, Bonazzi M, Boucrot E, Toledo-Arana A, Lin AE, Enninga J, Pizarro-Cerdá J, Finlay BB, Kirchhausen T, Cossart P. 2007. Invasive and adherent bacterial pathogens co-opt host clathrin for infection. *Cell Host & Microbe* 2(5): 340-51.
- Zhong, J., Baquiran, J., Bonakdar, N., Lees, J., Wooi, Y., Pugacheva, E., Fabry, B. & O'Neill, G. 2012. NEDD9 stabilizes focal adhesions, increases binding to the extra-cellular-matrix and differentially effects 2D versus 3D cell migration. *PLoS ONE*. 7(4):1-10.