



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUÍMICAS

FACULTAD DE QUÍMICA

“ESTUDIO DE UNA TRANSGLICOSILASA LÍTICA DEL
SISTEMA DE SECRECIÓN TIPO III DE *Escherichia coli*
ENTEROPATÓGENA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

BIÓL. ELIZABETH GARCÍA GÓMEZ

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO



CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO D. F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 325-N del departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Bertha González Pedrajo, con el apoyo de los donativos IN217105 de la DGAPA, UNAM y P46551-Q del CONACYT; así como con el apoyo de la beca otorgada por CONACYT (registro 170088).

Los guerreros de la luz se reconocen por la mirada. Están en el mundo, forman parte del mundo, y al mundo fueron enviados sin alforja ni sandalias.

Muchas veces son cobardes. No siempre actúan acertadamente. Los guerreros de la luz sufren por tonterías, se preocupan por cosas mezquinas, a veces se juzgan incapaces de crecer.

Frecuentemente se consideran indignos de cualquier bendición o milagro. Los guerreros de la luz con frecuencia se preguntan qué están haciendo aquí. Muchas veces pasan noches en vela, creyendo que su vida no tiene sentido.

Por eso son guerreros de la luz. Porque se equivocan. Porque se preguntan. Porque continúan buscando una razón...y con seguridad la encontrarán.

Paulo Coelho
Manual del Guerrero de la luz

DEDICADA A:

Pablo Gómez Estrada (†)

Pablo Sebastián Hernández Gómez (†)

Por todo lo que sus vidas significaron en la mía, y sobre todo por su ejemplo de lucha y fortaleza constantes.

Edgar Ávalos Hernández

Por ser una lucecita en el camino y traer amor y alegría a mi vida.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Bertha González Pedrajo, por permitirme ser parte de su grupo de trabajo, por su orientación, asesoría y paciencia durante mi estancia en el laboratorio.

A la Dra. Norma Espinosa Sánchez, por su valiosa ayuda técnica y por sus consejos durante el desarrollo de este proyecto.

Al Dr. Diego González Halphen (IFC) y Dra. Herminia Loza Tavera (Fac. de Química) (comité tutorial y jurado de examen de grado), por su orientación y consejos durante el curso de la maestría.

Al Dr. Georges Dreyfus Cortés (IFC), Dra. Clara Inés Espitia Pinzón (IIB) y Dra. Yolanda López Vidal (Fac. de Medicina) (jurado de examen), por las valiosas observaciones y aportaciones hechas al presente trabajo.

A la Unidad de Biología Molecular del IFC por el apoyo técnico otorgado.

Al Ing. Juan Barbosa (Unidad de Cómputo), por su ayuda técnica durante el proceso de escritura de esta tesis.

A Teresa Ballado y Javier de la Mora (Lab. Dr. Dreyfus), por su ayuda técnica y teórica durante la realización de este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio 325-N (IFC): Angel, Erika, Julia, Mariana, Miguel y Raúl, por su ayuda en el laboratorio, terapias de risa, brevariarios culturales y por todos los momentos inolvidables que he pasado con ustedes.

A mis padres Maria Elena y Gerardo, mi hermana Ruth y demás familiares (tíos, primos y sobrinos), en especial a mi abuelita Ma. de Jesús y mis tías Tere y Chelo, quienes siempre han creído en mí y me han brindado su amor, comprensión y apoyo en todo momento.

A Jesús: no tengo palabras para agradecerte tu oportuna llegada a mi vida y tantas cosas que has traído a ella (aunque sin quererlo ya estabas conmigo desde hace tiempo). Gracias por todo: tu amistad, apoyo, confianza, cariño, tu tiempo y tanta paciencia, que también han sido un gran impulso para seguir adelante. T. Q. M.

A Edna, Karina, Lucila, Angélica, Ara, Gaby, Magali, Favy, Alina I., Ely Guillén, Felipe: por su amistad y apoyo durante cada momento crucial de esta etapa, que fue una de las más importantes (y difíciles) de mi vida.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
Cepas diarreagénicas de <i>Escherichia coli</i>	2
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena	5
Sistemas de secreción en bacterias Gram-negativas	7
Sistema de secreción tipo III (SST3)	8
SST3 de EPEC	10
Locus de esfacelamiento enterocítico	12
Formación de la lesión A/E	14
Pared celular y transglicosilasas líticas	20
Pared celular bacteriana	20
Transglicosilasas líticas	25
ANTECEDENTES	29
Transglicosilasas líticas en sistemas de secreción	29
Transformación	29
Ensamblaje flagelar	29
Biogénesis del pilus tipo IV	30
Sistema de secreción tipo I	30
Sistema de secreción tipo II	31
Sistema de secreción tipo IV	31
Sistema de secreción tipo III	32
rOrf3 del SST3 de EPEC	33
JUSTIFICACIÓN	35
HIPÓTESIS	35
OBJETIVOS	36
MATERIALES Y MÉTODOS	37
Microorganismos	37
Plásmidos	37
Cultivo de microorganismos	37
Obtención de ADN cromosomal de EPEC	38
Clonación de <i>rorf3</i>	39
Subclonación	42
Clonación de <i>rorf3</i> sin secuencia señal (<i>rorf3ss</i>)	44
Purificación de proteínas	45

Generación de anticuerpos	46
Determinación de actividad de transglicosilasa lítica por zimogramas	47
Efecto sobre el crecimiento de cultivos	47
Generación de mutantes puntuales por mutagénesis dirigida	48
Mutante nula	50
Ensayos de secreción de proteínas de EPEC	53
RESULTADOS	54
Purificación de ADN cromosomal de EPEC	54
Clonación de <i>rorf3</i> en pUC18	55
Subclonación de <i>rorf3ss</i> en pET19b	57
Expresión de <i>his-rof3</i> y purificación de His-rOrf3	59
Amplificación de <i>rorf3ss</i>	61
Expresión de <i>his-rof3ss</i> y purificación de His-rOrf3ss	64
Generación de anticuerpos	66
Actividad de transglicosilasa lítica	67
Mutantes puntuales en residuos conservados	68
Actividad de las mutantes puntuales en zimogramas	71
Efecto de la sobreproducción de rOrf3 sobre cultivos bacterianos	73
Mutante nula en <i>rorf3</i>	75
Ensayos de secreción de proteínas del SST3	78
DISCUSIÓN	82
CONCLUSIONES	92
PERSPECTIVAS	93
REFERENCIAS	94

RESUMEN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es una bacteria Gram negativa que provoca diarrea severa, principalmente en niños de países en vías de desarrollo. EPEC utiliza un sistema de secreción tipo III (SST3) para translocar efectores de virulencia directamente a las células del epitelio intestinal, con lo que se alteran diversas vías de señalización que promueven un rearrreglo de las proteínas del citoesqueleto. La patogénesis de EPEC se caracteriza por la formación de una lesión de adherencia y esfacelamiento (lesión A/E), que consiste en la eliminación de las microvellosidades, la adherencia íntima de la bacteria al enterocito, y la formación de un pedestal rico en actina debajo del sitio de adhesión bacteriana. Los genes requeridos para el ensamblaje del SST3 y la formación de la lesión A/E se localizan en una isla de patogenicidad cromosomal, denominada locus de esfacelamiento enterocítico (LEE).

El SST3 es un complejo macromolecular formado por más de 20 proteínas, que requiere atravesar el espacio periplásmico para su ensamblaje. Sin embargo, la pared celular constituye una barrera que sólo permite el paso libre de proteínas pequeñas. Debido a esto, se ha propuesto que durante la biogénesis del SST3 existen enzimas especializadas denominadas transglicosilasas líticas (TL) que facilitan la apertura, espacial y temporalmente controlada, de la capa de peptidoglicano. En la isla LEE de EPEC se localiza el marco de lectura abierto de función desconocida *rorf3*, que codifica una proteína con similitud a transglicosilasas líticas asociadas a diferentes sistemas de secreción.

En este trabajo se amplificó y clonó una versión truncada del gen *rorf3*. La expresión se llevó a cabo en el vector pET19b, que permite la producción de una proteína recombinante con una etiqueta de histidinas. La proteína se purificó de la fracción soluble de un lisado celular, a través de cromatografía de afinidad por níquel y se determinó la actividad enzimática. Se obtuvieron anticuerpos policlonales anti-rOrf3 a partir de suero de conejos inoculados con la proteína recombinante. Demostramos mediante zimogramas (degradación de un extracto completo de la bacteria *Micrococcus lysodeikticus* incorporada en geles de poliacrilamida), que la proteína rOrf3 es una transglicosilasa lítica. Se llevó a cabo la mutagénesis dirigida de residuos conservados y se evaluó el efecto de dichos cambios en la actividad de TL. Además, se construyó una mutante nula en *rorf3* para determinar el efecto de dicha eliminación en la formación y funcionamiento del SST3 de EPEC.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa de la familia Enterobacteriaceae, microorganismos caracterizados por ser bacilos con metabolismo anaerobio facultativo (Madigan *et al.*, 1998). *E. coli* es una de las especies predominantes en la biota normal del intestino del ser humano, el cual coloniza desde las primeras horas del nacimiento, desempeñando un papel importante en el mantenimiento de la fisiología intestinal. Así, *E. coli* y su hospedero pueden coexistir con beneficios mutuos durante décadas (Kaper *et al.*, 2004; Nataro y Kaper, 1998).

Sin embargo, existen cepas patógenas de *E. coli* que son capaces de causar diversas enfermedades, incluyendo diarrea, infecciones en el tracto urinario, sepsis y meningitis. Debido al fácil acceso de patógenos ingeridos con los alimentos, el tracto gastrointestinal es susceptible a infecciones de *E. coli* diarreagénicas. Las enfermedades diarreicas en las que están implicadas estas cepas son un gran problema de salud pública a nivel mundial, provocando cerca de dos millones de muertes al año (Kaper *et al.*, 2004; Chen y Frankel, 2005).

Las cepas diarreagénicas de *E. coli* se dividen en seis categorías: *E. coli* enteropatógena (EPEC, por sus siglas en inglés), enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC) y de adherencia difusa (DAEC) (Figura 1) (Kaper *et al.*, 2004; Nataro y Kaper, 1998; Puente y Finlay, 2001). A continuación se describen las características relevantes de cada una de éstas.

Cepas diarreagénicas de *E. coli*

EPEC (cepa E2348/69 O157:H6), fue la primera *E. coli* considerada como la causa de epidemias diarreicas durante las décadas de 1940 y 1950 (Chen y Frankel, 2005; Frankel *et al.*, 1998). Esta cepa se transmite vía fecal-oral y está asociada con diarrea infantil (en niños menores de dos años), de países en

vías de desarrollo (Nataro y Kaper, 1998). EPEC se adhiere al intestino por medio de una fimbria tipo IV llamada BFP (*bundle forming pilus*), e induce una lesión histopatológica característica denominada lesión de adherencia y esfacelamiento (lesión A/E), que consiste en la eliminación de las microvellosidades del epitelio intestinal, la adherencia íntima de la bacteria al enterocito, así como en la generación de un pedestal rico en actina debajo del sitio de adhesión bacteriana (Figura 1a) (Chen y Frankel, 2005). La formación de la lesión A/E así como la producción de diarrea por esta cepa serán descritas con mayor detalle más adelante.

EHEC causa colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico, particularmente en niños. Su reservorio es el tracto intestinal de ganado bovino y los primeros reportes de infecciones por ésta se asociaron con el consumo de carne de res mal cocida, por lo que al padecimiento se le denominó “enfermedad de la hamburguesa”. Se consideran de mayor importancia patogénica a las cepas del serotipo O157:H7. Al igual que EPEC, EHEC induce la formación de la lesión A/E; sin embargo, a diferencia de ésta, la infección por EHEC se caracteriza por la expresión de las toxinas Shiga (Stx) y hemolisina (Figura 1b) (Kaper *et al.*, 2004).

EPEC coloniza el intestino delgado proximal y es la principal causa de la llamada “diarrea del viajero” en adultos de países industrializados, afectando también a niños de países en vías de desarrollo. Se adquiere a través del consumo de agua y alimentos contaminados, y coloniza el intestino por medio de factores fimbriales denominados CFA (*colonization factor antigen*). Se caracteriza también por la producción de enterotoxinas termolábiles (LT) y termoestables (ST), cuyos receptores en la célula eucarionte son los gangliósidos de superficie GM1 y GD1b, y la enzima guanilato ciclasa, respectivamente (Figura 1c) (Torres *et al.*, 2005).

EAEC es reconocida por ser la causa de diarrea persistente en niños y adultos de países en vías de desarrollo, produciendo una diarrea acuosa que a menudo es acompañada de moco. EAEC se adhiere a las células epiteliales en un patrón conocido como autoagregativo, en el que las bacterias se adhieren

una a otra en forma de “ladrillos apilados”. EAEC no secreta enterotoxinas LT o ST, sin embargo, algunos de sus factores de virulencia son las fimbrias de adherencia agregativa (AAF), las proteasas denominadas Pic (proteína de colonización intestinal) y Pet (enterotoxina codificada por plásmido), y la EAST1 (enterotoxina termoestable 1 de EAEC) que es una proteína similar a la ST de ETEC y que contribuye a la diarrea acuosa (Figura 1d) (Puente y Finlay, 2001).

EIEC provoca una diarrea acuosa similar a la causada por ETEC, sin embargo en algunos casos la enfermedad producida es parecida a la disentería, presentándose diarrea mucosa y con sangre. EIEC invade y penetra las células epiteliales del colon, lisa la vacuola endocítica y se mueve dentro de la célula eucarionte por medio de la nucleación de los filamentos de actina. Además, es capaz de moverse lateralmente a través del epitelio diseminándose de una célula a otra (Figura 1e) (Kaper *et al.*, 2004).

DAEC se define por la presencia de un patrón de adherencia difusa a células epiteliales y por causar diarrea en niños menores de 12 meses, sin embargo es poco lo que se conoce de su mecanismo de patogénesis. Produce una adhesina fimbrial denominada F1845, la cual utiliza a DAF (*decay-accelerating factor*, proteína de la superficie celular eucarionte asociada a glicosilfosfatidilinositol, que normalmente protege a las células del daño por el sistema de complemento), como receptor. Esta bacteria desencadena la activación de diferentes cascadas de transducción de señales en los enterocitos del intestino delgado, lo cual conduce al desarrollo de proyecciones celulares largas similares a dedos que envuelven a la bacteria (Figura 1f) (Torres *et al.*, 2005).

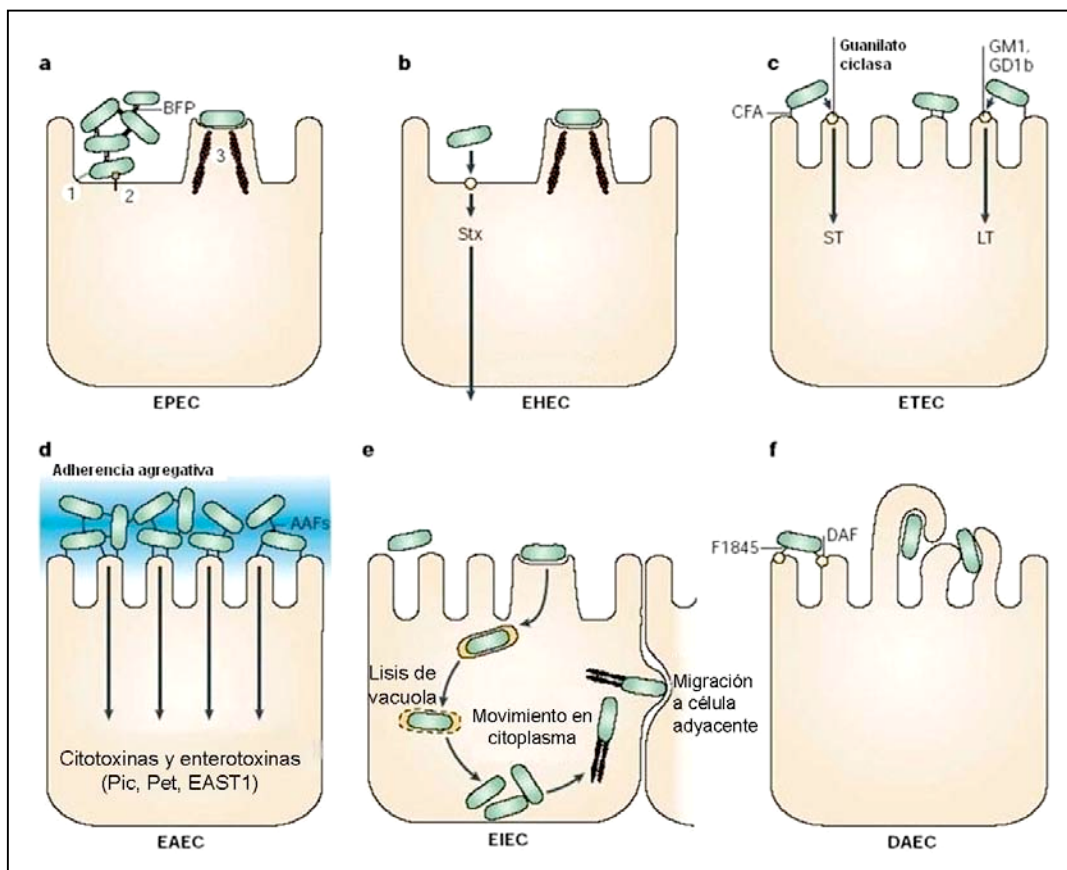


Figura 1. Representación de los mecanismos de patogénesis de las diferentes *E. coli* diarreagénicas. a) *E. coli* enteropatógena (EPEC), 1. Adherencia localizada (BFP: *bundle forming pilus*), 2. Translocación de proteínas por el SST3, 3. Formación de pedestal; b) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Stx: toxina Shiga); c) *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (ST: enterotoxina termoestable, LT: enterotoxina termolábil, CFA: *colonization factor antigen*, GM1 y GD1b: gangliósidos de superficie); d) *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (AAF: fimbria de adherencia agregativa, Pic: proteína de colonización intestinal, Pet: enterotoxina codificada en plásmido, EAST1: ST1 de *E. coli* enteroagregativa); e) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y f) *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (F1845: adhesina fimbrial, DAF: *decay-accelerating factor*) (Modificada de Kaper *et al.*, 2004).

***Escherichia coli* enteropatógena**

E. coli enteropatógena (EPEC) es responsable del 30 al 40% de la diarrea infantil en países en vías de desarrollo y se estima que provoca la muerte de cientos de miles de niños cada año a nivel mundial (Nataro y Kaper, 1998; Frankel *et al.*, 1998). EPEC produce una diarrea acuosa y prolongada, con vómito y fiebre (Puente y Finlay, 2001).

EPEC es el prototipo de una pequeña familia de patógenos que forman lesiones A/E sobre las células de su hospedero. Los otros miembros de esta

familia son EHEC (mencionada anteriormente), *Citrobacter rodentium*, patógeno de ratones que infecta células epiteliales de colon induciendo el desarrollo de hiperplasia (Donnenberg *et al.*, 1997); y algunas cepas de *E. albertii* (*Hafnia alvei*), bacteria implicada como agente productor de diarrea en niños y adultos (Goosney *et al.*, 2000; Hyma *et al.*, 2005).

Como se mencionó, la lesión A/E que caracteriza a la infección de EPEC culmina con la formación en el enterocito de un pedestal rico en actina bajo el sitio de adhesión de la bacteria (Figura 2) (Nataro y Kaper, 1998).

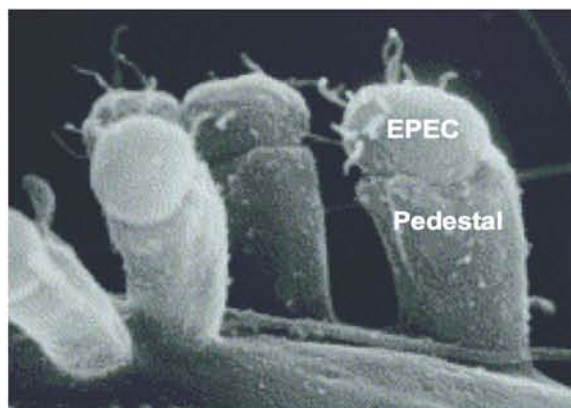


Figura 2. Fotografía de microscopía electrónica de barrido mostrando la lesión A/E inducida por EPEC en células HEL (Tomada de Knutton *et al.*, 1998).

Durante el proceso de infección EPEC utiliza un sistema de secreción tipo III (SST3) para translocar proteínas efectoras al interior de la célula eucarionte. El SST3 es uno de los sistemas de secreción utilizados por las bacterias Gram negativas que desempeña un papel central en la patogenicidad.

Sistemas de secreción en bacterias Gram negativas

Las bacterias Gram negativas secretan una amplia gama de proteínas que son requeridas para la biogénesis de organelos, como el pili y el flagelo; así como para la adquisición de nutrientes y la virulencia. La exportación de estas proteínas a la superficie bacteriana o al exterior celular involucra el transporte a través de la membrana interna, el periplasma y la membrana externa; tarea que es desempeñada por sistemas de secreción especializados que pueden

dividirse en dos grupos principales: Sec-dependientes y Sec-independientes (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003).

En las vías Sec-dependientes, las proteínas utilizan la maquinaria Sec (translocasa Sec) para atravesar la membrana interna, la cual reconoce una secuencia señal hidrofóbica o péptido líder en el extremo amino de la proteína a secretarse. Una vez en el espacio periplásmico se elimina la secuencia señal a través de peptidasas, para posteriormente ser transportadas a través de la membrana externa. Dentro de las vías Sec-dependientes se incluyen los sistemas de secreción tipo II, algunas proteínas del sistema tipo IV y los autotransportadores o sistema tipo V (Figura 3) (Remaut y Waksman, 2004; Kostakioti *et al.*, 2005).

Por otro lado, las vías Sec-independientes permiten la exportación de sustratos desde el citoplasma al ambiente extracelular en un solo paso sin que existan intermediarios periplásmicos, ni un péptido líder en el extremo amino de la proteína a secretarse. En éstas se incluye a los sistemas tipo I, tipo III y algunas proteínas del tipo IV (González-Pedrajo y Dreyfus, 2003; Remaut y Waksman, 2004; Kostakioti *et al.*, 2005) (Figura 3).

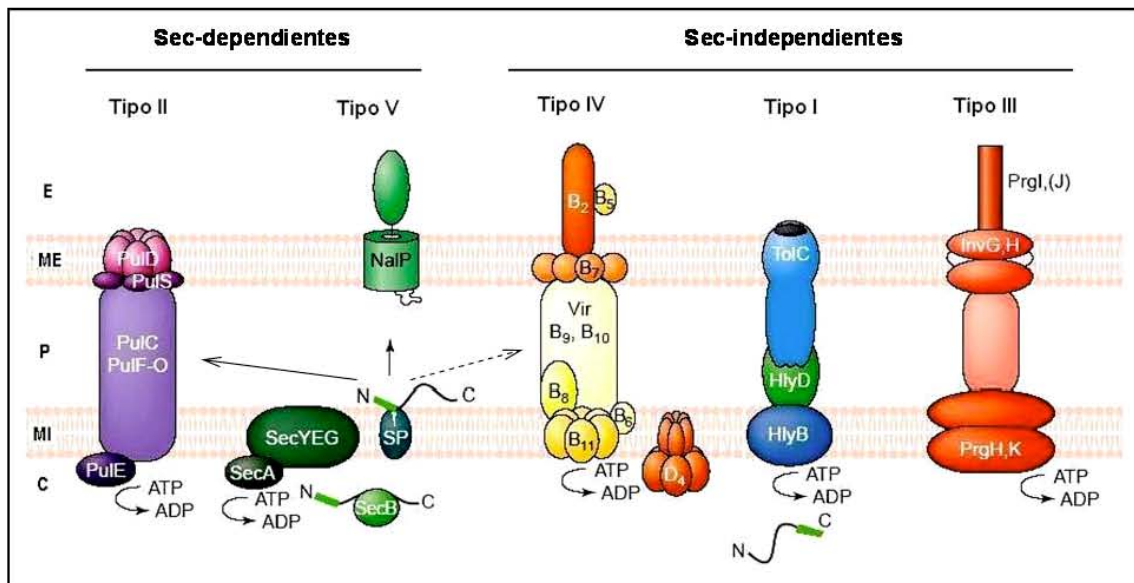


Figura 3. Sistemas de secreción en bacterias Gram negativas. El sistema tipo I está representado por la secreción de hemolisina en *E. coli*; el sistema tipo II por la secreción de la lipoproteína pululanasa por *Klebsiella oxytoca*; el tipo III por la secreción de efectores de virulencia en *Salmonella enterica*; el tipo IV por el transporte de ADN tumoral por el fitopatógeno *Agrobacterium tumefaciens*; y el tipo V (también llamado autotransportadores) está representado por NalP de *Neisseria meningitidis*, proteína involucrada en el procesamiento de otros autotransportadores, como la proteasa IgA. E: espacio extracelular, ME: membrana externa, P: periplasma, MI: membrana interna, C: citoplasma, SP: peptidasa de la secuencia señal. Las flechas continuas indican el sistema hacia el que se dirigen las proteínas que atraviesan la MI utilizando la translocasa Sec, y la flecha punteada indica que algunas de las proteínas que utilizan la maquinaria Sec, pueden atravesar la ME vía el sistema tipo IV (Modificada de Remaut y Waksman, 2004).

Sistema de secreción tipo III (SST3)

El SST3 de virulencia (también llamado inyectisoma), utilizado para la translocación de proteínas efectoras, es un complejo macromolecular exclusivo de bacterias Gram negativas compuesto por entre 20 y 25 proteínas diferentes. La secreción a través de este sistema es Sec-independiente y ocurre en un solo paso desde el citosol bacteriano directamente hasta el citoplasma de la célula eucarionte (Hueck, 1998; Galán y Collmer, 1999; Donnenberg, 2000; Ghosh, 2004).

Diversas proteínas están conservadas entre los SST3 tanto de patógenos de plantas como de animales; sin embargo, los efectores secretados y las enfermedades producidas difieren considerablemente. La mayor parte de las proteínas conservadas tienen una alta similitud con las proteínas que forman el

aparato de exportación del flagelo bacteriano (Figura 4) (Hueck, 1998; Ghosh, 2004; Tampakaki *et al.*, 2004). De esta forma, el SST3 se utiliza en el ensamblaje de dos estructuras bacterianas: el inyectisoma y el flagelo.

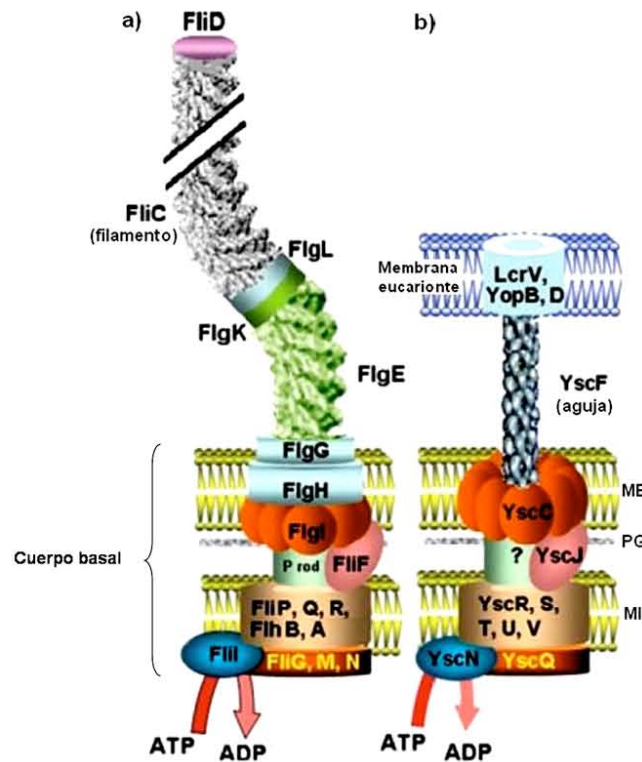


Figura 4. Estructura del sistema de secreción tipo III. a) Flagelo bacteriano en *Salmonella*; b) Inyectisoma de virulencia representado por el SST3 de *Yersinia*. ME: membrana externa, PG: peptidoglicano, MI: membrana interna (Modificada de Tampakaki *et al.*, 2004)

El SST3 de virulencia está compuesto de dos partes principales, una estructura extracelular elongada y hueca denominada aguja y una base cilíndrica o cuerpo basal que atraviesa las dos membranas bacterianas y asegura la estabilización de la estructura completa. A través de estos componentes se establece el contacto con la membrana celular del hospedero y se dirige la secreción y translocación de efectores (Tampakaki *et al.*, 2004). Además, en estos sistemas, existe una ATPasa asociada a la membrana interna bacteriana que aporta la energía necesaria para el proceso de secreción (Lee y Galán, 2004).

SST3 de EPEC

En el SST3 de EPEC, la aguja (constituida por la proteína EscF), se ensambla a partir del cuerpo basal hacia el exterior de la membrana externa (Figura 5). A diferencia de otras bacterias como *Salmonella* y *Yersinia*, EPEC es un patógeno extracelular (Rosenshine *et al.*, 1996; Donnenberg *et al.*, 1997), por lo que en su SST3 existe una estructura asociada a la aguja, formada por la proteína EspA, la cual se polimeriza desde el extremo distal de la aguja formando un organelo de superficie denominado filamento. El filamento EspA forma un puente entre la bacteria y la célula hospedero, que funciona como el conducto para la translocación de los efectores bacterianos (Figura 6). Las proteínas EspB y EspD se insertan en la membrana de la célula hospedera y forman un poro de translocación, por medio del que las proteínas efectoras pueden ser translocadas a la célula eucarionte (Sekiya *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2001).

Entre los componentes del cuerpo basal del inyectisoma de EPEC, se encuentran las proteínas EscD y EscJ que forman el anillo de membrana interna. EscD se presume como una proteína de membrana interna, con un dominio transmembranal, y un segmento que se localiza en el periplasma que se propone podría sostener al eje (Ogino *et al.*, 2006). EscJ es una lipoproteína periplásmica que forma un anillo de 24 subunidades, que se asocia a la membrana interna por medio de un motivo lipídico localizado en su extremo amino. Se propone que el anillo formado por EscJ sirve como plataforma para el ensamblaje del resto del complejo aguja, reclutando además a las proteínas transmembranales EscR, EscS, EscT, EscU y EscV, que por su homología con el aparato de exportación flagelar, se piensa forman el aparato secretor (Yip *et al.* 2005; Crepin *et al.* 2005).

Por su parte, EscC, la secretina del sistema, se localiza en la membrana externa, donde forma un anillo y funciona como un canal que permite la liberación de macromoléculas; además interactúa con EscF dándole estabilidad al inyectisoma (Gauthier *et al.*, 2003; Ogino *et al.*, 2006).

En cuanto a otros componentes, a través de estudios bioinformáticos se determinó que la proteína EscI puede formar parte del eje del inyector, que se localiza en la base del complejo aguja y que atraviesa la capa de peptidoglicano, conectando los anillos de las membranas interna y externa (Pallen *et al.*, 2005).

Las proteínas EscC, EscD y EscJ son indispensables para la formación apropiada del aparato de secreción tipo III y por lo tanto, para la secreción de proteínas efectoras a través de éste (Ogino *et al.*, 2006).

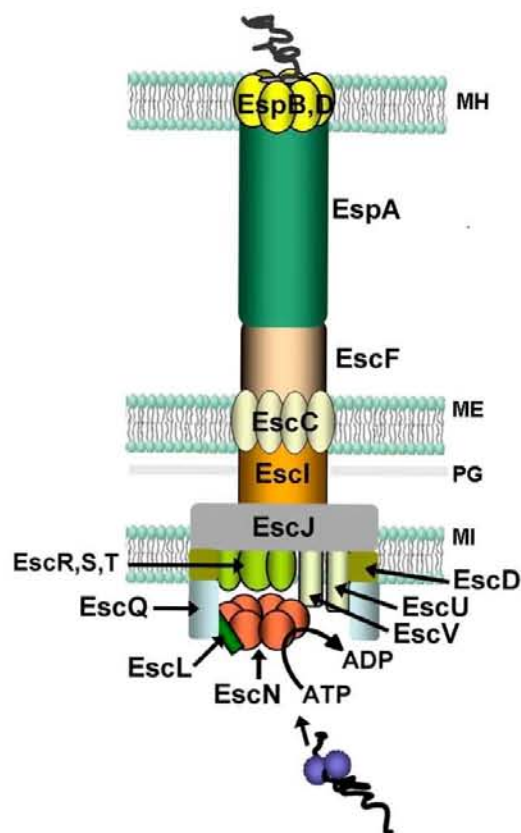


Figura 5. Componentes del sistema de secreción tipo III de EPEC. ME: membrana externa, PG: peptidoglicano, MI: membrana interna (elaborada por Angel Andrade, IFC, UNAM).

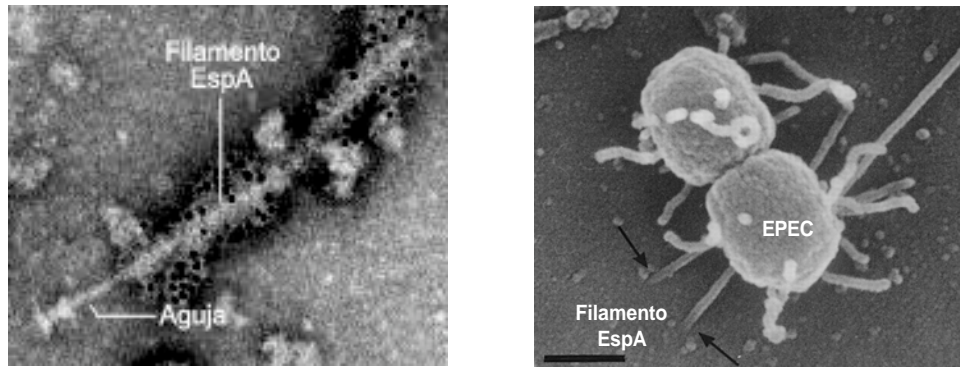


Figura 6. Filamento EspA del SST3 de EPEC. a) Fotografía de microscopía electrónica de transmisión. Inyectisomas purificados de EPEC, en la cual se observa el filamento EspA marcado con anticuerpos anti-EspA acoplados a partículas de oro (Tomada de Sekiya *et al.*, 2001); b) Fotografía de microscopía electrónica de barrido de EPEC infectando células HEL, que muestra el filamento EspA (Tomada de Knutton *et al.*, 1998).

Locus de esfacelamiento enterocítico

Todos los genes que se requieren para la formación de la lesión A/E, incluyendo los que codifican los componentes del SST3 y los efectores que se secretan a través de éste, están agrupados en una isla de patogenicidad de 35 kpb localizada en el cromosoma de EPEC, denominada locus de esfacelamiento enterocítico (LEE). LEE contiene 41 marcos de lectura abiertos (ORFs), y la mayor parte de estos genes están organizados en cinco operones policistrónicos: *LEE 1*, *LEE 2*, *LEE 3*, *tir* (*LEE5*) y *LEE4* (Figura 7).

La isla LEE contiene los genes *esc* (*E. coli secretion*) que codifican los componentes estructurales del SST3, los genes *sep* (*secretion of E. coli proteins*) que controlan el orden de secreción, los reguladores transcripcionales *ler* (*LEE-encoded regulator*), *grlA* y *grlR* (*global regulator of LEE Activator y Represor*, respectivamente), el gen que codifica para una adhesina de la membrana externa denominado intimina (*eae*) y el receptor translocado de la intimina (*tir*), los genes *esp* (*E. coli secreted proteins*) que codifican las proteínas que se secretan (tanto los efectores, como los translocadores que participan en la formación del poro), y los genes *ces* (*chaperone for E. coli secretion*) que codifican las chaperonas de los efectores (McDaniel *et al.*, 1995; Elliot *et al.*, 1998; Elliot *et al.*, 2000).

Como ya se mencionó, entre los genes ubicados en LEE se encuentran los que codifican los reguladores transcripcionales Ler, GrIA y GrIR. Ler es un regulador transcripcional positivo necesario para la expresión de los genes del LEE, así como para el gen *espC* (localizado fuera del LEE). El regulador global H-NS reprime la expresión de los genes del LEE, y Ler induce la expresión de éstos contrarrestando la represión mediada por H-NS. Diferentes estudios han demostrado que la expresión de *ler* es mediada por un complejo de reguladores globales y específicos de patógenos A/E; entre estos últimos se encuentra PerC, codificado en el locus *per* localizado en el plásmido EAF de EPEC y que puede activar directamente la expresión de *ler*. A su vez, Ler se une a su propia región regulatoria y autorreprime su transcripción (Barba *et al.*, 2005).

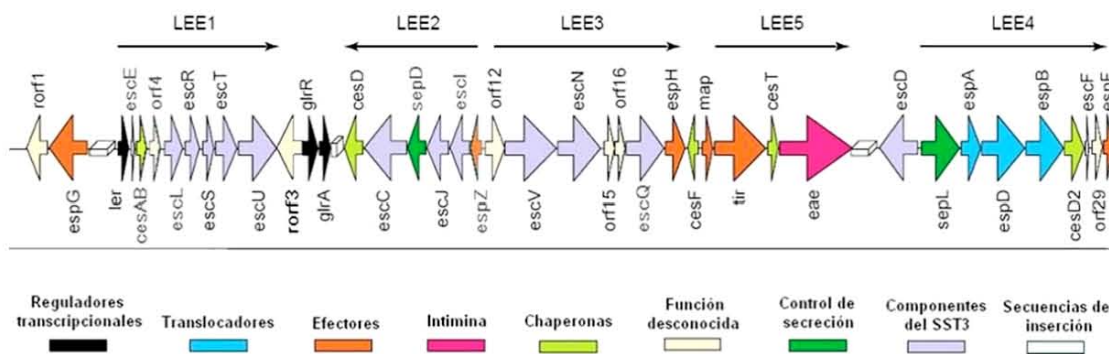


Figura 7. Isla de patogenicidad LEE de EPEC. Los genes se clasifican con diferentes colores de acuerdo a la función de la proteína codificada (Modificada de Dean *et al.*, 2005).

Dentro del locus LEE se encuentra el gen *rorf3*, que codifica una proteína en la que se tiene particular interés, ya que encontramos que presenta similitud con transglicosilasas líticas, por lo que probablemente participe en el reacomodo de la capa de peptidoglicano de EPEC durante la biogénesis del SST3.

Formación de la lesión A/E

La infección por EPEC y la formación de la lesión A/E se han dividido en tres etapas: adherencia inicial (también llamada no íntima); secreción de efectores y eliminación de microvellosidades; y adherencia íntima (Figura 8) (Puente y Finlay, 2001). Cada una de estas etapas se describe a continuación.

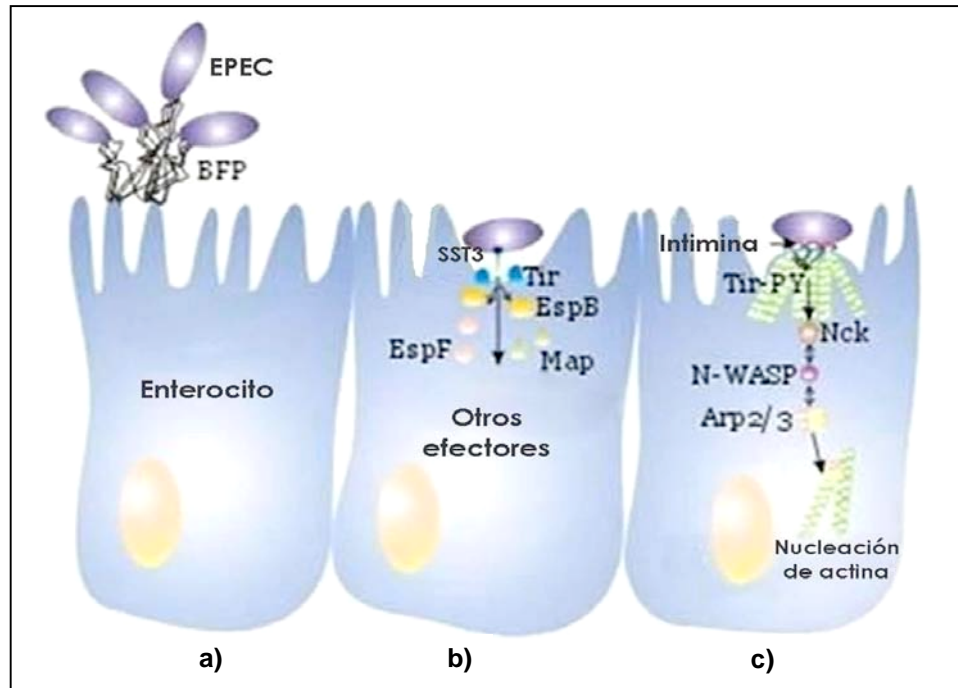


Figura 8. Etapas de la formación de la lesión A/E durante la infección de EPEC. a) Formación del microcolonias en el patrón LA (adherencia localizada) sobre la superficie del epitelio intestinal por medio del BFP (*bundle-forming pilus*); b) translocación de efectores por el SST3 y eliminación de microvellosidades del enterocito; c) adherencia íntima y formación de estructura de pedestal bajo el sitio de adherencia bacteriana.

Adherencia inicial: La lesión A/E se inicia con la adhesión no íntima de EPEC a la superficie de las células epiteliales en un patrón denominado adherencia localizada que se caracteriza por la formación de microcolonias, y está asociado con la producción de una fimbria tipo IV conocida como BFP (*bundle-forming pilus*), codificada por el plásmido EAF (EPEC adherence factor). Esta fimbria tiende a agregarse en forma de cordones y permite que se den las interacciones bacteria-bacteria y bacteria-hospedero (Figura 9) (Nougayréde *et al.*, 2003).

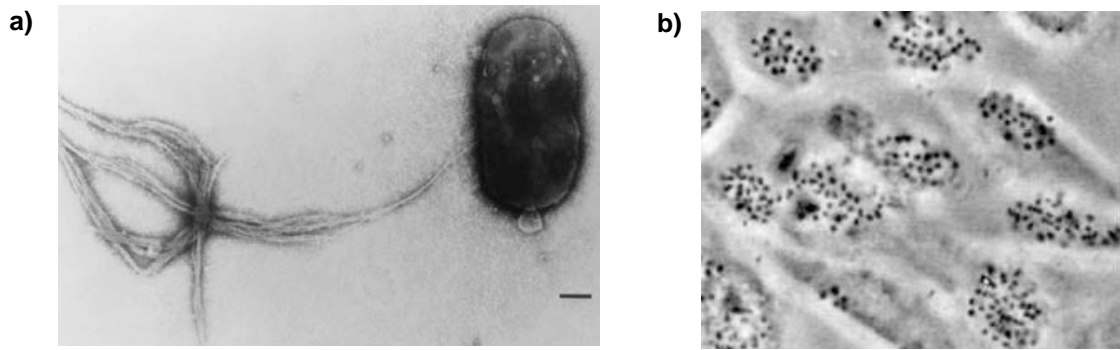


Figura 9. Adherencia inicial de EPEC al epitelio intestinal. a) Fotografía de microscopía electrónica de la fimbria BFP expresada por EPEC (Tomada de Nataro y Kaper, 1998) y b) Formación de microcolonias sobre células epiteliales (patrón de adherencia localizada) (Tomada de Chen y Frankel, 2005).

Secreción de efectores y eliminación de microvellosidades: En una segunda etapa, se secretan proteínas efectoras desde EPEC hacia la célula hospedera, a través del SST3 (Figura 10).

Algunas de las proteínas efectoras que se secretan a través del SST3 son las proteínas Esps (*E. coli secreted proteins*): EspB, EspF, EspG, EspH y EspZ, así como Tir (*Translocated intimin receptor*) y Map (*Mitochondrial associated protein*), que al ser translocadas provocan en conjunto la activación de diversas vías de transducción de señales que alteran las funciones celulares del enterocito, lo que a su vez conduce a la producción de diarrea (Garmendia *et al.*, 2005; Shaw *et al.*, 2005). Existen otros efectores que no son codificados por LEE, pero que también se secretan por el SST3, como Cif (*cycle inhibiting factor*), EspI (NleA, *non Lee-encoded effector A*), EspJ y EspG2 (Garmendia *et al.*, 2005).

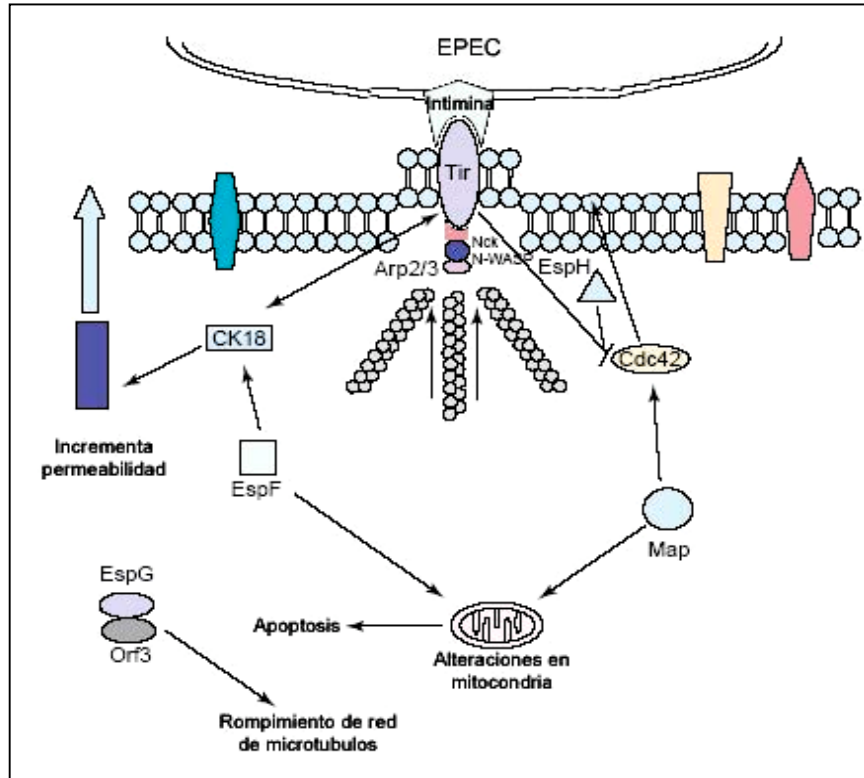


Figura 10. Translocación de efectores al interior de la célula eucariote por medio del SST3 y alteración de las vías de señalización del enterocito por efectores de virulencia (Modificada de Dean *et al.*, 2005).

La función de algunos de los efectores mencionados se describe a continuación.

EspF: Esta proteína altera en la célula hospedera las funciones de las uniones estrechas y de la barrera epitelial, contribuyendo a la inducción de la diarrea. Además, EspF se dirige a las mitocondrias, permeabiliza la membrana mitocondrial e induce la muerte del organelo y una muerte celular programada. Por otro lado, EspF puede interactuar con las proteínas citokeratina 18 y 8 (CK18 y CK8) de los filamentos intermedios, evento que está asociado con el colapso de la red de dichos filamentos (Crane *et al.*, 2001; Dean y Kenny, 2004; Nougayrède y Donnenberg, 2004).

EspG: Este efector desencadena la formación de fibras tensas de actina y la destrucción de las redes de microtúbulos debajo de la bacteria adherida, e interactúa con tubulinas. La desestabilización de los microtúbulos provoca la

activación de la vía de señalización RhoA-ROCK a través de la actividad del factor de intercambio de guanina (GEF-H1) (Matsuzawa *et al.*, 2004).

EspH: Se localiza cerca de la membrana celular de la célula hospedera y modula la estructura del citoesqueleto de actina, influyendo en la formación de filipodia y pedestales (Tu *et al.*, 2003).

Map: Esta proteína se dirige a la mitocondria a través de una secuencia de localización ubicada en su extremo amino. Map realiza 3 funciones: i) interfiere con la capacidad celular para mantener el potencial de membrana mitocondrial, induciendo malformaciones y estallamiento mitocondrial; ii) en los estadios iniciales de la infección, es responsable de la formación temporal de estructuras similares a filipodia, proceso dependiente de la proteína Cdc42; iii) altera la función de barrera intestinal de las uniones estrechas (Kenny y Jepson, 2000; Kenny *et al.*, 2002).

Tir: Además de su papel como receptor de la intimina (adhesina de EPEC), como se verá más adelante, también funciona como efector, participando en la reorganización del citoesqueleto eucarionte al desencadenar eventos de señalización en la célula hospedera (Kenny, 1999; Warawa y Kenny, 2001).

Durante esta etapa de secreción de proteínas efectoras se produce la destrucción localizada (esfacelamiento) de las microvellosidades del epitelio intestinal, debido a la despolimerización de actina y la disgregación local del citoesqueleto, lo que conduce a la retracción y pérdida de dichas microvellosidades (Figura 11) (Donnenberg *et al.*, 1997; Wales *et al.*, 2005).

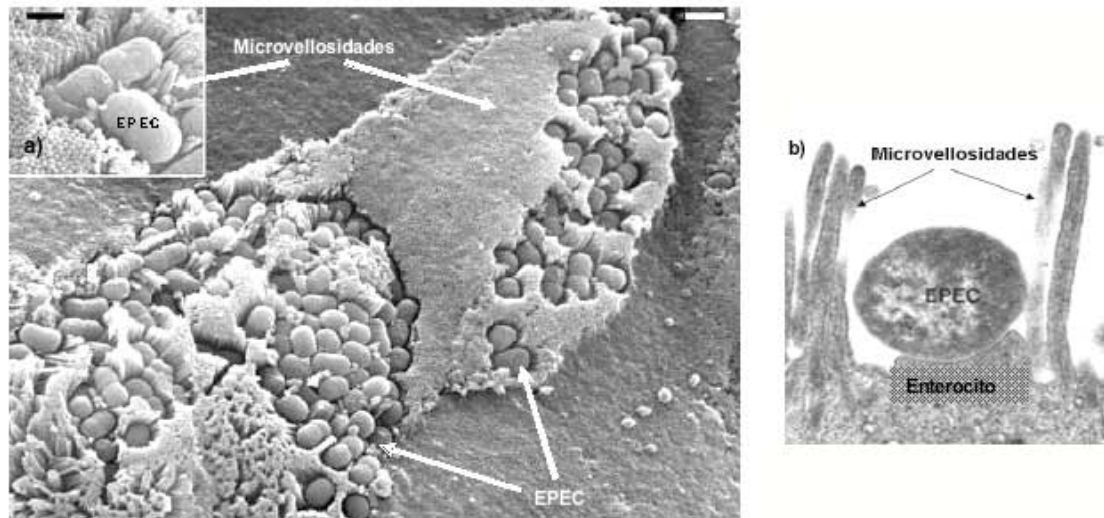


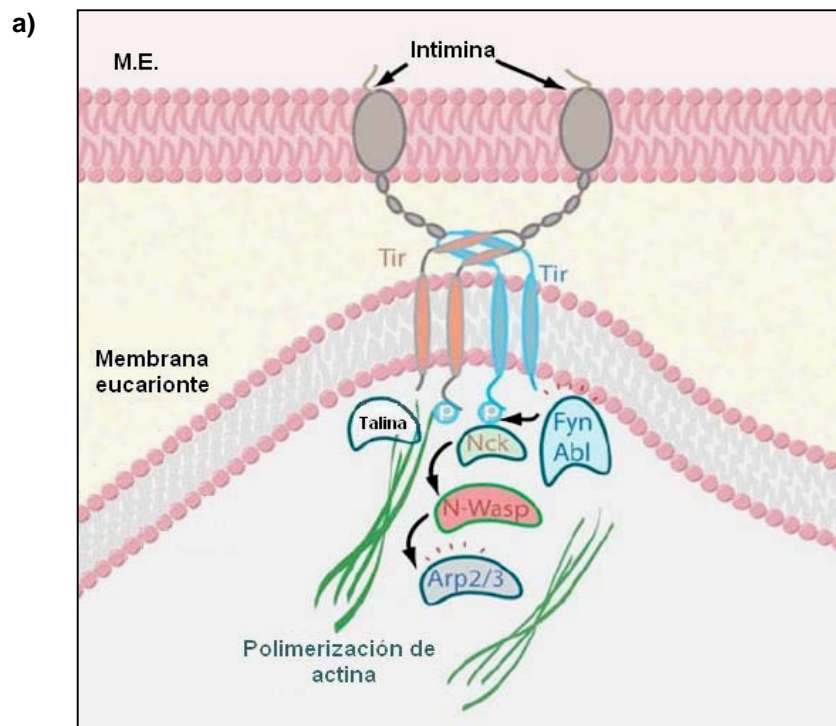
Figura 11. Fotografías de microscopía electrónica en donde se ilustran las características de la lesión A/E. a) Eliminación de microvellosidades de mucosa de intestino delgado infectado por EPEC (tomada de Shaw *et al.*, 2005) y b) Cultivo de mucosa intestinal infectado por EPEC, ilustrando la destrucción de microvellosidades y formación de pedestal por acumulación de proteínas citoesqueléticas en el enterocito (Tomada de Knutton *et al.*, 1987).

Adherencia íntima: Durante esta etapa de infección el efector Tir es de particular importancia ya que después de transportarse al citosol de la célula eucarionte, se inserta en la membrana plasmática, en donde funciona como receptor de una adhesina de la membrana externa bacteriana, denominada intimina (Figura 12a). Es decir, la bacteria inserta en el hospedero a su propio receptor, lo que le permite adherirse de forma íntima. Tir adquiere una estructura en forma de horquilla con dos hélices transmembranales y una región intermedia que constituye el dominio extracelular de unión a intimina. Los extremos amino y carboxilos quedan localizados hacia el citoplasma de la célula hospedero y están involucrados en la cascada de señalización que dará lugar a los rearrreglos de las proteínas del citoesqueleto. Una vez que se inserta, Tir es fosforilado por cinasas del hospedero en dos residuos de serina (S434 y S463) y dos de tirosina (Y454 y Y474) en el extremo carboxilo (Kenny, 1999; Warawa y Kenny, 2001; Niemann *et al.*, 2003).

La fosforilación de Tir en la tirosina Y474 es un evento crítico para el remodelaje de actina, ya que permite la unión directa de Nck, (una proteína adaptadora del hospedero), que recluta a la proteína N-WASP (proteína del síndrome neural Wiskott-Aldrich), la cual a su vez recluta y activa al complejo

de proteínas relacionadas con actina 2 y 3 (Arp2/3). El complejo Arp2/3 lleva a cabo la nucleación, formación y ramificación de los filamentos de actina (Nougayrède *et al.*, 2003; Phillips *et al.*, 2004).

Finalmente, se produce la unión íntima de EPEC a la célula eucarionte por medio de la interacción intimina-Tir, que promueve que los componentes del citoesqueleto de la célula eucarionte se acumulen debajo de la bacteria adherida. Esto resulta en la formación de una estructura en forma de pedestal constituida principalmente por actina (Nougayrède *et al.* 2003), y otras proteínas del citoesqueleto como α -actinina, fimbrina, talina, ezrina, vilina, cadenas ligeras de miosina (MLC), tropomiosina, vinculina, cortactina, VASP (fosfoproteína estimulada por vasodilatador), así como N-WASP y el complejo Arp2/3 (Figura 12) (Campellone y Leona, 2003; Chen y Frankel, 2005; Caron *et al.*, 2006).



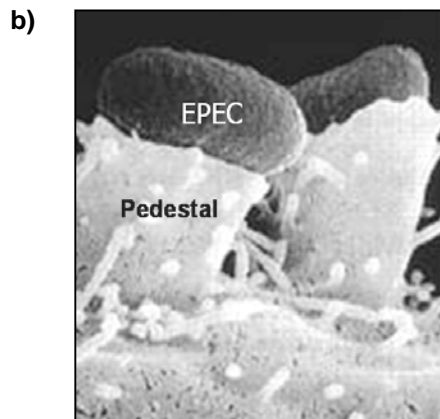


Figura 12. Adherencia íntima y formación de pedestal de actina. a) Interacción Tir-Intimina que induce el reclutamiento de la proteína adaptadora Nck, la cual a su vez recluta a N-WASP y ésta a su vez al complejo Arp2/3, conduciendo a la polimerización de actina y la formación de pedestales. ME: membrana externa (Modificada de Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006); b) Fotografía de microscopía electrónica de transmisión del pedestal de actina formado bajo el sitio de adhesión de EPEC a células HeLa (Tomada de Rosenshine *et al.*, 1996).

Pared celular y transglicosilasas líticas

Pared celular bacteriana

En las bacterias Gram negativas, la capa de peptidoglicano (también denominada pared celular o capa de mureína) está embebida en el espacio periplásmico que se encuentra entre la membrana plasmática y la membrana externa (Figura 13).

La pared celular es un biopolímero entrecruzado que se encuentra en gran parte como una monocapa, que determina la forma celular y envuelve completamente a la membrana citoplasmática de la célula, protegiéndola del estrés mecánico y osmótico (Braun *et al.*, 1973; Höltje, 1998).

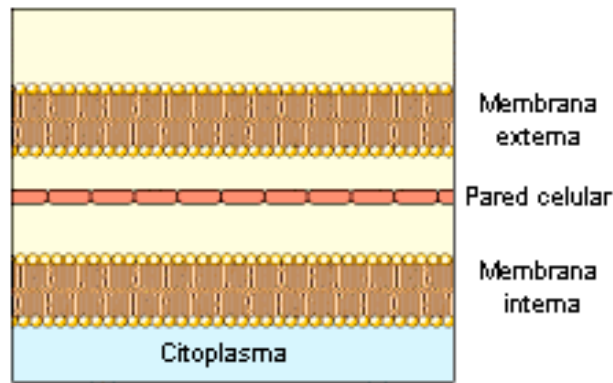


Figura 13. Localización de la pared celular en la envoltura celular de bacterias Gram negativas (Tomada de Cooper, 2000).

El peptidoglicano está integrado por monómeros formados por unidades de disacáridos de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico unidos por enlaces glicosídicos β -1,4, así como por cadenas peptídicas cortas que se unen covalentemente a las cadenas de disacáridos por medio del grupo lactilo del ácido murámico (Figura 14).

Los péptidos se entrecruzan uniendo a las cadenas de disacáridos para formar la estructura de red característica del peptidoglicano (Braun *et al.*, 1973; Cooper, 2000; Dmitriev *et al.*, 2005) (Figura 15).

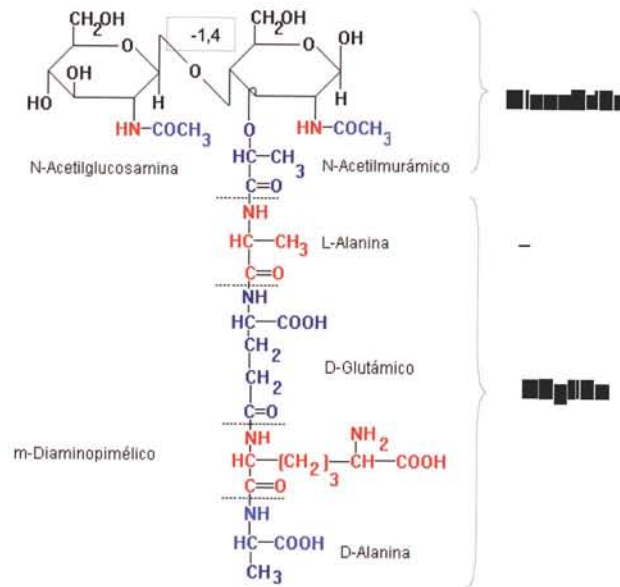


Figura 14. Ejemplo de una molécula de peptidoglicano en bacterias Gram-Negativas, en el cual se indican sus principales componentes.

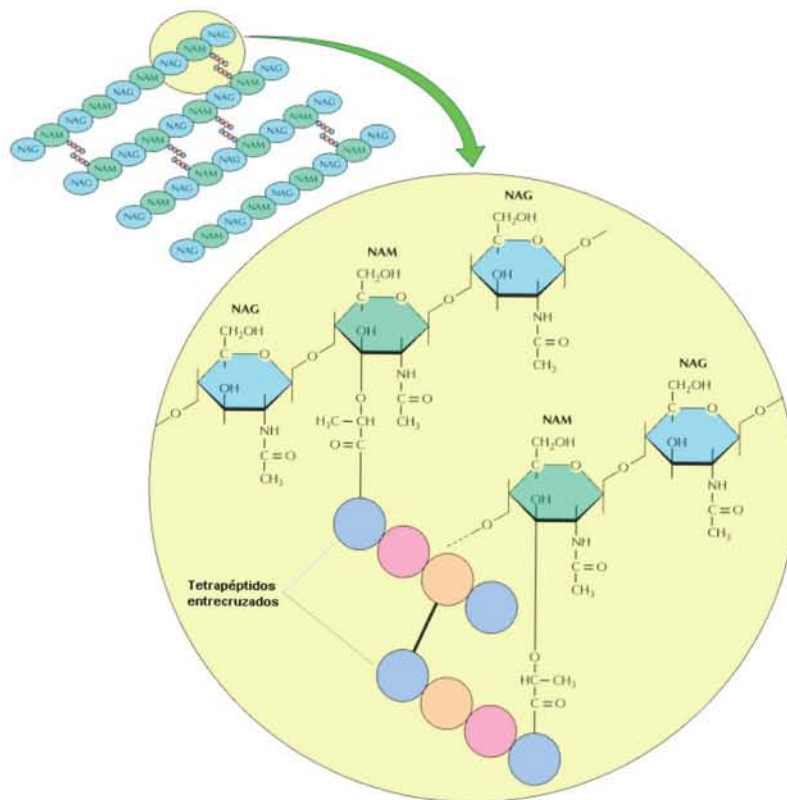


Figura 15. Estructura de la capa de peptidoglicano. NAM: N-acetylmurámico, NAG: N-acetilglucosamina (Tomada de Cooper, 2000).

Los péptidos se acomodan helicoidalmente a lo largo de las cadenas de disacáridos, con orientación hacia la derecha, proyectándose en todas direcciones y formando ángulos de 90° uno con respecto a otro. Cada vuelta de la hélice contiene 3 péptidos, cada uno de los cuales a su vez puede formar un entrecruzamiento con el péptido de una cadena glicosídica cercana, dando lugar a una estructura porosa o con un patrón de panal (Höltje, 1998; Meroueh *et al.*, 2006).

En *E. coli* un aminoácido dibásico y dicarboxílico, el ácido meso-diaminopimélico (*m*-A₂pm), permite la formación del enlace peptídico entrecruzado. Este entrecruzamiento se produce entre el grupo carboxilo de un residuo de alanina (en el extremo carboxilo terminal de un péptido), y el grupo amino ε del *m*-A₂pm de un segundo péptido (Figura 16) (Braun *et al.*, 1973; Höltje, 1995).

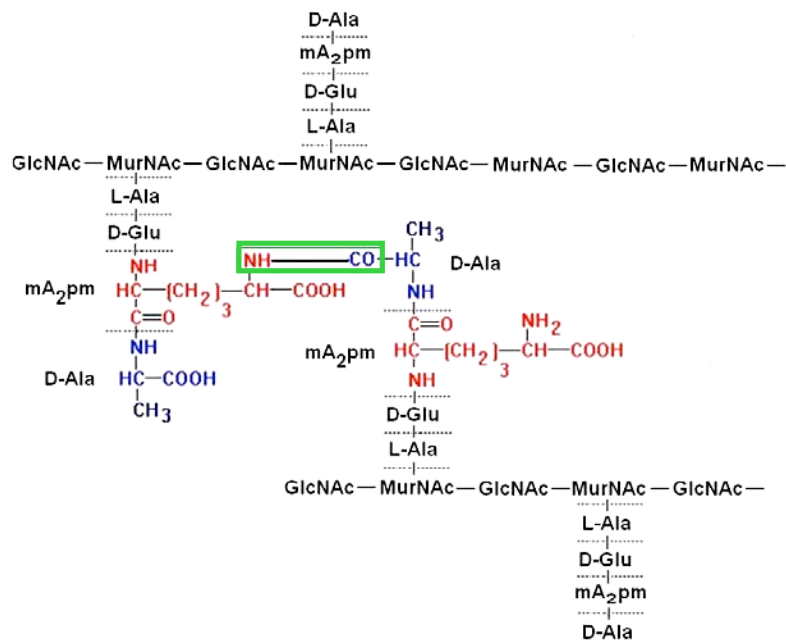


Figura 16. Entrecruzamiento del peptidoglicano, formado entre los residuos *m*-A₂pm y alanina de distintas cadenas glicosídicas (señalado por un recuadro verde). GlcNAc: N-acetilglucosamina, MurNAc: ácido N-acetilmurámico, *m*-A₂pm: Ácido meso-diaminopimélico (Modificada de Höltje, 1998).

A pesar de las propiedades descritas, la capa de peptidoglicano no es una estructura estática. Durante el crecimiento y la división celular, esta capa necesita agrandarse y separarse para permitir la formación de dos células hijas, y para estos procesos se requieren enzimas que sinteticen y degraden el peptidoglicano de una forma coordinada (Vollmer and Höltje, 2001). Existe un gran número de enzimas involucradas en la síntesis y recambio del peptidoglicano; de entre éstas, las enzimas bifuncionales que presentan actividad de transglicosilasa y transpeptidasa desempeñan un papel importante (Höltje, 1995; Höltje, 1998; Vollmer y Höltje, 2001). Las enzimas encargadas de la degradación del peptidoglicano, permiten, durante el crecimiento celular, la formación de espacios para la inserción de las subunidades nuevas en la capa existente. Además, son responsables de la degradación del tabique durante la división celular bacteriana. Entre éstas se encuentran endopeptidasas, carboxipeptidasas, amidasas y muramidadas, es decir, existe al menos una enzima por cada enlace covalente presente en el peptidoglicano (Figura 17) (Höltje, 1995).

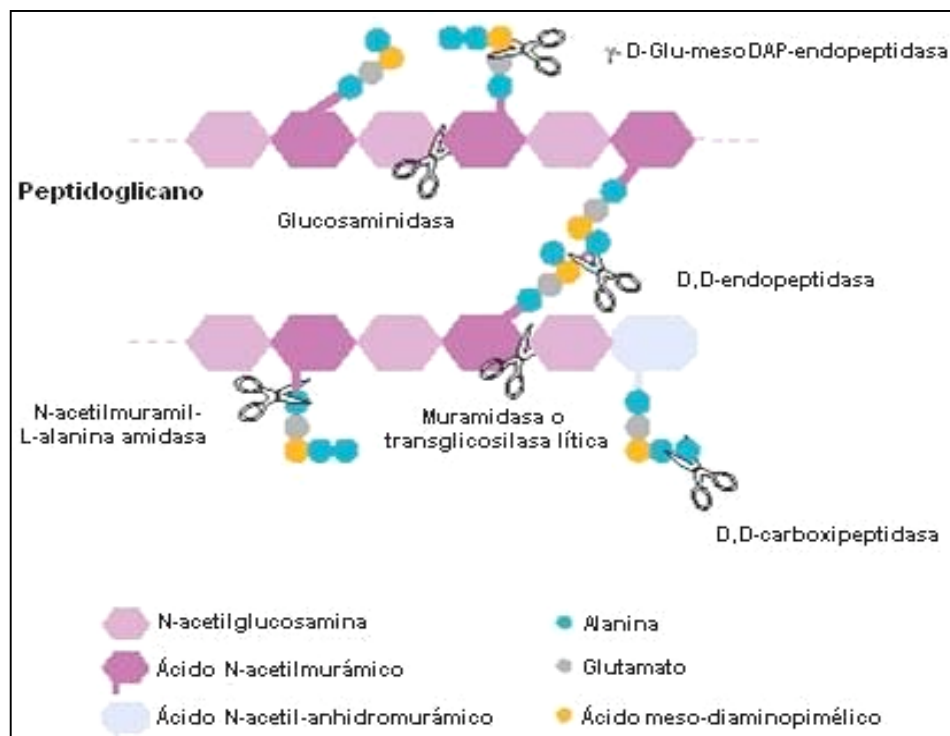


Figura 17. Enzimas líticas involucradas en el metabolismo del peptidoglicano (Tomada de Boneca, 2005).

La pared celular también actúa como una barrera de permeabilidad ya que sólo permite el paso libre de proteínas pequeñas (menores de 50 kDa); es por esto que el transporte de macromoléculas en bacterias Gram negativas requiere del ensamblaje de complejos de secreción que atraviesen la envoltura celular. Se ha propuesto que existen enzimas especializadas que facilitan la apertura, espacial y temporalmente controlada, de la capa de peptidoglicano durante la formación de dichos complejos (Dijkstra y Keck, 1996).

De hecho, en diversos sistemas de transporte se han encontrado reacomodos específicos en el peptidoglicano, así como muramidasa o transglicosilasas líticas (TL) asociadas a éstos. Estas enzimas especializadas de los sistemas de secreción se han denominado transglicosilasas líticas de transporte (para distinguirlas de las que participan en los procesos de crecimiento y división celular). Dichas enzimas necesitan actuar en el espacio y tiempo correctos, lo cual se logra por medio su acoplamiento al complejo transportador correspondiente (Koraimann, 2003).

Transglicosilasas líticas

Las TLs son enzimas que, al igual que la lisozima, degradan el peptidoglicano rompiendo el enlace glicosídico β , 1-4 entre los residuos N- acetilmurámico y N-acetilglucosamina. Pero, a diferencia de la lisozima, degradan el sustrato sin hidrolizarlo y catalizan la formación de un enlace anhidro 1-6 interno en el residuo de ácido murámico (Figura 18) (Höltje *et al.*, 1975; Höltje, 1998; Koraimann, 2003).

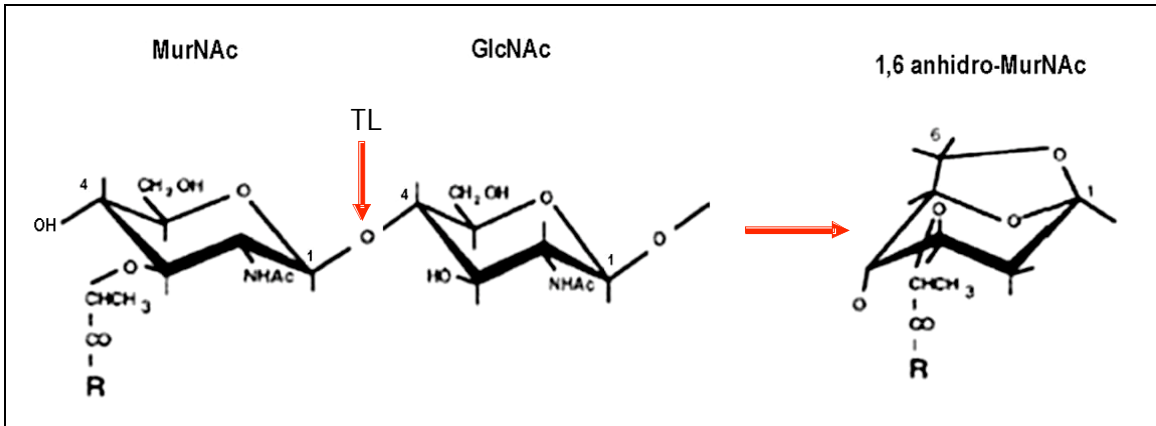


Figura 18. Sitio de acción de las transglicosilasas líticas (enlace β , 1-4) y formación del enlace 1-6 anhidro en el residuo N-acetilmurámico. TL: Transglicosilasa lítica, GlcNAc: N-acetilglucosamina, MurNAc: ácido N-acetilmurámico, R: péptido (Modificada de Höltje, 1998).

Se ha propuesto un mecanismo de reacción basado en análisis bioquímicos, mutacionales y estructurales de dos TLs o exomuramidasa involucradas en el proceso de crecimiento y división celular de *E. coli*, Slt70 (70 kDa) y Slt35 (36 kDa); en el cual un glutamato catalítico desempeña un papel central (Höltje, 1998; Koraimann, 2003). Este residuo funciona como el único ácido-base catalítico requerido para la reacción; inicialmente dona un protón al oxígeno del enlace glicosídico entre los residuos N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina, a continuación se rompe el enlace y se produce la abstracción del protón del hidroxilo del carbono 6 del oxocarbanión intermediario por el residuo catalítico desprotonado, que actúa como base, promovándose un ataque nucleofílico intramolecular al carbono 1, que resulta en la formación del residuo 1,6-anhidromurámico (Figura 19) (Thunnissen *et al.*, 1994).

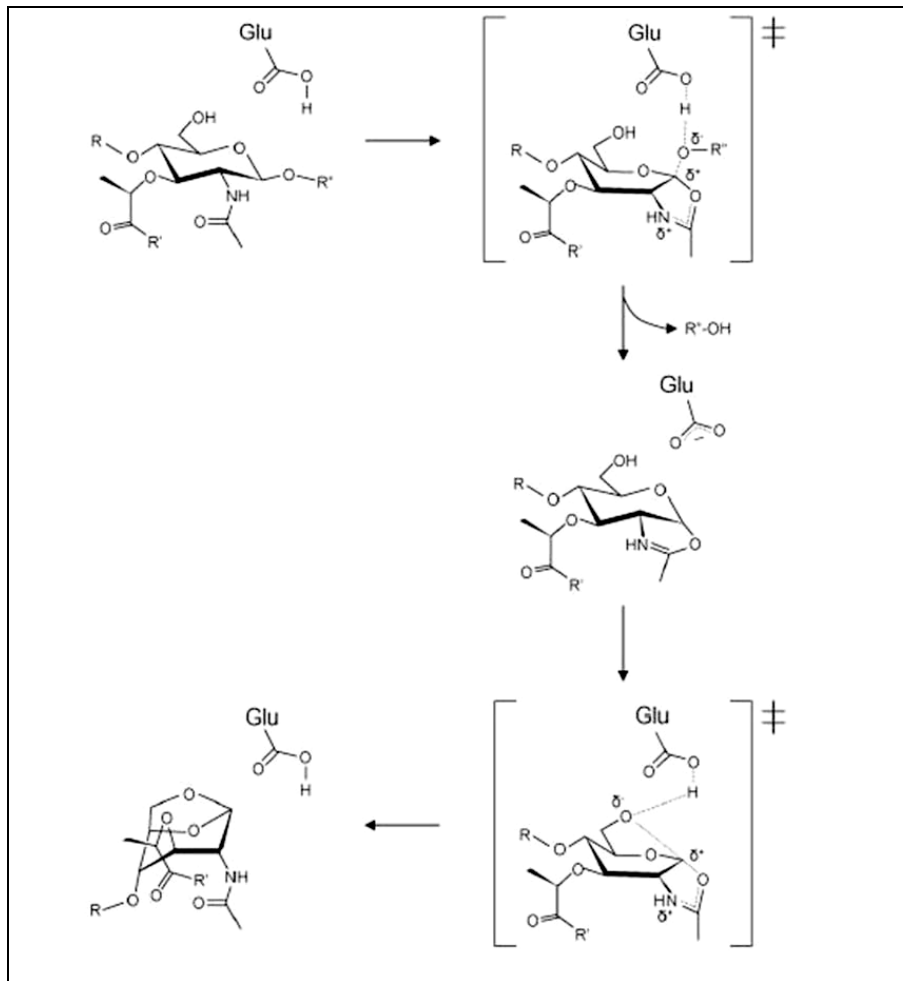


Figura 19. Mecanismo de reacción de las transglicosilasas líticas. El glutamato catalítico (Glu) protona el enlace glicosídico, conduciendo a la formación de un intermediario oxocarbenión-glutámico, que entonces actúa como base para extraer el protón del hidroxilo en el carbono 6 del intermediario, promoviendo su colapso y la formación del producto 1,6-anhidromurámico. (Tomada de Scheurwater *et al.*, 2007).

Las proteínas de la familia de TLs son ubicuas en bacterias Gram positivas y negativas, y también se encuentran en bacteriófagos, pero no están presentes en bacterias que no poseen una pared celular típica como las de las familias Chlamydiaceae y Mycoplasmataceae (Koraimann, 2003).

Las TLs pertenecen a la superfamilia *Lysozyme-like* y se caracterizan por poseer el dominio SLT (base de datos PFAM, código de acceso: PF01464). Su actividad catalítica está conferida por un residuo glutamato en el sitio activo que se encuentra altamente conservado (Koraimann, 2003). Existen tanto TLs solubles (SlT: *soluble lytic transglycosylases*), como asociadas a membrana

(Mlt: *membrane-bound transglycosylases*) que difieren en tamaño, secuencia, actividad, especificidad y localización (Blackburn y Clarke, 2001; Koraimann, 2003).

Las TLs se identifican por poseer tres motivos consenso (ES-GLMQ-AYNAG) y se han agrupado en cuatro familias de acuerdo a la comparación de sus secuencias. La familia 1 (Familia SLT) representa a una superfamilia que comparte similitud de secuencia con las lisozimas de ganso; las familias 2 y 3 agrupan a las Mlt y la familia 4 está integrada principalmente por enzimas de bacteriófagos (Blackburn y Clarke, 2001).

La estructura tridimensional de varias TLs ya ha sido determinada, entre ellas la de Slt70. Ésta consiste en un anillo superhelicoidal de α -hélices, que permite a la enzima rodear a las cadenas de polisacáridos de la mureína. Se determinó la presencia de tres dominios estructurales: el dominio U en el extremo N-terminal, el dominio *linker* que junto con el dominio U forma un anillo con un hueco de 25-35 Å, y el dominio catalítico con estructura globular en el extremo C-terminal. El dominio catalítico, cuya región N-terminal es la más conservada, no presenta similitud de secuencia con las lisozimas, pero sí muestra similitud estructural; principalmente con la lisozima de pollo (HEWL) y la lisozima del fago T4 (Thunnissen *et al.*, 1994; Thunnissen *et al.*, 1995; Höltje, 1996).

Las TLs especializadas de los sistemas de transporte son proteínas pequeñas, generalmente de 150 a 250 residuos, que son prescindibles para el crecimiento y división celulares, pero indispensables para el correcto ensamblaje y función de los sistemas de secreción macromoleculares. A pesar de su redundancia se ha propuesto que estas enzimas son blancos potenciales para nuevos agentes antibacterianos, entre los que se encuentran la hexa-N-acetilquitolhexosa, la bulgecina A y la N-acetilglucosamín tiazolina (Thunnissen *et al.*, 1994; Zahrl *et al.*, 2005).

ANTECEDENTES

Las estructuras macromoleculares de transporte están presentes en procesos como la transformación y conjugación, el ensamblaje de flagelos y fimbrias, así como en la secreción de toxinas y efectores de virulencia (Dijkstra y Keck, 1996). En esta sección se mencionan características importantes de los sistemas de secreción y transporte, así como algunos ejemplos de TLs asociadas a ellos y de proteínas cuya función no se ha determinado, pero que probablemente, por su similitud de secuencia, también sean enzimas de este tipo.

Transglicosilasas líticas en sistemas de secreción

Transformación

Las bacterias que son competentes de forma natural, son capaces de adquirir el ADN que está presente en su ambiente por medio del proceso de transformación. El ensamblaje del aparato de competencia probablemente requiere una reorganización del peptidoglicano y de hecho, se ha descrito que hay una correlación entre la actividad autolítica y la competencia. Las enzimas autolíticas podrían producir huecos locales en el peptidoglicano a través de los cuales el ADN podría ser adquirido (Dijkstra y Keck, 1996). En *Neisseria gonorrhoeae* se han identificado dos proteínas que se unen al peptidoglicano: ComL y Tpc, las cuales contribuyen a la competencia y se ha sugerido que están involucradas en el remodelaje de la pared celular, sin embargo no existe evidencia directa de su actividad de degradación del peptidoglicano (Koraimann, 2003).

Ensamblaje flagelar

El flagelo bacteriano es un filamento helicoidal que se conecta por medio de un gancho flexible a un cuerpo basal embebido en la envoltura celular bacteriana; el

cuerpo basal está formado por un eje y dos pares de anillos, de los que, el anillo P, interactúa directamente con el peptidoglicano (Dijkstra y Keck, 1996; Macnab, 2004). En este sistema, se ha demostrado el papel esencial de una muramidasa en la biosíntesis flagelar en *Salmonella enterica*, la proteína FlgJ. Esta TL presenta actividad de muramidasa en el extremo C-terminal, y este dominio se considera responsable de formar un hueco local en la capa de peptidoglicano, permitiendo de esta forma la penetración del eje a través del espacio periplásmico para finalmente formar el gancho y el filamento en el espacio extracelular (Nambu *et al.*, 1999; Hirano *et al.*, 2001).

Biogénesis del pilus tipo IV

El pilus tipo IV se encarga de la adhesión de las bacterias patógenas a un receptor específico en la célula hospedera. Aún no se ha demostrado la necesidad de una lisis localizada del peptidoglicano para la formación de este pilus, sin embargo, se ha demostrado que existe una conexión entre su formación y modificaciones del peptidoglicano (Dijkstra and Keck, 1996). Recientemente se especuló que la proteína codificada por el gen *bfpH* presente en el plásmido EAF de EPEC podría funcionar como una TL especializada en la biogénesis del pilus tipo IV, sin embargo, no se encontró que la proteína codificada por este gen fuera requerida para el ensamblaje del pilus o para la adherencia localizada de la bacteria (Anantha *et al.*, 2000).

Sistema de secreción tipo I

El ejemplo mejor estudiado para este sistema es el responsable de la exportación de la hemolisina de *E. coli* (HlyA), en el que la maquinaria secretora está integrada por las proteínas HlyB, HlyD y TolC (Remaut y Waksman, 2004). HlyB es una proteína de membrana interna que se conecta a la porina de membrana externa

TolC por medio de HlyD, la que penetra el peptidoglicano y atraviesa el espacio periplásmico, manteniendo a las dos membranas muy cercanas. Sin embargo, no se ha identificado actividad de transglicosilasa en esta proteína (Dijkstra y Keck, 1996).

Sistema de secreción tipo II

Este sistema de secreción es responsable del transporte extracelular de múltiples enzimas hidrolíticas y toxinas; el ejemplo mejor estudiado es el utilizado para la secreción de la toxina pululanasa por *Klebsiella oxytoca*. Las proteínas son secretadas a través de la membrana externa por un sistema multiproteico complejo, denominado secretón (ver figura 3) (Kostakioti *et al.*, 2005). Aún no se ha demostrado la presencia de una TL lítica asociada, ni la necesidad de una lisis del peptidoglicano para su ensamblaje, sin embargo, se ha sugerido que existe relación entre la exportación de pululanasa y la síntesis del peptidoglicano (Dijkstra and Keck, 1996).

Sistema de secreción tipo IV

Esta vía es homóloga a los sistemas de conjugación que facilitan la translocación de ADN, y secreta tanto ácidos nucleicos como proteínas, así como complejos nucleoproteicos. El sistema mejor caracterizado para ejemplificar esta maquinaria es el de transporte de ADN tumoral (T- ADN) por *Agrobacterium tumefaciens*, patógeno de plantas que exporta un complejo de nucleoproteínas que contiene al T-ADN. El operón *virB* localizado en el plásmido Ti codifica para la proteína VirB1, la que se ha identificado como una TL que está relacionada con la capacidad de formación de tumores (Cascales y Christie, 2003). La actividad muralítica de la proteína VirB1, recientemente demostrada tanto para la proteína de *A. tumefaciens* como de *Brucella suis* (Zahrl *et al.*, 2005), podría facilitar el

ensamblaje de los sistemas de secreción tipo IV, al interactuar con algunos de los componentes centrales del aparato secretor localizados en el periplasma, y por medio de la lisis localizada del peptidoglicano en el sitio de formación del sistema (Höppner *et al.*, 2005). Sin embargo, se ha descrito que VirB1 no es completamente esencial para la transferencia del T-ADN, ya que la delección del gen resulta en sólo una atenuación de la virulencia y de la formación de tumores, lo que podría indicar que existen otras enzimas que sustituyen la función de ésta, es decir, que exista redundancia, una equivalencia funcional entre las TLs que permita la eliminación de una enzima sin provocar ningún efecto (Dijkstra y Keck, 1996; Mushegian *et al.*, 1996, Höppner *et al.*, 2004).

Recientemente, en el SST4 de *N. gonorrhoeae*, sistema que secreta ADN para la transformación natural de gonococos, se identificó a la proteína AtlA como TL, además se determinó que la actividad de esta enzima es importante para la secreción de ADN por dicho sistema, el cual para su ensamblaje requiere la apertura del peptidoglicano sin lisis celular (Kohler *et al.*, 2007).

Sistema de secreción tipo III

Las islas de patogenicidad que albergan a los genes del SST3 generalmente codifican para una proteína que contiene el dominio de transglicosilasa lítica. Recientemente se determinó que la proteína IpgF codificada por el plásmido de virulencia pWR100 de *Shigella flexneri* presenta actividad de degradación del peptidoglicano, con un pH óptimo de 6.0, y es inhibida por hexa-N-acetilquitohexaosa y bulgecina A. Además se determinó la importancia del glutamato catalítico para esta actividad, ya que una mutante en este aminoácido no presenta actividad enzimática (Zahrl *et al.*, 2005). A su vez, la proteína IagB de la isla de patogenicidad SPI-1 de *Salmonella enterica* es similar a IpgF y también presenta actividad lítica sobre peptidoglicano (Zahrl *et al.*, 2005). Sin embargo, se determinó que el SST3 de estas bacterias puede ensamblarse sin la asistencia de

estas TLs y que por lo tanto pudieran existir proteínas redundantes que sustituyan la función (Koraimann, 2003).

rOrf3 del SST3 de EPEC

En el LEE de EPEC, se encuentra el gen *rorf3* (459 pb; NCBI, GI: 2897961), el cual codifica para una proteína similar a BfpH, IpgF, IagB y a FlgJ, que probablemente sea una TL que participa en la formación del SST3 de EPEC. La proteína rOrf3 tiene 152 aminoácidos (17.1 kDa; ProtParam) (ID: C38373.1), y presenta una secuencia señal, que en general es una secuencia de aminoácidos hidrofóbicos (Oliver *et al.*, 1985), lo que sugiere que es secretada por la vía general de secreción Sec.

Por otra parte, por medio de ensayos de doble híbrido en levadura, se demostró una interacción débil de rOrf3 con la proteína rOrf8 (EscI) del SST3 (Creasey *et al.*, 2003), la cual probablemente forma el eje interno en la base del complejo aguja, localizado en el periplasma (Pallen *et al.*, 2005).

En el caso de *Citrobacter rodentium* se deletó parte del gen *rorf3* del LEE y se observó que esta mutación tiene sólo un efecto parcial sobre la secreción de efectores y sobre la formación del pedestal y la virulencia, ya que siguen presentándose, pero de manera atenuada (Deng *et al.*, 2004).

A continuación se presenta un alineamiento múltiple que realizamos utilizando el programa CLUSTALW, en el que se incluyen las regiones catalíticas de algunas transglicosilasas líticas como: Slt70 de *E. coli*, VirB1 de *A. tumefaciens*, IpgF de *S. flexneri* y rOrf3 de EPEC, entre otras. En este alineamiento se muestra que la proteína rOrf3 purificada en el presente trabajo comparte con las TLs los residuos altamente conservados, entre los cuales se encuentra el glutamato que les confiere a las TLs la actividad catalítica (Figura 20).

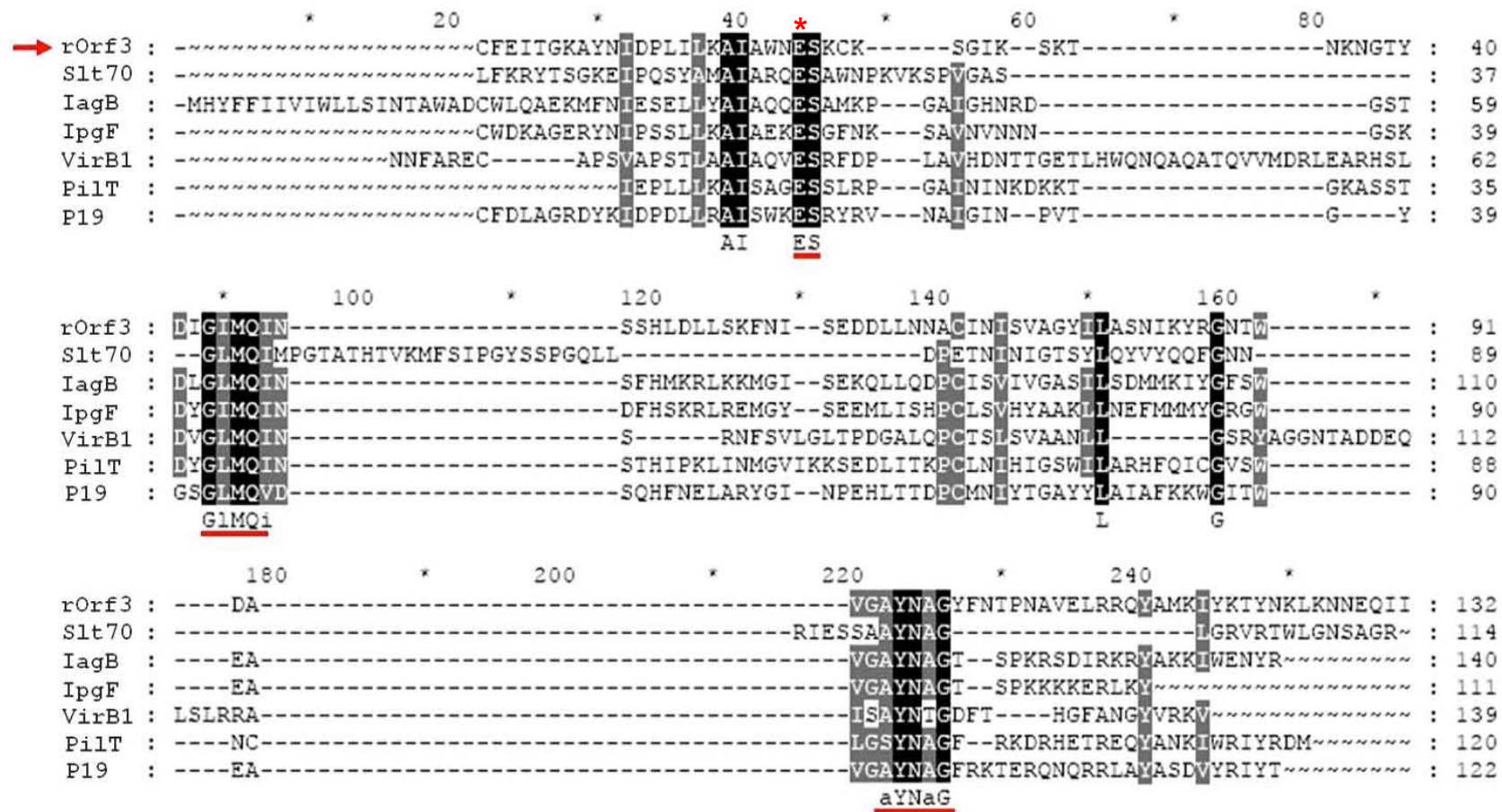


Figura 20. Alineamiento múltiple de rOrf3 del SST3 de EPEC con el dominio catalítico de algunas transglicosilasas líticas: Slt70 de *E. coli* (crecimiento y división celular), IagB del SST3 de *Salmonella enterica*, IpgF del SST3 de *Shigella flexneri*, VirB1 del SST4 de *Agrobacterium tumefaciens*, PilT del pilus tipo IV (conjugación) de *E. coli* y P19 del plásmido de conjugación R1. En color negro se muestran los residuos idénticos y en gris los residuos conservados (ClustalW); las cajas conservadas entre las TLs se indican con una línea y el glutamato catalítico con un asterisco rojo.

JUSTIFICACIÓN

Debido a la importancia del SST3 en la patogénesis de EPEC, es necesario conocer los procesos moleculares involucrados en la formación y funcionamiento de dicho sistema secretor. El estudio de rOrf3 nos permitirá entender el papel que juega dicha proteína durante la biogénesis del complejo aguja-filamento. La información adquirida sobre los mecanismos mediante los que se realizan los reacomodos localizados en la capa de peptidoglicano se podrá aplicar a otros sistemas de secreción de toxinas y efectores de virulencia. El conocimiento sobre la biosíntesis de dicha estructura macromolecular podría a largo plazo ser utilizado para diseñar estrategias adecuadas para el tratamiento de la enfermedad diarréica provocada por EPEC.

HIPÓTESIS

La proteína codificada por el gen *rorf3* es una transglicosilasa lítica especializada que desempeñará un papel importante en el ensamblaje del SST3 de EPEC durante el proceso de infección al permitir la apertura localizada de las moléculas de peptidoglicano de la pared celular.

OBJETIVOS

En nuestro grupo de investigación estamos interesados en caracterizar los mecanismos moleculares mediante los que se lleva a cabo la secreción de efectores de virulencia en EPEC.

El objetivo del presente trabajo es caracterizar a la proteína rOrf3 del SST3 de EPEC.

- Clonar el gen *rorf3* de la isla de patogenicidad LEE del cromosoma de EPEC.
- Producir y purificar la proteína recombinante codificada por dicho gen.
- Generar anticuerpos contra rOrf3.
- Determinar si la proteína recombinante presenta actividad de transglicosilasa lítica.
- Determinar el efecto de mutaciones puntuales en residuos conservados sobre la actividad de transglicosilasa lítica de rOrf3.
- Generar una mutante nula en el gen *rorf3* y analizar su fenotipo de secreción de proteínas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Microorganismos

- *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) tipo silvestre, cepa E2348/69 O127:H6 (resistente a ácido nalidíxico o estreptomicina) (Levine *et al.*1978)
- *E. coli* cepa Top 10
- *E. coli* cepa Nova Blue
- *E. coli* cepa XL1-Blue
- *E. coli* cepa BL21 (DE3) pLysS

Plásmidos

- pUC18
- pET19b
- pTrc99AFF4

Cultivo de microorganismos

EPEC se cultivó en placas de agar o medio líquido Luria Bertani (LB) enriquecido con una solución de vitaminas (timina-tiamina; 4 mg/ml y 1 µg/ml, respectivamente), con estreptomicina (25 µg/ml) o ácido nalidíxico (20 µg/ml) de acuerdo a la resistencia de la cepa. La cepa Top10 se cultivó en LB con estreptomicina (25 µg/ml), las cepas Nova Blue y XL1-Blue se cultivaron en LB con tetraciclina (25 µg/ml), y la cepa BL21 DE3 pLysS (BDP) en LB con cloranfenicol (25 µg/ml).

Obtención de ADN cromosomal de EPEC

Para obtener el ADN cromosomal de EPEC, se inocularon 2 ml de medio líquido LB, con el antibiótico apropiado, con una colonia de la cepa y el cultivo se incubó durante toda la noche con agitación a 37° C. Posteriormente se inocularon 50 ml de LB con 1/50 de volumen del cultivo inicial y se incubó de igual forma hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica (D.O.) entre 0.8 y 1.0 a 600 nm. Se centrifugó a 8,000 x g durante 10 minutos a 4° C, se lavó la pastilla con medio volumen del cultivo inicial de amortiguador Tris-EDTA (10 mM-0.1 mM pH 8.0) y se centrifugó en las mismas condiciones. La pastilla obtenida se resuspendió con 1/100 de volumen de amortiguador de sacarosa (sacarosa 25%, Tris-HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 1 mM pH 8.0), y se agregaron 225 µl de EDTA 0.25 M pH 8.0, 50 µl de lisozima (5 mg/ml) y 7.5 µl de RNAsa (10 mg/ml en acetato de sodio 0.1 M pH 5.0). Esta mezcla se incubó 15 min en hielo, se agregaron 500 µl de mezcla lítica de Tritón (Tritón X-100 0.3%, EDTA 0.187 mM pH 8.0, Tris-HCl 0.15 M pH 8.0) y se incubó otros 15 min en hielo. Se centrifugó a 35,000 x g durante 30 min, el sobrenadante se descartó con cuidado y la pastilla se resuspendió en amortiguador A (Tris 50 mM pH 7.5, EDTA 2 mM pH 7.5, SDS 5%), se agregaron 50 µl de proteasa K (5 mg/ml en amortiguador A, preincubada a 37° C durante 30 min) y se dejó incubando a 37° C por 12 h; después de la incubación se agregó nuevamente RNAsa a una concentración final de 0.5 mg/ml. Esta mezcla se incubó durante 1 hora a 37° C para después extraer con 2 volúmenes de una relación 1:1 de fenol:cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) centrifugando a 12,000 x g durante 10 min. La fase acuosa se extrajo y centrifugó en las mismas condiciones hasta que se eliminó la interfase proteica. Se realizaron dos extracciones adicionales con dos volúmenes de cloroformo-alcohol isoamílico, guardando la fase acuosa y centrifugando entre cada extracción a 12,000 x g durante 10 min. Finalmente se precipitó el ADN con 1/25 del volumen de NaCl 5M y dos volúmenes de etanol 100% y la mezcla se mantuvo a -70°C por algunas horas. Se centrifugó a 12,000 x g durante 10 min y la pastilla se lavó con un volumen de etanol 70-80% dos veces, se evaporó el etanol y el ADN se resuspendió en 400 µl de agua. La pureza de la muestra se verificó por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Clonación

Amplificación del gen *rorf3*

El gen *rorf3* se amplificó del ADN cromosomal por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), utilizando la ADN polimerasa Taq y oligonucleótidos diseñados a partir de la secuencia nucleotídica reportada del LEE de EPEC (GenBank, acceso: AF022236), con sitios de restricción (indicados en negritas) para las enzimas *NdeI* en el oligonucleótido *forward* (sitio de corte: CATATG) y *BamHI* en el oligonucleótido *reverse* (sitio de restricción: GGATCC).

- Forward: 5' GAGTAACAACGTAC**CATATG**AAAAA 3'
- Reverse: 5' CGATAGACCT**GGATCC**TTAATCGA 3'

Las condiciones para la amplificación fueron: 1 ciclo 95° C durante 2 min, seguido de 24 ciclos de 1 min a 95 ° C, 1 min a 50° C, 1 min a 72° C; y finalmente un ciclo de 10 min a 72° C.

Para observar el producto, una muestra del ADN amplificado se sometió a electroforesis en gel de agarosa 1%. Posteriormente el producto total de la PCR se separó en un gel de agarosa para realizar la extracción de la banda correspondiente y purificar el amplicón utilizando columnas con sílica gel (Kit QIAquick Gel Extraction, QIAGEN).

Para la reacción de PCR en colonia, utilizada para determinar la presencia de un inserto en un vector de clonación, las colonias transformantes se resuspendieron con un palillo estéril en 50 µl de agua, se hirvieron durante 10 min, y 2 µl del ADN liberado de esta forma se utilizaron como molde para realizar la reacción de amplificación con los mismos oligonucleótidos empleados para la amplificación inicial del gen.

Restricción enzimática

Tanto el producto de la amplificación (*rorf3*), como el vector pUC18 (Figura 21), se digirieron con las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*, con incubación a 37° C durante 5 h. Después de la digestión, el inserto a clonar (producto de amplificación) y el plásmido se separaron en un gel de agarosa para su posterior extracción y purificación (Kit QIAquick Gel Extraction).

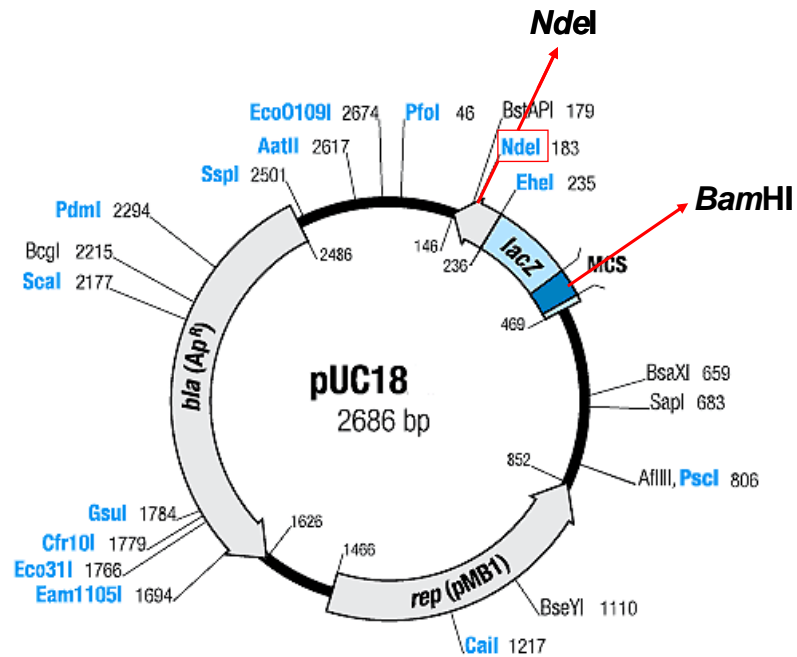


Figura 21. Mapa del vector de clonación pUC18, indicando los sitios de corte de las enzimas *NdeI* y *BamHI*. MCS: Sitio de multiclonación.

Reacción de ligación

La ligación del gen *rorf3* con el plásmido pUC18 (relación molar 3:1) se llevó a cabo con la enzima ADN ligasa T4, con incubación a 16° C durante 16 h.

Preparación de células competentes

Se prepararon células competentes a partir de cultivos de las cepas de *E. coli*: Top 10, Nova Blue, XL1-Blue y BL21 por medio del método de CaCl_2 . Se inocularon 2 ml de LB, más el antibiótico apropiado, con una colonia de las cepas mencionadas y se incubaron durante 12 h en agitación a 37° C. A partir de este precultivo se inocularon 30 ml de medio LB haciendo una dilución 1/100 del cultivo inicial y se incubó en las condiciones mencionadas hasta que el cultivo alcanzó una D.O. entre 0.3 y 0.5 a 650 nm. Se centrifugó a 8,000 x g a 4° C durante 5 min y la pastilla se resuspendió en un volumen igual de CaCl_2 0.1 M y se dejó a 4° C durante 40 min. Se centrifugó en las mismas condiciones y finalmente la pastilla obtenida se resuspendió en 1/10 de volumen de CaCl_2 0.1 M.

Transformación de células competentes

Para transformar las células competentes Top10 con la reacción de ligación, se mezcló el volumen total de la reacción de ligación (generalmente entre 20-30 μl) con 200 μl de células competentes y se incubó durante una hora a 4° C. Posteriormente, las células se sometieron a un choque de calor a 42° C durante 2 minutos para después incubarlas a 4° C durante 3 minutos. Finalmente, las células se cultivaron en agar LB_{Amp} (100 $\mu\text{g/ml}$) para seleccionar por la presencia del plásmido, y con el sustrato cromogénico 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido (X-Gal) y el inductor isopropil-tio- β -D-galactopiranosido (IPTG) para seleccionar las colonias blancas que son las que presentan inserto (α -complementación).

Obtención de ADN plasmídico

Se tomó una colonia de las células transformadas y se inocularon 4 ml de LB con ampicilina, se incubó durante toda la noche a 37° C para posteriormente obtener el ADN plasmídico del cultivo por lisis alcalina, seguida por la adsorción del ADN en una columna de sílica gel (Kit QIAprep Spin Miniprep, QIAGEN). El ADN plasmídico se analizó por su patrón de restricción para verificar la presencia del inserto. Como estrategia adicional se realizó una PCR en colonia para determinar la presencia del gen *rorf3* en el vector.

Secuenciación

Se secuenció el inserto *rorf3* clonado en el plásmido pUC18 (construcción denominada pEU*rorf3*), obtenido de la cepa NovaBlue, utilizando el oligonucleótido M13 *reverse*, para detectar si ocurrieron cambios de bases con respecto a la secuencia reportada. La secuenciación automática se realizó en la Unidad de Biología Molecular del IFC.

Subclonación

El gen *rorf3* se clonó del plásmido pEU*rorf3* en el vector de expresión pET19b, el cual contiene el promotor para la polimerasa T7 y permite la generación de una proteína recombinante que contiene una etiqueta de 10 histidinas en el extremo amino (Figura 22).

El plásmido pEU*rorf3* se digirió con las enzimas *NdeI* y *BamHI* para extraer el inserto *rorf3* y purificarlo. El plásmido pET19b se digirió con las mismas enzimas y se purificó. El vector y el inserto *rorf3* se ligaron y las colonias resultantes de la transformación se analizaron por la presencia de inserto. La construcción obtenida se denominó pEE*rorf3*. Con ésta, se transformaron células BL21, las cuales se sembraron en agar LB con ampicilina.

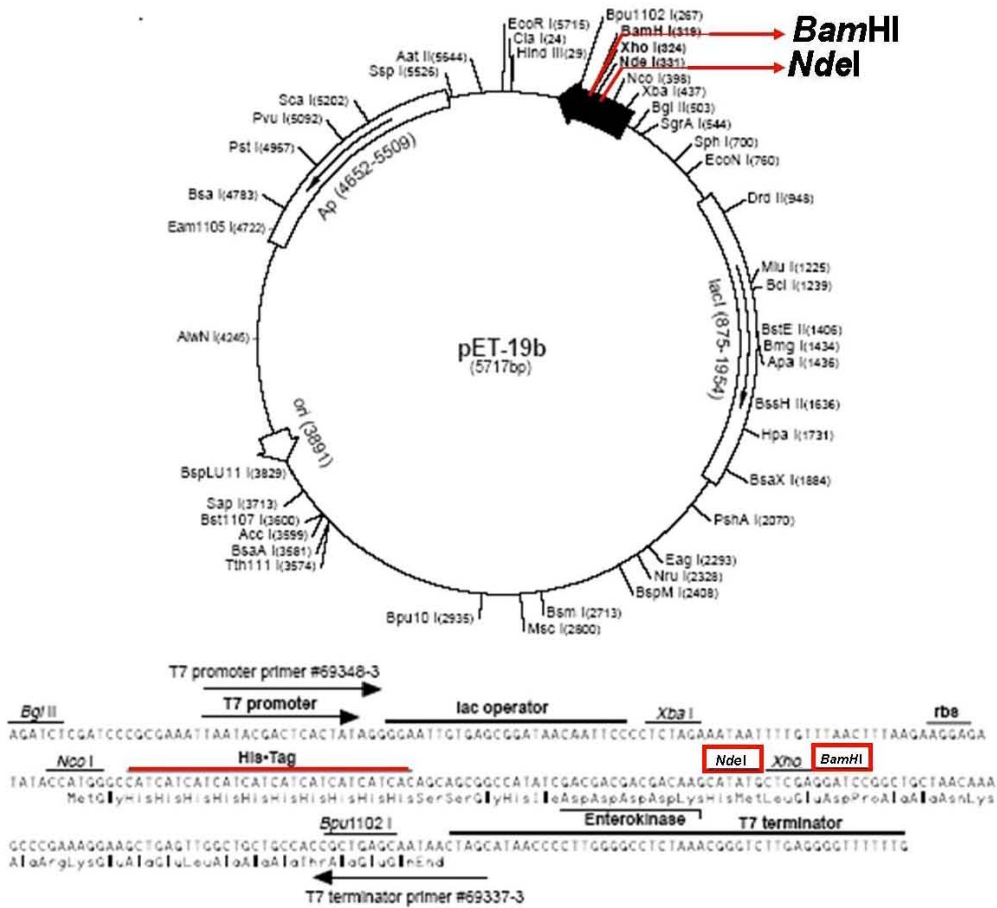


Figura 22. Mapa del vector pET19b, indicando los sitios de restricción para las enzimas *NdeI* y *BamHI* en la región de clonación y expresión, así como la secuencia para la etiqueta de histidinas.

El gen también se subclonó en el vector pTrc99AFF4 en los sitios de restricción ya mencionados. Este vector contiene al promotor *trc* (que es una fusión entre los promotores *trp* y *lac*) y permite la producción de una proteína sin etiqueta (Figura 23).

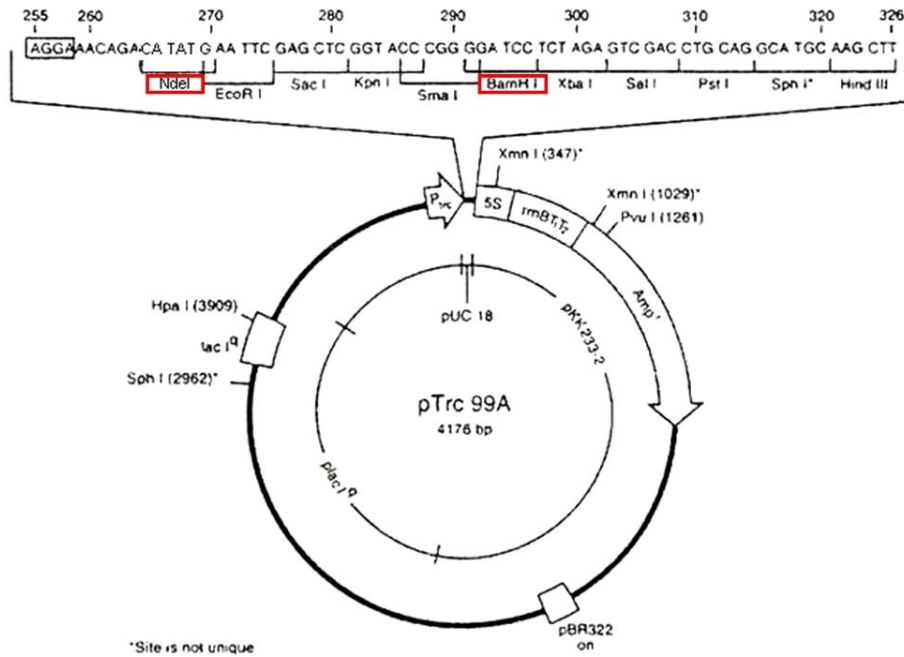


Figura 23. Mapa del vector de expresión pTrc99A, indicando los sitios para las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*.

Clonación de *rorf3* sin secuencia señal (*rorf3ss*)

Se diseñaron oligonucleótidos con sitios de restricción para las enzimas *NdeI* y *BamHI* con los cuales se amplificó por PCR el gen sin las primeras 51 bases que codifican la secuencia señal:

- Forward: 5' ACTGTAAT**CATATG**GATTGTTTTG 3'
- Reverse: 5' CGATAGACCT**GGATCC**TTAATCGA 3'

Las condiciones para la amplificación fueron: 1 ciclo de 95° C durante 2 min; 27 ciclos de 1 min a 95° C, 1 min a 45° C, 1 min a 72° C; y un ciclo de 10 min a 72° C.

El producto obtenido se analizó en un gel de agarosa, se purificó y se denominó *rorf3ss* (sin secuencia señal). Una vez purificado *rorf3ss*, se digirió con las enzimas *BamHI* y *NdeI* y se ligó con el vector pET19b. La reacción de ligación se transformó en células competentes y para determinar la presencia

del inserto en las colonias transformantes, se realizó un PCR en colonia de algunas de ellas con los mismos oligonucleótidos.

Una vez determinada la presencia del inserto *rorf3ss*, se purificó la construcción denominada *pEErrorf3ss* y se secuenció utilizando el oligonucleótido T7 *promoter* (Unidad de Biología Molecular, IFC).

Purificación de proteínas

Para purificar la proteína codificada por *rorf3* en el plásmido *pEErrorf3* o por *rorf3ss* en *pEErrorf3ss*, las células BL21 transformadas con estas construcciones se cultivaron en medio líquido LB_{Amp} (500 ml). Cuando alcanzaron la D.O. apropiada (0.6 a 0.8, a 600nm) se indujeron con IPTG 0.1 mM, en incubación a 30° C con agitación durante 3 h. Se tomaron muestras de los cultivos antes y después de la inducción durante cada hora. Éstas se mezclaron con amortiguador de corrida SDS 1X y se corrieron en geles de poliacrilamida-SDS al 15% (teñidos con azul de Coomassie) para determinar la producción de la proteína. La proteínas rOrf3ss y rOrf3, con la etiqueta de histidinas, se sometieron a inmunodetección utilizando anticuerpos anti-histidinas (4 mg/ml) (dilución 1:10000).

Las cultivos inducidos se centrifugaron a 8,000 x g durante 10 min, la pastilla con las células bacterianas se resuspendió en 30 ml de amortiguador de unión (Tris 20 mM pH 8, NaCl 0.5 M) más el inhibidor de proteasas PMSF 1 mM y se sometió a fraccionamiento por sonicación (2 ciclos de 1 min cada uno a 60 Watts, con 1 minuto de reposo entre ambos). La suspensión obtenida se centrifugó a 27,000 x g durante 20 min para separar la fracción soluble (sobrenadante) de la insoluble (pastilla). El sobrenadante se recuperó y se ultracentrifugó 145,000 x g durante 60 min; todo este proceso se llevó a cabo a 4° C. Las fracciones soluble e insoluble se mezclaron con amortiguador de corrida SDS 4X y 1X, respectivamente, y se analizaron en geles de poliacrilamida-SDS para determinar la presencia de la proteína recombinante.

Las proteínas se purificaron a partir de las fracciones solubles de los cultivos por cromatografía de afinidad en una columna de agarosa acoplada a níquel (3 ml, Ni-NTA agarosa, QIAGEN). La columna se equilibró con amortiguador de unión, se cargó con la fracción soluble de los cultivos y se lavó exhaustivamente con soluciones de imidazol 60 mM y 80 mM (diluído en amortiguador de unión). La proteína se eluyó con concentraciones crecientes de imidazol (100, 200, 300 y 600 mM; 3 ml de cada uno), y finalmente se corrieron muestras de los lavados y de cada elución en geles de poliacrilamida-SDS (previamente mezcladas con amortiguador de corrida SDS 4X).

Una vez determinada la concentración de imidazol en la que se eluyó a His-rOrf3ss, la proteína purificada se dializó con un amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 5.2, o bien con amortiguador TNED (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M, EDTA 0.1 mM pH 7.5, y DTT 0.2 mM) ambos con glicerol al 20%, a 4°C durante 12 h, con varios cambios de amortiguador y se determinó la concentración de proteína presente en la muestra (*Bradford Protein Assay*, BioRad).

Generación de anticuerpos

Para obtener anticuerpos dirigidos contra rOrf3, se inocularon dos conejos hembra (cepa Nueva Zelanda) con muestras de la proteína His-rOrf3ss, en TNED o en fosfato de potasio 50 mM pH 5.2 (con glicerol 20%), vía intradérmica. Para la primera inoculación se inyectaron 100 ó 200 µg de la proteína por conejo, diluidos 1:1 con adyuvante de Freund completo. Aproximadamente 3 semanas después se aplicó un refuerzo de 50 y 100 µg de proteína, respectivamente, diluidos 1:1 en adyuvante de Freund incompleto. Diez días después del primer refuerzo se obtuvieron muestras de sangre de las cuales se obtuvo suero, con el cual se realizaron inmunodetecciones para determinar la producción de anticuerpos anti-rOrf3ss; 3 semanas después del primer refuerzo se aplicó otra inyección (100 y 50 µg en adyuvante incompleto), 10 días después se obtuvo suero y una vez comprobada la presencia de anticuerpos, los conejos fueron exanguinados por punción cardiaca. Se verificó

el suero obtenido para los anticuerpos policlonales anti-rOrf3ss por medio de inmunodetección, utilizando también el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa de rábano (GAR) (1:20000).

Determinación de actividad de transglicosilasa lítica por zimogramas

En estos ensayos es posible observar la actividad de degradación de peptidoglicano al incorporar en geles de poliacrilamida al 15%-SDS 0.02%, la bacteria liofilizada *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) a una concentración final de 0.5% (el sustrato se agrega antes de la polimerización de los geles). En los geles con dicho sustrato se cargaron muestras tanto de rOrf3ss como de los controles negativos (albúmina sérica de bovino [BSA], His-EscN, y His-EspB), las cuales fueron separadas por electroforesis. Los geles se incubaron durante 48 horas en amortiguador de renaturalización (fosfato de potasio 25 mM pH 5.2, Tritón X-100 0.1%) con agitación a 4°C (con cambios constantes de amortiguador) y se tiñeron con azul de metileno 0.1%-KOH 0.01%, lo que permitió observar las zonas claras que indicaron la ausencia de sustrato y por lo tanto la degradación de éste (Buist *et al.*, 1995; Nambu *et al.*, 1999; Zahrl *et al.*, 2005).

Efecto sobre el crecimiento de cultivos

Para determinar el efecto de rOrf3 sobre el crecimiento de cultivos bacterianos se sobre-expresaron diferentes versiones de *rorf3*: *rorf3*, *rorf3ss* (en pTrc99AFF4), His-*rorf3* y His-*rorf3ss* (en pET19b) en cultivos de *E. coli*, los cuales se indujeron con IPTG 1mM y se leyó la D.O. de éstos a 600 nm durante cada hora de incubación, a 37°C (Kholer *et al.*, 2005; Paradis-Bleau *et al.*, 2007; Kohler *et al.*, 2007)

Generación de mutantes puntuales por mutagénesis dirigida

El procedimiento para generar las mutantes consistió en amplificar el gen *rorf3* o *rorf3ss* incorporando la mutación con oligonucleótidos mutagénicos, los cuales tienen una longitud de 32 bases (con la mutación deseada en la mitad de la secuencia) (QuikChange, Stratagene) (Figura 24).

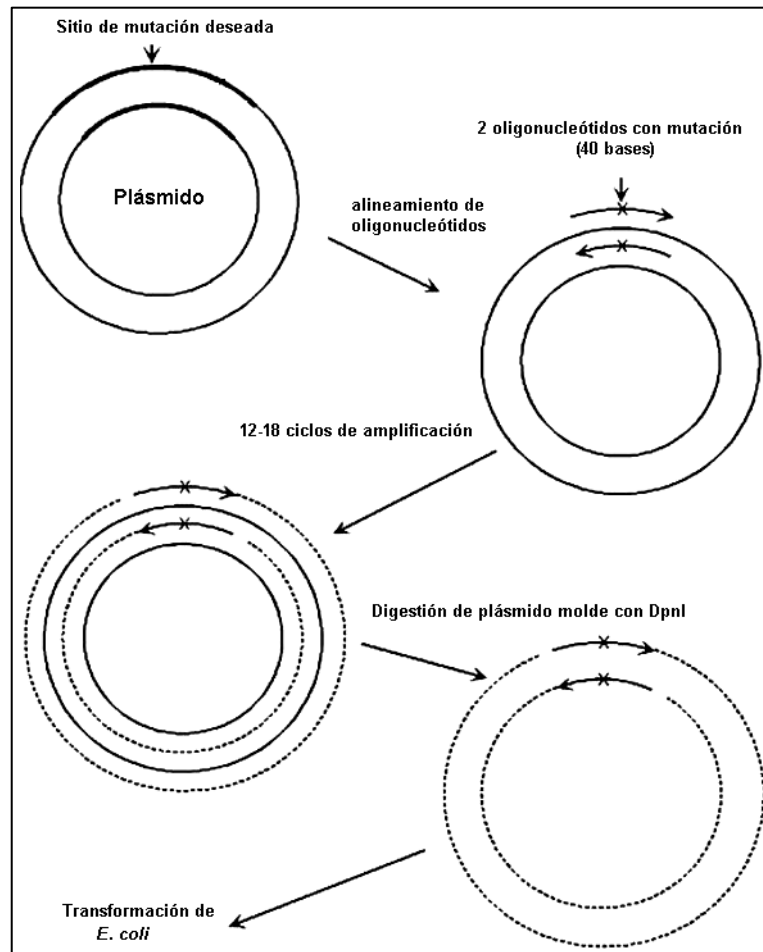


Figura 24. Estrategia general para generar la mutante puntual por mutagénesis dirigida.

Las mutaciones puntuales se originaron por PCR utilizando como molde las construcciones pEEorf3 y pEEorf3ss, así como la ADN polimerasa *Pfu* turbo (Stratagene, 2 min de amplificación por kb de molde). Las condiciones para la amplificación fueron: 1 ciclo a 95° C, 3 min; 12 ciclos de 1 min a 95° C, 1 min a 52° C y 10 min a 72° C; y finalmente 1 ciclo de 15 min a 72° C. El producto obtenido se digirió con la enzima *DpnI* durante 90 min a 37° C, para eliminar el ADN molde (el cual está metilado), lo que permite la selección del ADN con la

mutación. El producto de la digestión se transformó en células de la cepa XL1-Blue. De algunas de las colonias transformantes se obtuvieron los plásmidos y se secuenciaron para determinar la presencia de la mutación puntual. Los oligonucleótidos utilizados para este procedimiento se enlistan a continuación:

Tabla 1. Lista de los oligonucleótidos empleados para realizar la mutagénesis dirigida de los residuos conservados de rOrf3.

Mutación	Oligonucleótidos (5'- 3')	
	Forward	Reverse
E42Q	CAATTGCATGGAAT CAAT CAAAATGCAAAAGC	GCTTTTGCATTTTGAT TTGAT TCCATGCAATTG
E42A	CAATTGCATGGAAT GCA TCAAATGCAAAAGC	GCTTTTGCATTTTGAT TGCAT TCCATGCAATTG
Q65A	TATAGGTATAAT GGCA ATTAATTCATCTCATT	AATGAGATGAATTAAT TGCC ATTATACCTATA
Y116A	GATGCAGTTGGTGC GGCT AAATGCAGGTTAC	GTAACCTGCATT AGCC GCACCAACTGCATC

El codón que codifica el glutamato conservado en la posición 42 en la secuencia original de rOrf3 (GAA) se modificó dando lugar al codón para glutamina (CAA), o bien dando lugar al codón para alanina (GCA), para la mutante en la glutamina posición 65, el codón que codifica dicho residuo (CAA) se modificó para originar un codón de alanina (GCA) y para la mutante en tirosina posición 116 el codón (TAT) se cambió por un codón de alanina (GCT).

Mutante nula

Para la generación de la mutante nula se utilizó el sistema Red del fago λ , el cual permite reemplazar el gen de interés con un casete de resistencia a antibióticos (Datsenko y Wanner, 2000) (Figura 25).

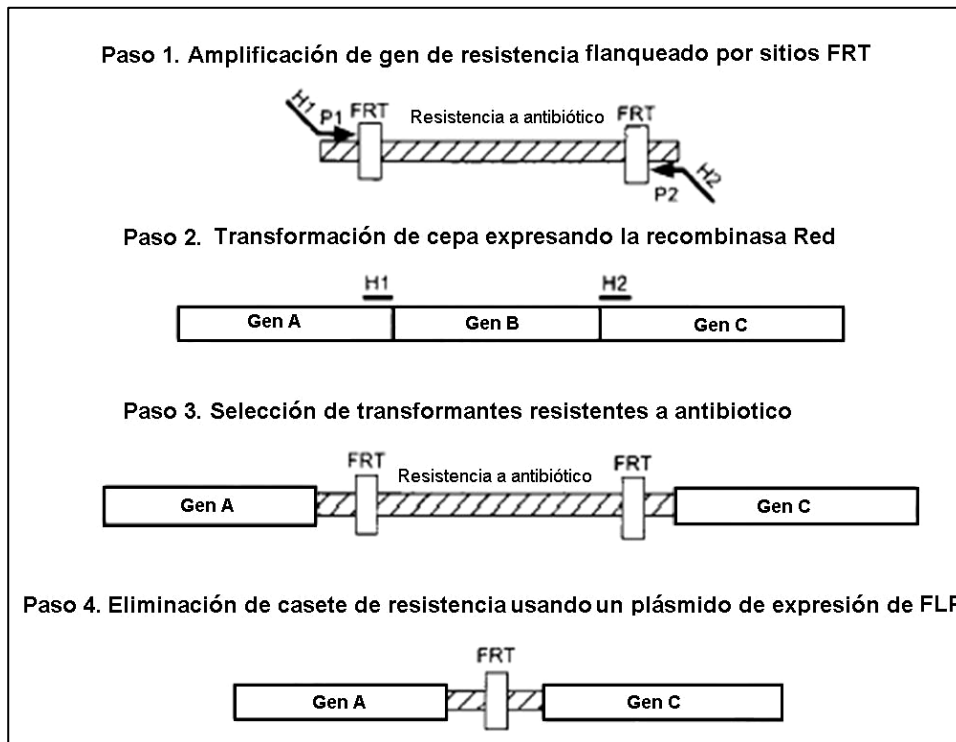


Figura 25. Estrategia para generar mutantes nulas con el sistema Red de λ . H1 y H2 se refieren a las regiones del oligonucleótido homólogas al gen, P1 y P2 son las regiones homólogas a pKD3.

El casete de resistencia a cloranfenicol, flanqueado por los sitios de recombinación FRT (blanco de reconocimiento de la recombinasa FLP), se amplificó por PCR utilizando como molde al plásmido pKD3 y oligonucleótidos de 70 bases, de las cuales 50 son homólogas a las regiones que flanquean al gen *rorf3* y 20 al casete de resistencia.

Los oligonucleótidos utilizados para esta reacción son los siguientes:

- Forward:

5' TTGAACCTGTGGCACAATTGATTTCGTATTGCGATAGACCTTGATTATTAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC 3'

- Reverse:

5' TGGTTAACATATGTAATTTCTGATTAATAATATTGAGTAACAACGTAAAA CATATGAATATCCTCCTTAG 3'

Las condiciones para la reacción fueron: 1 ciclo a 94 °C por 2 min; 25 ciclos de 1 min a 94° C, 1 min a 66°C y 1 min 30 seg a 72° C; y un ciclo a 72° C 10 min.

El producto obtenido se purificó por medio de extracción de gel de agarosa y se digirió con la enzima *DpnI*. Después de la digestión, el producto se limpió por extracción de gel o por extracción con fenol-cloroformo, se precipitó con etanol y acetato de sodio 3M y se resuspendió con un volumen mínimo de agua (12 μ l).

Se electroporaron 3-5 μ l del producto purificado en 50 μ l de células electrocompetentes de una cepa silvestre de EPEC resistente a ácido nalidíxico, previamente transformada con el plásmido pKD46 (inducible con L-arabinosa y que contiene el sistema Red: genes γ , β y *exo*) y que permite la incorporación del casete de resistencia al cromosoma por recombinación (Figura 26).

Después de la electroporación, las células se recuperaron incubándolas en agitación con 1 ml de medio SOC a 30° C durante 3 h. Parte de las células electroporadas (200 μ l) se platearon en medio sólido LB con cloranfenicol, incubándose a 37°C para eliminar el plásmido pKD46, el cual es termosensible. El resto se incubó 12 h a temperatura ambiente y se plateó en LB con cloranfenicol, incubándose a 37° C. Las colonias obtenidas se evaluaron por su resistencia a cloranfenicol y sensibilidad a ampicilina.

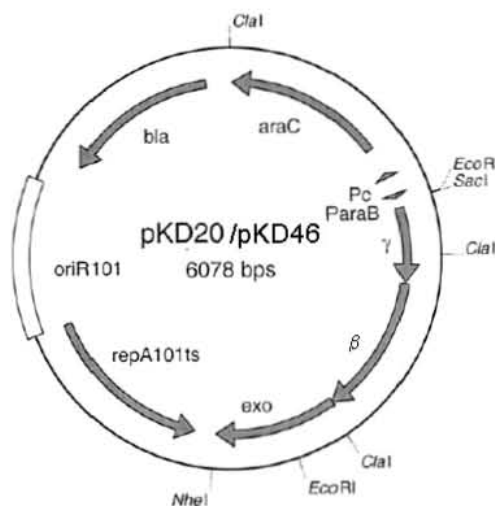


Figura 26. Mapa del plásmido de expresión de la recombinasa Red (pKD20 o pKD46).

Para verificar la inserción del casete *cat* se realizaron amplificaciones a partir de ADN cromosomal de la cepa silvestre y la mutante, con oligonucleótidos externos al casete de resistencia a cloranfenicol y complementarios a regiones adyacentes a *rorf3* (*escU* y *grlR*):

- Forward, *escUF*: TAAACTGGCTGAACTCTATG
- Reverse, *grlRR*: TATCCATAAGCAATATCAAG

También se utilizaron oligonucleótidos complementarios a regiones internas del casete:

- Forward, *catF*: GATCTTCCGTCACAGGTAGG
- Reverse, *catR*: TTATACGCAAGGCGACAAGG

Los productos de PCR se secuenciaron para verificar la inserción del casete de resistencia a cloranfenicol en el lugar esperado en el cromosoma, así como para determinar si se presentaron mutaciones en las regiones aledañas al casete.

Ensayos de secreción de proteínas de EPEC

Tanto la cepa silvestre de EPEC como la cepa mutante $\Delta rorf3::cat$ se cultivaron inicialmente en 2 ml de medio líquido LB con los antibióticos apropiados, para después cultivarlas en medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle Medium*, GIBCO) (1:100) a 37° C sin agitación (condiciones reportadas como óptimas para la expresión del SST3), hasta que alcanzaron una D.O. de 0.7 a 1.0 a 600 nm. Los cultivos se centrifugaron a 21,000 x g durante 5 min a 4° C para separar el sobrenadante de la pastilla celular. Ésta última se resuspendió en amortiguador de corrida SDS 2X de acuerdo a la D.O. de los cultivos. Las proteínas secretadas al sobrenadante se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 100% (145 μ l por cada 1.5 ml de sobrenadante) a 4° C durante 12 h. Las proteínas precipitadas se recuperaron por centrifugación a 21,000 x g

durante 30 min a 4° C, el sobrenadante se eliminó por succión con vacío y la pastilla obtenida se resuspendió en amortiguador de corrida SDS 2X de acuerdo a la D.O de los cultivos, además se agregó 1 µl de Tris saturado para neutralizar los restos de TCA. Las proteínas secretadas se observaron en geles de poliacrilamida-SDS al 15% y se sometieron a inmunodetección para determinar la presencia o ausencia de las proteínas correspondientes al SST3.

RESULTADOS

Purificación de ADN cromosomal de EPEC

Se purificó el ADN cromosomal de EPEC silvestre, tanto de la cepa resistente a ácido nalidíxico como de la resistente a estreptomicina. Una muestra se sometió a electroforesis en un gel de agarosa para confirmar la pureza del ADN obtenido (Figura 27).

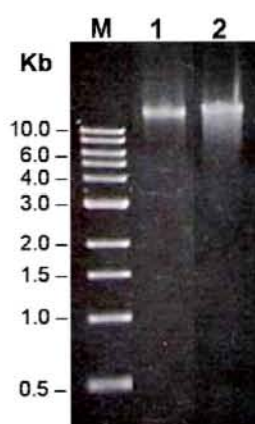


Figura 27. ADN cromosomal de EPEC silvestre. M: marcador, Kb: kilobases, carril 1: ADN de cepa NaI^R y 2: Str^R.

Amplificación de *rorf3*

Se amplificó el gen *rorf3* de EPEC por medio de PCR a partir de ADN de la cepa resistente a ácido nalidíxico. El tamaño aparente del producto concuerda con el número de bases correspondientes al reportado para este gen (458 pb) (Figura 28).

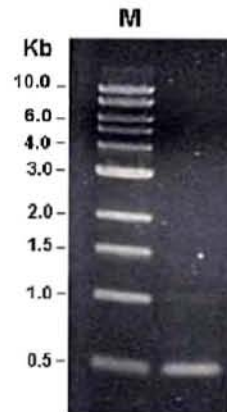


Figura 28. Amplificación por PCR del gen *rorf3* de EPEC, producto de 458 pb. M: marcador 1Kb.

Clonación de *rorf3* en pUC18

Para clonar el gen *rorf3* en el vector pUC18, ambos fueron digeridos con las enzimas *NdeI* y *BamHI* para la formación de los extremos cohesivos correspondientes, que permitieran la ligación del inserto y del vector. Una muestra de cada una de estas digestiones se purificó y se separó en un gel de agarosa. El tamaño del vector linealizado corresponde con el esperado (2,686 pb) (Figura 29).

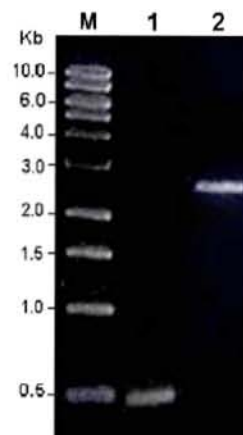


Figura 29. Digestiones con *NdeI* y *BamHI*. M: marcador. Carril 1: inserto *rorf3* (458pb), 2: vector pUC18 (2686pb).

La reacción de ligación se transformó y se obtuvieron 432 colonias transformantes. Se analizaron los plásmidos de cuatro de ellas por la presencia de inserto y de una se obtuvo la construcción que se observa en la figura 30, denominada pEU*rorf3*.

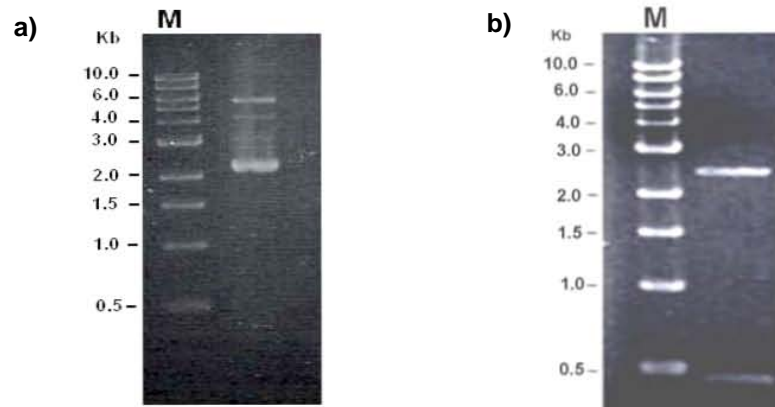


Figura 30. Clonación de *rorf3* en pUC18 (pEU*rorf3*). M: marcador, a) ADN plasmídico de la construcción pEU*rorf3*; b) Análisis de presencia de inserto por restricción (con las enzimas *Bam*HI y *Nde*I) mostrando a pUC18 y *rorf3* liberado de la construcción.

La secuenciación nucleotídica del inserto en pEU*rorf3*, mostró que no se presentaron mutaciones con respecto a la secuencia reportada para *rorf3* (programa DNAMAN) (Figura 31).

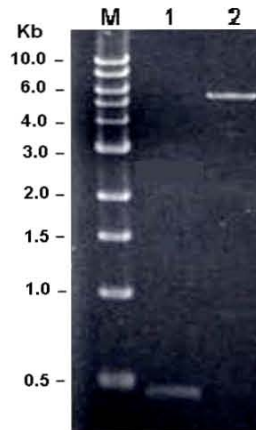


Figura 32. Inserto purificado (a partir del plásmido pE*Urorf3*) y pET19b digerido. M: marcador, carril 1: *rorf3* (458 pb), carril 2: pET19b (5717 pb).

La reacción de ligación entre *rorf3* y pET19b se transformó y se obtuvieron 448 colonias transformantes, de las cuales se analizaron 20 a través de PCR en colonia, de las que sólo dos presentaron inserto (Figura 33).

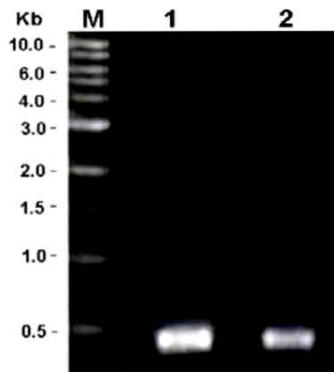


Figura 33. Reacción de PCR en colonia mostrando el inserto *rorf3* (458 pb) amplificado a partir de dos de las colonias probadas.

En la figura 34 se muestra el DNA plasmídico de la construcción generada (que se denominó pEE*rorf3*) y su análisis de restricción.

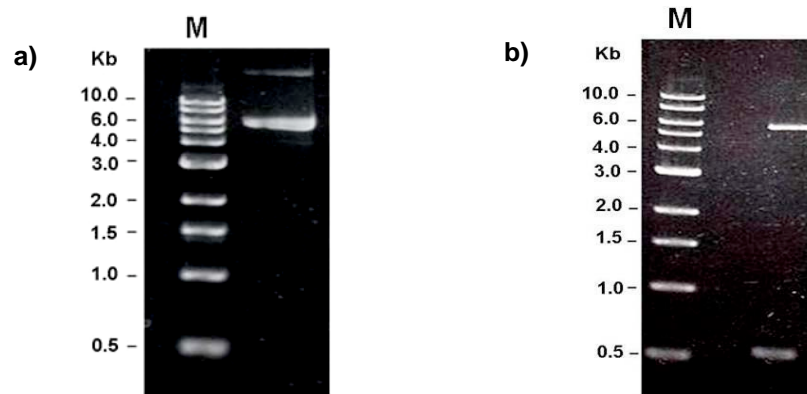


Figura 34. Subclonación de *rorf3* en pET19b. M: marcador, a) ADN plasmídico de la construcción pEE*rorf3*; b) Análisis de presencia de inserto indicando a pET19b y *rorf3* liberado de la construcción.

Expresión de *his-rorf3* y purificación de His-rOrf3

Con la construcción pEE*rorf3* se transformaron células competentes de la cepa BL21 y se indujo el gen *rorf3* con 0.1 mM de IPTG a 30° C. Se tomaron muestras del cultivo sin inducir e inducido a diferentes tiempos. Los lisados celulares se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida SDS al 15%. A partir de la primera hora de inducción se detectó la producción de una proteína con una masa molecular aparente (16 kDa) menor a la predicha para His-rOrf3 (19.6 kDa). Sin embargo, la producción de la proteína His-rOrf3 se corroboró por inmunodetección utilizando anticuerpos anti-His (1:20,000) (Figura 35).

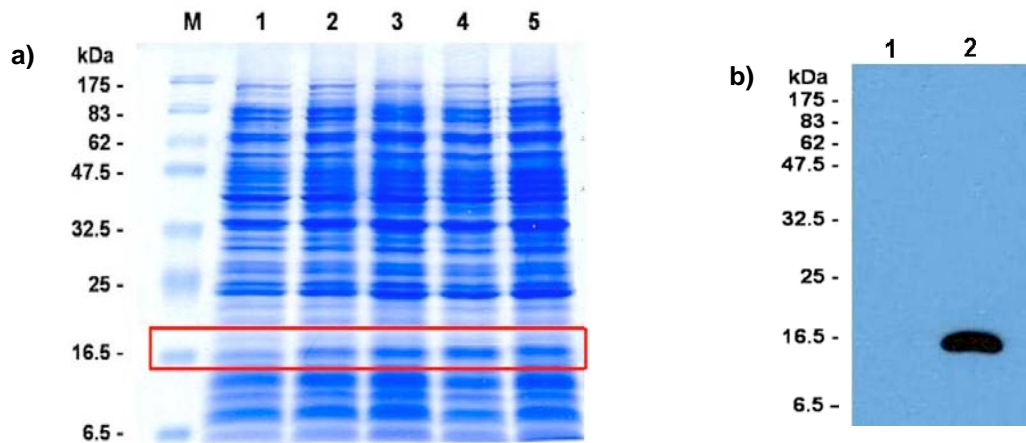


Figura 35. Inducción de cultivos con la construcción pE*Erorf3*. a) Gel de poliacrilamida con lisados completos de cultivo, antes y después de inducir. M: marcador, kDa: kiloDaltones, carril 1: muestra sin inducir, 2: muestra de 1h de inducción, 3: 2 h, 4: 3 h, 5: 4 h; b) Inmunodetección de His-rOrf3 con anticuerpos anti-histidinas. Carril 1: muestra sin inducir, 2: muestra de inducción (4 h).

Posteriormente, los cultivos se sonicaron para analizar las fracciones soluble e insoluble, y se observó a la proteína en la fase insoluble en mayor proporción que en la fase soluble (Figura 36).

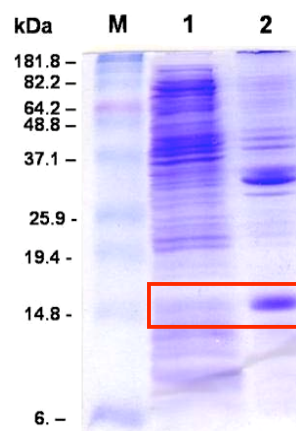


Figura 36. Fracciones celulares de cultivos con rOrf3 (gel de poliacrilamida). M: marcador, carril 1: fracción soluble, carril 2: fracción insoluble.

Se intentó purificar a His-rOrf3 a partir de la fracción soluble, pero no se logró obtener proteína (dato no mostrado). Debido a esto, se eliminó la secuencia señal hidrofóbica que presenta la proteína (ver discusión).

Amplificación de *rorf3ss*

La secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia señal se predijo utilizando el programa Signal P, que indicó que ésta podría incluir a los primeros 17 residuos del extremo amino (Figura 37).

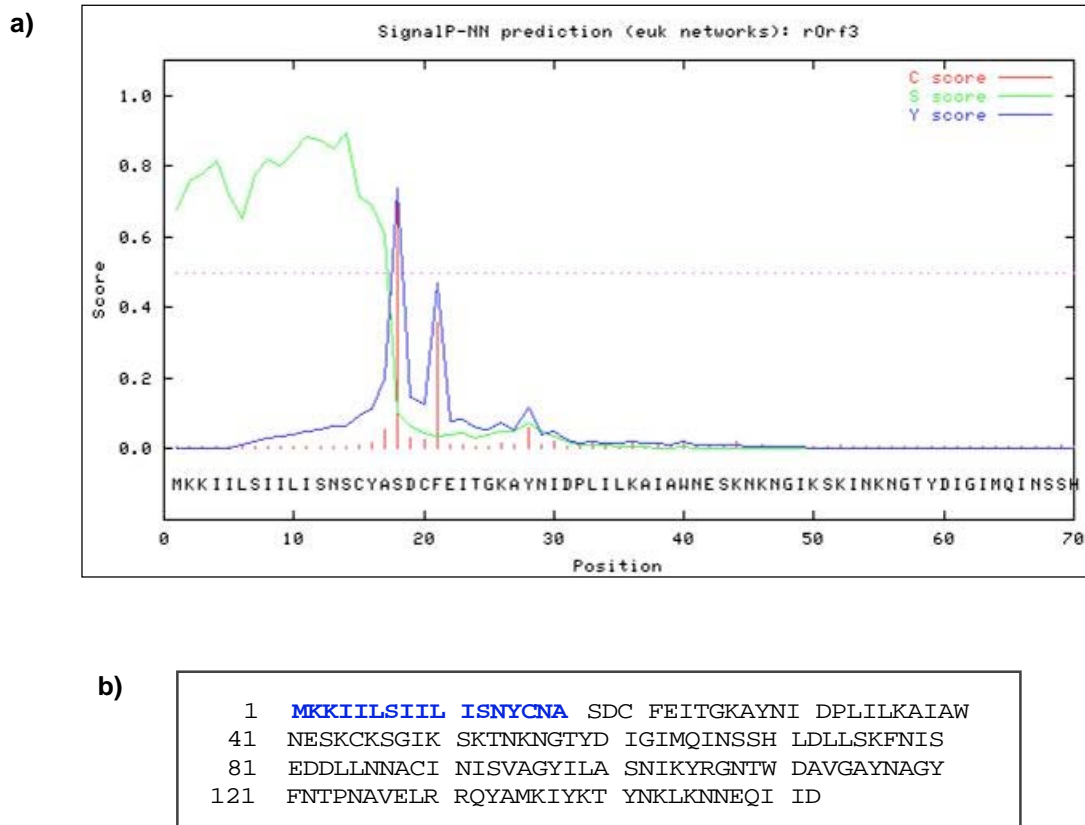


Figura 37. Predicción de secuencia señal de rOrf3. a) Gráfica mostrando el resultado del programa Signal P, indicando la posible presencia de un péptido líder en el extremo amino de la proteína, así como el sitio de corte más probable para la peptidasa señal (entre los residuos 17 y 18); b) Residuos que forman la secuencia señal de rOrf3 (1-17), marcados en azul.

Se amplificó a *rorf3ss* por PCR a partir del ADN cromosomal de EPEC y el producto obtenido se analizó en un gel de agarosa, observándose un producto del tamaño del gen sin las bases para la secuencia señal (408 pb). Como control para la reacción se amplificó a *rorf3* (Figura 38).

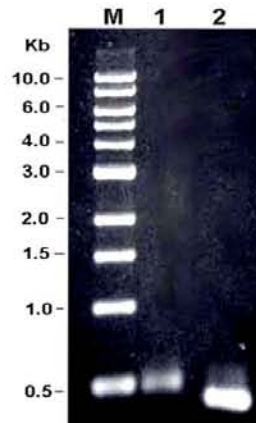


Figura 38. Amplificación de *rorf3ss*. M: marcador, carril 1: control *rorf3*, carril 2: *rorf3ss*.

El producto de PCR se purificó y se digirió con las enzimas *Bam*HI y *Nde*I para su posterior clonación en pET19b (linearizado con las mismas enzimas) (Figura 39).

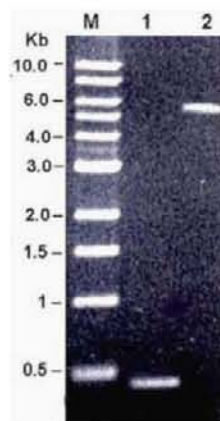


Figura 39. Digestión con *Bam*HI y *Nde*I. M: marcador, carril 1: inserto *rorf3ss*, carril 2: pET19b.

El gen *rorf3ss* se ligó con el vector pET19b. La reacción de ligación se transformó y se analizaron algunas de las colonias transformantes por PCR en colonia, resultando positivas 11 de 18 colonias. Como control se utilizó una colonia con la construcción pEE*rorf3*. En la figura 40 se observan los productos de estas reacciones. La construcción obtenida se denominó pEE*rorf3ss* (Figura 41).

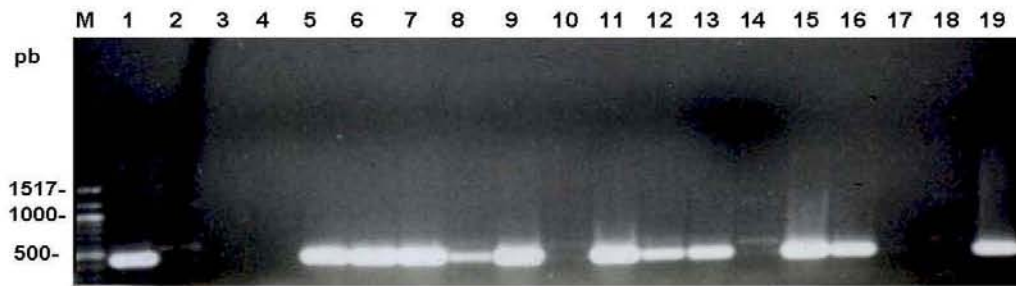


Figura 40. PCR en colonia para detectar el inserto *rorf3ss*. M: marcador, carril 1: amplificación de *rorf3*, carriles 2-19 reacción para *rorf3ss* en la construcción pEE*rorf3ss*.

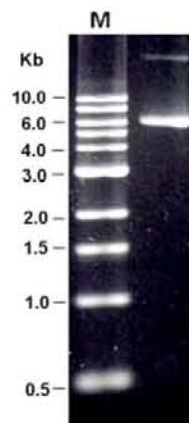


Figura 41. Construcción pEE*rorf3ss* (ADN plasmídico). M: marcador.

La construcción se secuenció y se comparó con la secuencia original, determinándose que no se presentaron cambios (Figura 42).

```

Upper line: rorf3ss, from 1 to 408
Lower line: rorf3ss (pEErorf3ss), from 130 to 537

rorf3ss:rorf3ss identity= 100%

1   ATGGATTGTTTTGAAATTACAGGAAAAGCATATAACATAGATCCACTAATATTTAAAAGCA
   |||
130 ATGGATTGTTTTGAAATTACAGGAAAAGCATATAACATAGATCCACTAATATTTAAAAGCA

61  ATTGCATGGAATGAATCAAAATGCAAAAGCGGAATAAAAAGCAAAACAACAAAAACG  GA
   |||
190 ATTGCATGGAATGAATCAAAATGCAAAAGCGGAATAAAAAGCAAAACAACAAAAACG  GA

121 ACGTATGATATAGGTATAATGCAAATTAATTCATCTCATTAGATTTATTAAGCAAAT  TT
   |||
250 ACGTATGATATAGGTATAATGCAAATTAATTCATCTCATTAGATTTATTAAGCAAAT  TT

181 AATATATCTGAAGATGATTTATTGAATAATGCCTGTATAAACATATCTGTTGCTGGTT  AT
   |||
310 AATATATCTGAAGATGATTTATTGAATAATGCCTGTATAAACATATCTGTTGCTGGTT  AT

241 ATCTTAGCCTCTAACATAAAAACAGAGGGAATACATGGGATGCAGTTGGTGCGTATA  AT
   |||
370 ATCTTAGCCTCTAACATAAAAACAGAGGGAATACATGGGATGCAGTTGGTGCGTATA  AT

301 GCAGGTTACTTTAATACACCAAATGCAGTAGAACTCAGAAGGCAATACGCAATGAAAA  TA
   |||
430 GCAGGTTACTTTAATACACCAAATGCAGTAGAACTCAGAAGGCAATACGCAATGAAAA  TA

361 TATAAAACATATAATAAATTAAGAATAATGAGCAAATTATCGAT  TAA
   |||
490 TATAAAACATATAATAAATTAAGAATAATGAGCAAATTATCGAT  TAA

```

Figura 42. Secuencia del inserto *rorf3ss* clonado en pET19b (pEE*rorf3ss*) (línea inferior) y alineamiento con la secuencia original *rorf3ss* (línea superior).

Expresión de *his-rorf3ss* y purificación de His-rOrf3ss

Las células BL21 se transformaron con la construcción pEE*rorf3ss* y los cultivos se indujeron como se describió anteriormente. Se observó la producción de una proteína con una masa molecular similar a la predicha para His-rOrf3ss sin secuencia señal (17.8 kDa) (Figura 43). La producción de la proteína de interés se corroboró por inmunodetección.

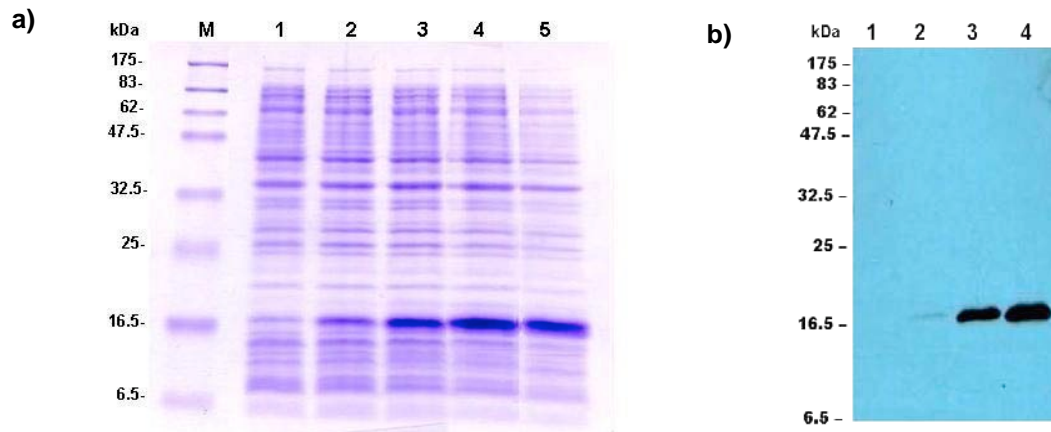


Figura 43. Inducción de cultivos con la construcción pE*Erorf3ss* a 30° C, IPTG 0.1 mM. a) Gel de poliacrilamida con lisados completos de cultivo, antes y después de inducir durante cada hora; M: marcador, carril 1: muestra sin inducir, 2: muestra a partir de 1h de inducción, 3: 2h, 4: 3h, 5: 4h; b) Inmunodetección de His-rOrf3ss, utilizando anticuerpos anti-Histidinas; carril 1: muestra sin inducir, 2: muestra a partir de 1h de inducción, 3: 2h, 4: 3h.

Los cultivos se sonicaron para obtener las fracciones celulares. En este caso se observó que His-rOrf3ss está presente en ambas fracciones (Figura 44).

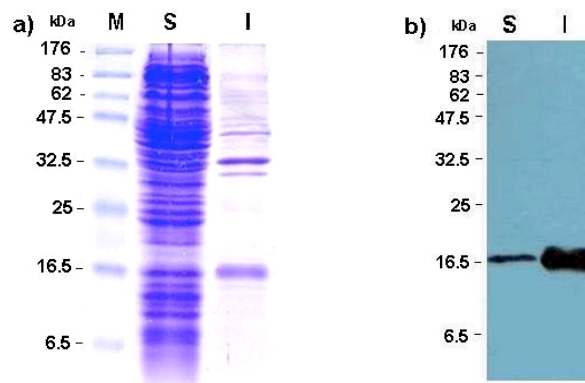


Figura 44. Fracciones celulares de cultivos con His-rOrf3ss. a) Gel de poliacrilamida con muestras de las fracciones obtenidas después de la sonicación; b) Inmunodetección de His-rOrf3ss con anticuerpos anti-His. M: marcador, S: fracción soluble, I: fracción insoluble.

His-rOrf3ss se purificó a partir de la fracción soluble por medio de cromatografía de afinidad, observándose una banda correspondiente al tamaño de la proteína recombinante en la elución con 300 mM de imidazol (Figura 45).

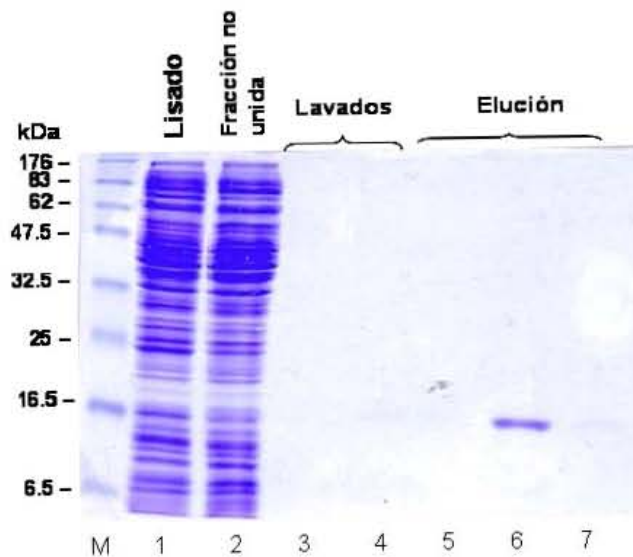


Figura 45. Purificación de His-rOrf3ss por cromatografía de afinidad. Gel de poliacrilamida con muestras de los lavados y elución de la proteína. M: marcador, carril 1 fracción celular soluble, 2: fracción no unida a columna, 3: lavado con imidazol 60 mM, 4: lavado con imidazol 80 mM, 5: elución con imidazol 200 mM, 6: imidazol 300 mM, 7: imidazol 600 mM.

La proteína His-rOrf3ss purificada se dializó en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM pH 5.2, glicerol 20%. El glicerol es necesario para mantener soluble a la proteína ya que en su ausencia ésta forma agregados. Después de la diálisis se cuantificó la concentración de proteína, la cual fue de 200 µg/ml, lo que representa un rendimiento aproximado de 1 mg/l. La proteína se concentró con polietilenglicol (P.M. 8000 Da), lográndose obtener una concentración de 400 µg/ml.

Generación de anticuerpos

Para la producción de anticuerpos policlonales anti His-rOrf3ss se inocularon dos conejos con la proteína recombinante purificada. Por medio de inmunodetección se determinó la presencia de los anticuerpos en el suero obtenido, los que reconocen a la proteína tanto en un lisado celular de un cultivo inducido, como en una muestra de la proteína purificada (Figura 46). Se utilizó como control negativo una muestra de suero preinmune de cada uno de los conejos. Los anticuerpos reconocen a la proteína de interés y a otro componente con una masa aproximada de 32 kDa, que pudiera ser un dímero,

pero esto podría deberse a inespecificidad por contaminantes contenidos en el suero (ver discusión).

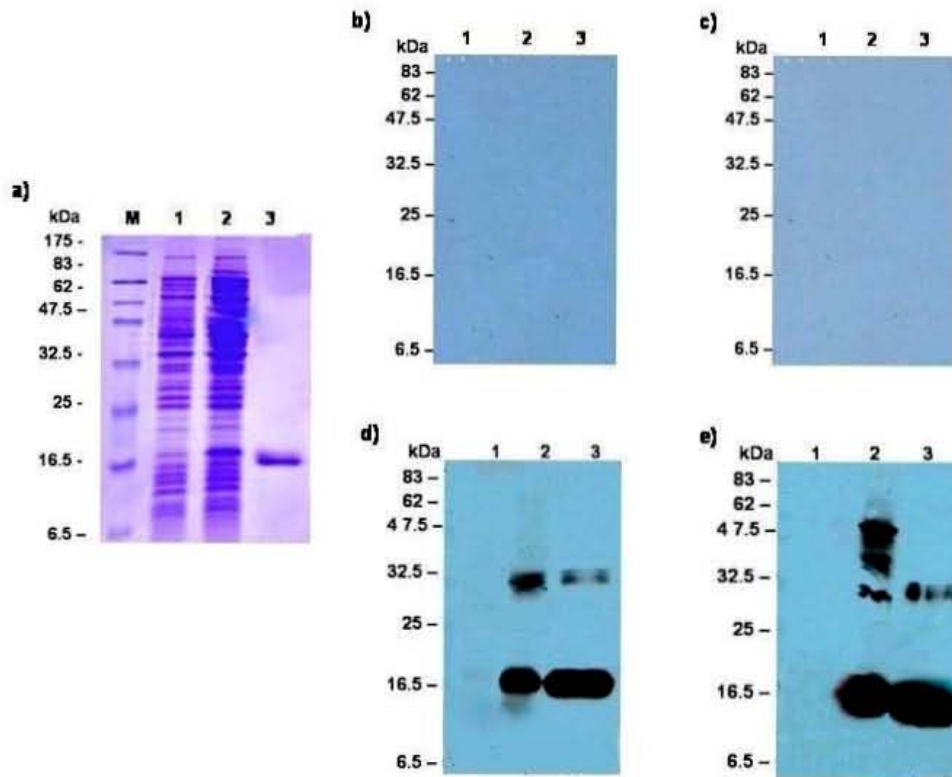


Figura 46. Anticuerpos policlonales anti His-rOrf3ss. a) Gel de poliacrilamida 15%; b) Inmunodetección con suero preinmune conejo # 1; c) Suero preinmune conejo #2 (1:6000); d) Suero anti His-rOrf3ss conejo # 1 (inoculado con menor cantidad de proteína), suero anti His-rOrf3ss conejo # 2 (1:15000). M: marcador, carril 1: lisado celular cultivo sin inducir, 2: lisado de un cultivo inducido, 3: His-rOrf3ss purificada.

Actividad de transglucosilasa lítica (TL)

La actividad lítica de His-rOrf3ss se determinó por medio de zimogramas. Como controles negativos se utilizó albúmina (BSA), así como las proteínas del SST3 His-EscN y His-EspB. El gel se renaturalizó con el amortiguador de fosfato de potasio ya mencionado y fue posible observar con claridad una banda translúcida correspondiente al tamaño de His-rOrf3ss, que demuestra que esta proteína tiene actividad de muramidasa (Figura 47).

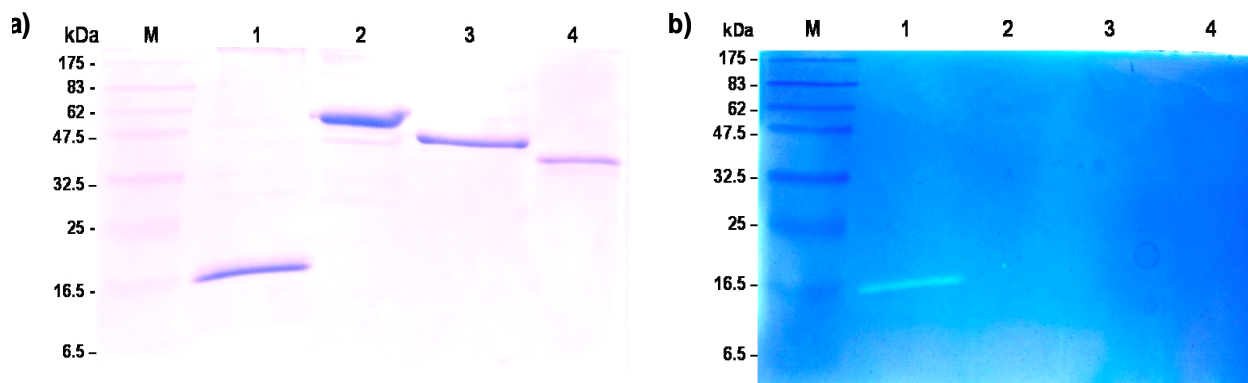


Figura 47. Actividad de transglicosilasa lítica de His-rOrf3ss en geles de sustrato. a) Gel de poliacrilamida 15% (sin sustrato) teñido con azul de Coomassie; b) Gel de sustrato teñido con azul de metileno, incubación a pH 5.2. M: marcador. Carril 1: His-rOrf3ss (10 μ g), 2: BSA (10 μ g), 3: His-EscN (5 μ g), 4: His-EspB (5 μ g).

Mutantes puntuales en residuos conservados

Para crear las mutaciones puntuales en los residuos conservados entre las TLs y la proteína rOrf3 (tanto en el residuo glutamato catalítico E42, así como en los residuos Q65 y Y116) se llevó a cabo mutagénesis dirigida, utilizando como ADN molde el plásmido pEErrorf3ss.

Inicialmente se sustituyó el residuo E42. La construcción se denominó pEError3ss_E42Q, se secuenció y se verificó que existiera el cambio del codón de glutamato (GAA) por el de glutamina (CAA) (Figura 48).

```

Fast alignment of DNA sequences pEErrorf3ssE42Q and rorf3ss

Upper line: pEErrorf3ssE42Q, from 132 to 539
Lower line: rorf3ss, from 1 to 408
pEErrorf3ssE42Q:rorf3ss identity= 99%

132 ATGGATTGTTTTGAAATTACAGGAAAAGCATATAACATAGATCCACTAATATTTAAAAG CA
|||
1 ATGGATTGTTTTGAAATTACAGGAAAAGCATATAACATAGATCCACTAATATTTAAAAG CA

192 ATTGCATGGAAT CAA TC AAAATGCAAAGCGGAATAAAAAGCAAACAAACAAAACGGA ||
|||
61 ATTGCATGGAAT GAA TC AAAATGCAAAGCGGAATAAAAAGCAAACAAACAAAACGGA ||

252 ACGTATGATATAGGTATAATGCAAATTAATTCATCTCATTAGATTATTAAGCAAAT TT
|||
121 ACGTATGATATAGGTATAATGCAAATTAATTCATCTCATTAGATTATTAAGCAAAT TT

312 AATATATCTGAAGATGATTTATTGAATAATGCCTGTATAAACATATCTGTTGCTGGTT AT
|||
181 AATATATCTGAAGATGATTTATTGAATAATGCCTGTATAAACATATCTGTTGCTGGTT AT

372 ATCTTAGCCTCTAACATAAAAATACAGAGGGAATACATGGGATGCAGTTGGTGCGTATA AT
|||
241 ATCTTAGCCTCTAACATAAAAATACAGAGGGAATACATGGGATGCAGTTGGTGCGTATA AT

432 GCAGTTACTTTAATACACCAAATGCAGTAGAACTCAGAAGGCAATACGCAATGAAAA TA
|||
301 GCAGTTACTTTAATACACCAAATGCAGTAGAACTCAGAAGGCAATACGCAATGAAAA TA

492 TATAAACATATAATAAATTAAGAATAATGAGCAAATTATCGATTAA
|||
361 TATAAACATATAATAAATTAAGAATAATGAGCAAATTATCGATTAA

```

Figura 48. Construcción pEErrorf3ss_E42Q. Alineamiento de la secuencia de la mutante puntual (línea superior) con *rorf3ss* (línea inferior), mostrando en un recuadro el codón mutado y en rojo el cambio de una base con respecto a la secuencia original.

Se obtuvieron también las mutantes puntuales His-rOrf3ss_E42A (GAA por GCA), Q65A (CAA por GCA) y Y116A (TAT por GCT) en el plásmido mencionado, verificándose también las secuencias de las construcciones obtenidas para comprobar la presencia de la mutación correspondiente (Figura 49).

Los plásmidos con las mutaciones puntuales se transformaron en células de la cepa BL21. Las proteínas mutantes se purificaron a partir de la fracción celular soluble, se dializaron y se determinó la concentración de cada proteína (aproximadamente 200 µg/ml).

a)

```

Fast alignment of DNA sequences E42A-3 and rorf3ss
Ktuple=2 Gap_penalty=7

Upper line: E42A-3, from 136 to 543
Lower line: rorf3ss, from 1 to 408

E42A-3:rorf3ss identity= 99%
136 ATGGATTGTTTTGAAATTACAGGAAAAGCATATAACATAGATCCACTAATATTTAAAAG CA
   |||||||
1 ATGGATTGTTTTGAAATTACAGGAAAAGCATATAACATAGATCCACTAATATTTAAAAG CA
   |||||||

196 ATTGCATGGAATG CAAATGCAAAGCGGAATAAAAAGCAAACAAACAAAACCGGA ||
   |||||||
61 ATTGCATGGAATG AAATCAAATGCAAAGCGGAATAAAAAGCAAACAAACAAAACCGGA ||
   |||||||

256 ACGTATGATATAGGTATAATGCAAATTAATTCATCTCATTTAGATTATTAAAGCAAAT TT
   |||||||
121 ACGTATGATATAGGTATAATGCAAATTAATTCATCTCATTTAGATTATTAAAGCAAAT TT
   |||||||

316 AATATATCTGAAGATGATTTATTGAATAATGCCTGTATAAACATATCTGTTGCTGGTT AT
   |||||||
181 AATATATCTGAAGATGATTTATTGAATAATGCCTGTATAAACATATCTGTTGCTGGTT AT
   |||||||

376 ATCTTAGCCTCTAACATAAAAACAGAGGGAATACATGGGATGCAGTTGGTGCGTATA AT
   |||||||
241 ATCTTAGCCTCTAACATAAAAACAGAGGGAATACATGGGATGCAGTTGGTGCGTATA AT
   |||||||

436 GCAGGTTACTTTAATACACCAAATGCAGTAGAACTCAGAAGGCAATACGCAATGAAAA TA
   |||||||
301 GCAGGTTACTTTAATACACCAAATGCAGTAGAACTCAGAAGGCAATACGCAATGAAAA TA
   |||||||

496 TATAAAACATATAATAAATTAAGAATAATGAGCAAATTTATCGATTAA
   |||||||
361 TATAAAACATATAATAAATTAAGAATAATGAGCAAATTTATCGATTAA
   |||||||
  
```

b)

```

Fast alignment of DNA sequences pErorf3ssQ65A1 and rorf3ss
Ktuple=2 Gap_penalty=7

Upper line: pErorf3ssQ65A1, from 135 to 542
Lower line: rorf3ss, from 1 to 408

pErorf3ssQ65A1:rorf3ss identity= 99%
135 ATGGATTGTTTTGAAATTACAGGAAAAGCATATAACATAGATCCACTAATATTTAAAAG CA
   |||||||
1 ATGGATTGTTTTGAAATTACAGGAAAAGCATATAACATAGATCCACTAATATTTAAAAG CA
   |||||||

195 ATTGCATGGAATGAATCAAATGCAAAGCGGAATAAAAAGCAAACAAACAAAACGGA GA
   |||||||
61 ATTGCATGGAATGAATCAAATGCAAAGCGGAATAAAAAGCAAACAAACAAAACGGA GA
   |||||||

255 ACGTATGATATAGGTATAATG CAAATTAATTCATCTCATTTAGATTATTAAAGCAAATTT ||
   |||||||
121 ACGTATGATATAGGTATAATG CAAATTAATTCATCTCATTTAGATTATTAAAGCAAATTT ||
   |||||||

315 AATATATCTGAAGATGATTTATTGAATAATGCCTGTATAAACATATCTGTTGCTGGTT AT
   |||||||
181 AATATATCTGAAGATGATTTATTGAATAATGCCTGTATAAACATATCTGTTGCTGGTT AT
   |||||||

375 ATCTTAGCCTCTAACATAAAAACAGAGGGAATACATGGGATGCAGTTGGTGCGTATA AT
   |||||||
241 ATCTTAGCCTCTAACATAAAAACAGAGGGAATACATGGGATGCAGTTGGTGCGTATA AT
   |||||||

435 GCAGGTTACTTTAATACACCAAATGCAGTAGAACTCAGAAGGCAATACGCAATGAAAA TA
   |||||||
301 GCAGGTTACTTTAATACACCAAATGCAGTAGAACTCAGAAGGCAATACGCAATGAAAA TA
   |||||||

495 TATAAAACATATAATAAATTAAGAATAATGAGCAAATTTATCGATTAA
   |||||||
361 TATAAAACATATAATAAATTAAGAATAATGAGCAAATTTATCGATTAA
   |||||||
  
```

c)

```

Fast alignment of DNA sequences rorf3ss and pErorf3ssY116A-1
Ktuple=2 Gap_penalty=7

Upper line: rorf3ss, from 1 to 408
Lower line: pErorf3ssY116A-1, from 139 to 546

rorf3ss:pErorf3ssY116A-1 identity= 99%
1 ATGGATTGTTTTGAAATTACAGGAAAAGCATATAACATAGATCCACTAATATTTAAAAGCA
   |||||||
139 ATGGATTGTTTTGAAATTACAGGAAAAGCATATAACATAGATCCACTAATATTTAAAAGCA
   |||||||

61 ATTGCATGGAATGAATCAAATGCAAAGCGGAATAAAAAGCAAACAAACAAAACCGGA ||
   |||||||
199 ATTGCATGGAATGAATCAAATGCAAAGCGGAATAAAAAGCAAACAAACAAAACCGGA ||
   |||||||

121 ACGTATGATATAGGTATAATGCAAATTAATTCATCTCATTTAGATTATTAAAGCAAATTT ||
   |||||||
259 ACGTATGATATAGGTATAATGCAAATTAATTCATCTCATTTAGATTATTAAAGCAAATTT ||
   |||||||

181 AATATATCTGAAGATGATTTATTGAATAATGCCTGTATAAACATATCTGTTGCTGGTTAT ||
   |||||||
319 AATATATCTGAAGATGATTTATTGAATAATGCCTGTATAAACATATCTGTTGCTGGTTAT ||
   |||||||

241 ATCTTAGCCTCTAACATAAAAACAGAGGGAATACATGGGATGCAGTTGGTGCGTATAAT ||
   |||||||
379 ATCTTAGCCTCTAACATAAAAACAGAGGGAATACATGGGATGCAGTTGGTGCGTATAAT ||
   |||||||

301 GCAGGTTACTTTAATACACCAAATGCAGTAGAACTCAGAAGGCAATACGCAATGAAAA TA
   |||||||
439 GCAGGTTACTTTAATACACCAAATGCAGTAGAACTCAGAAGGCAATACGCAATGAAAA TA
   |||||||

361 TATAAAACATATAATAAATTAAGAATAATGAGCAAATTTATCGATTAA
   |||||||
499 TATAAAACATATAATAAATTAAGAATAATGAGCAAATTTATCGATTAA
   |||||||
  
```

Figura 49. Alineamiento de las construcciones pErorf3ss_E42A, pErorf3ss_D60A, pErorf3ss_Q65A y pErorf3ss_Y116A, a), b) y c), respectivamente, con rorf3ss, indicando con un recuadro los codones mutados y con rojo el cambio de bases.

Actividad de las mutantes puntuales en zimogramas

Una vez purificadas las proteínas mutantes, sus actividades de TL se evaluaron en zimogramas para determinar el efecto de las mutaciones puntuales.

En el caso de las mutaciones en el glutamato catalítico, la mutante con el cambio por alanina no presentó actividad (Figura 50), sin embargo la mutante con el cambio por glutamina sólo presentó una actividad residual con respecto a la de la proteína His-rOrf3ss en los geles con sustrato (Figura 51). Estos resultados se discuten en la siguiente sección.

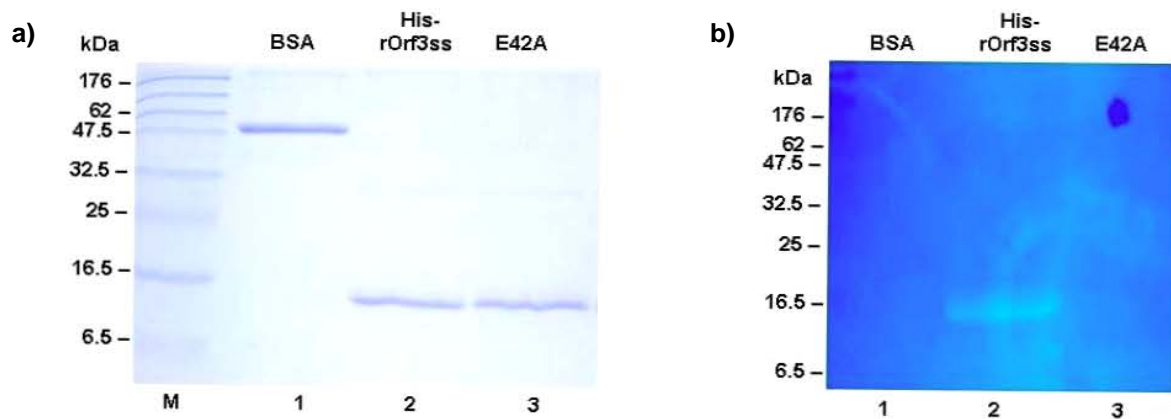


Figura 50. Actividad de TL de la mutante puntual rOrf3ss_E42A en zimogramas. a) Gel de poliacrilamida 15%; b) Geles de sustrato (0.2%) M: marcador. Carril 1: BSA, 2: His-rOrf3ss, 3: His-rOrf3ssE42A.

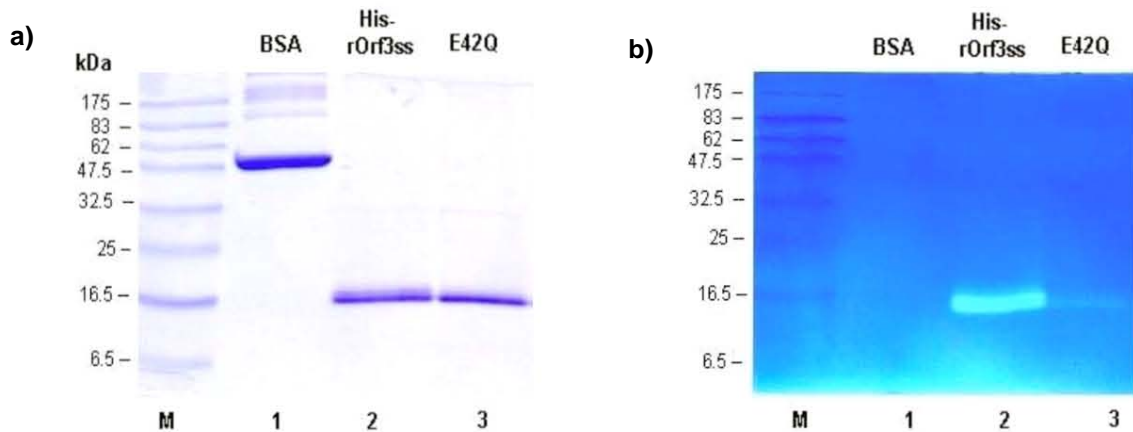


Figura 51. Actividad de TL de mutantes puntuales de rOrf3ss en zimogramas. a) Geles de poliacrilamida 15%, b) geles de sustrato (0.2%) M: marcador. Carril 1: BSA, 2: His-rOrf3ss, 3: His-rOrf3ssE42.

Las mutantes Q65A y Y116A presentaron solamente una reducción en la actividad con respecto a la proteína silvestre (Figura 52). Estos resultados demuestran que el glutamato conservado es esencial para la función de la proteína rOrf3 y que los otros residuos conservados son importantes para la actividad de esta enzima.

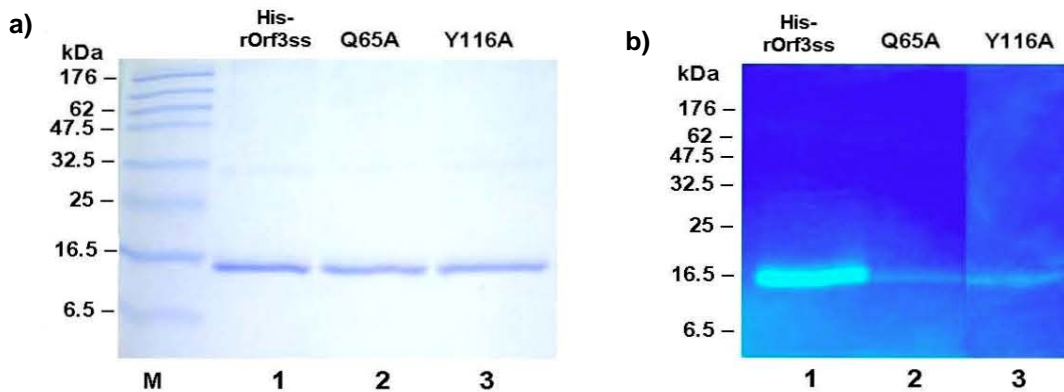


Figura 52. Actividad de mutantes puntuales de rOrf3ss en zimogramas. a) Geles de poliacrilamida 15%; b) Geles de sustrato (0.2%). M: marcador. Carril 1: His-rOrf3ss, 2: His-rOrf3ss_Q65A, 3: His-rOrf3ss_Y116A.

Efecto de la sobreproducción de rOrf3 sobre cultivos bacterianos

Para observar el efecto de rOrf3 sobre el crecimiento de cultivos de la cepa BL21, se sobreprodujeron diferentes versiones de la proteína: His-rOrf3, His-rOrf3ss, rOrf3 y rOrf3ss. Para ello *rorf3* y *rorf3ss* se subclonaron en el vector de expresión pTrc99A (que produce proteínas sin etiqueta alguna), y las construcciones obtenidas se denominaron pNT*rorf3* y pNT*rorf3ss*, respectivamente (dato no mostrado).

Con las construcciones anteriores y las clonadas en pET19b (con etiqueta de histidinas) se transformaron las células BL21. Los cultivos se indujeron con IPTG 1 mM a 37°C (condiciones en las que se observaron los mayores efectos de la sobreexpresión de *rorf3*) y se tomaron muestras antes y después de la inducción durante cada hora para determinar la densidad óptica de los cultivos a 600 nm.

En el caso de las cepas con las construcciones pEE*rorf3*, pEE*rorf3ss* y pNT*rorf3ss* la sobreproducción de las proteínas correspondientes no presentó ningún efecto sobre el crecimiento de los cultivos, al compararse éste con las cepas conteniendo los vectores pET19b y pTrc99A (Figura 53).

Sin embargo, en el cultivo con la construcción pNT*rorf3* se observó una disminución en el crecimiento con respecto a la de los otros cultivos, lo que indica que la proteína rOrf3, al ser transportada al periplasma bacteriano, es capaz de producir un efecto negativo sobre el crecimiento de *E. coli* (Figura 53).

También se determinó el efecto de la sobreproducción de la mutante rOrf3_E42A, pero contrario a lo esperado, ésta se comportó igual que la proteína silvestre, inhibiendo el crecimiento de los cultivos, resultado que indica que dicha inhibición no se debe a la actividad de TL de rOrf3 (Figura 54).

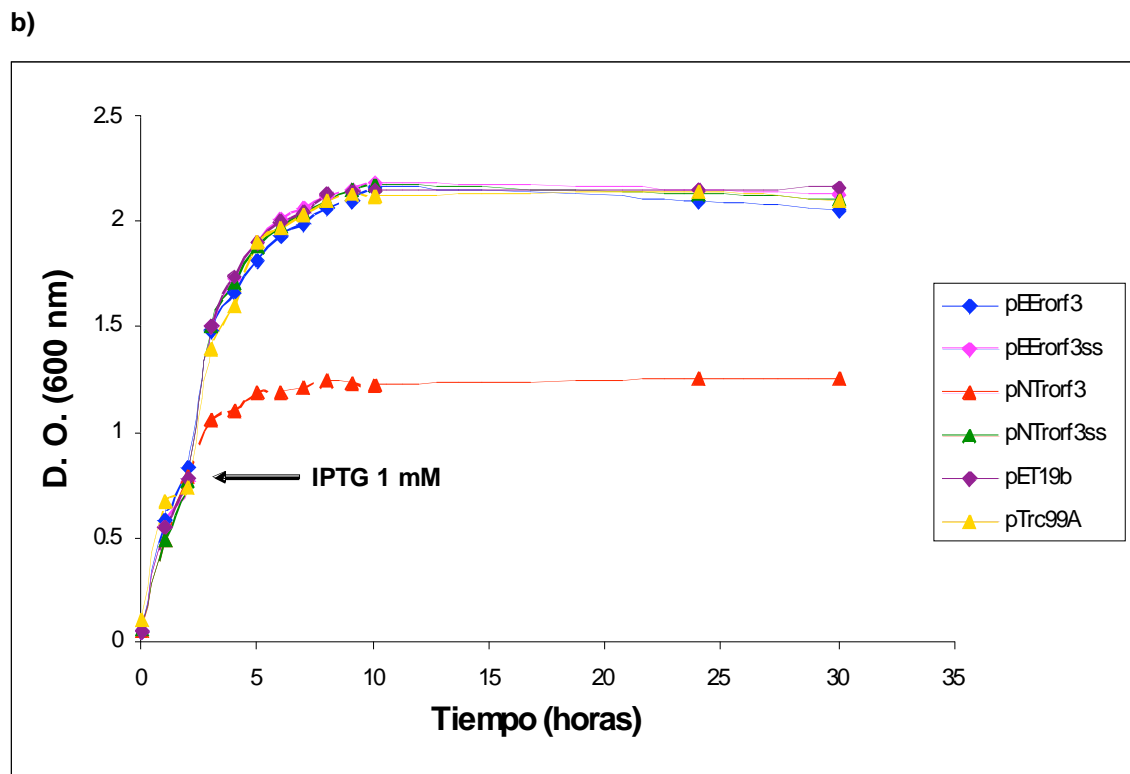
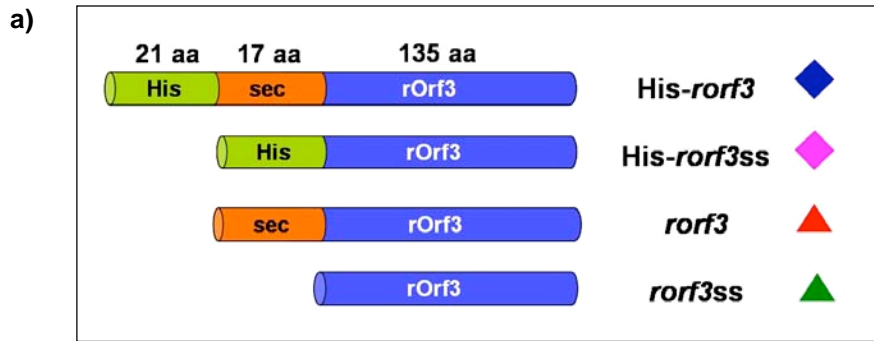


Figura 53. Efecto de la sobreproducción de rOrf3 sobre el crecimiento de cultivos bacterianos. a) Representación de las proteínas producidas por las diferentes versiones del gen *rorf3*, indicando la longitud de la etiqueta de histidinas, de la secuencia señal y de la proteína madura; b) Curvas de crecimiento de cultivos de la cepa BL21 con los plásmidos pErorf3 (azul), pErorf3ss (rosa), pNTrorf3 (rojo) y pNTrorf3ss (verde) y con los vectores pET19b (morado) y pTrc99A (amarillo), inducidos con IPTG 1mM a 37°C, indicando el punto en el cual se agregó el IPTG.

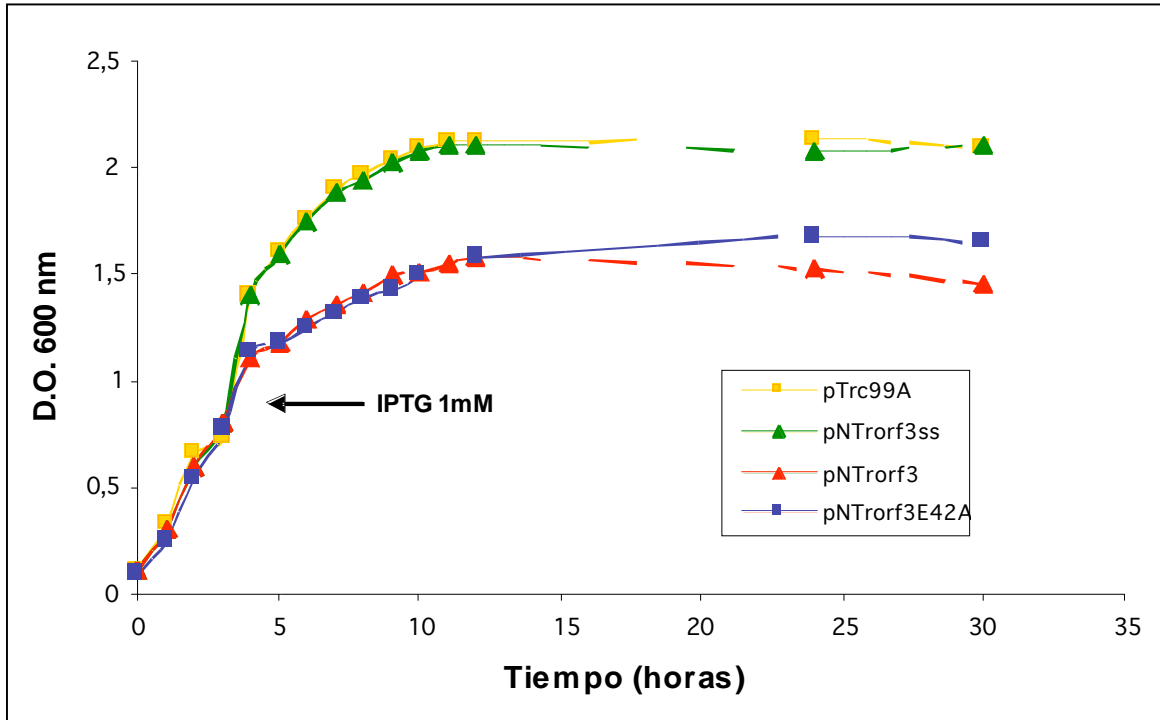


Figura 54. Efecto de la sobreproducción de rOrf3_E42A sobre el crecimiento de cultivos bacterianos. Curvas de crecimiento de cultivos de la cepa BL21 con los plásmidos pNTrorf3 (rojo), pNTrorf3E42A (azul), pNTrorf3ss (verde) y con el vector pTrc99A (amarillo), inducidos con IPTG 1mM a 37°C, indicando el punto en el cual se agregó el IPTG.

Mutante nula en *rorf3*

Para producir una cepa de EPEC nula en *rorf3* se utilizó el sistema Red del fago λ . Se amplificó el casete de resistencia a cloranfenicol (*cat: chloramphenicol acetyl transferase*) y se obtuvo un producto de 1.1 Kb (Figura 55).

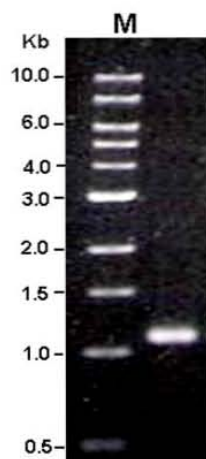


Figura 55. Producto de la amplificación del casete de resistencia a cloranfenicol (1.1 Kb) a partir del plásmido pKD3, purificado por extracción de gel de agarosa.

El casete de cloranfenicol se electroporó en células de una cepa silvestre de EPEC resistente a ácido nalidíxico a la que previamente se introdujo el plásmido pKD46. Las células electroporadas se cultivaron en medio sólido LB con cloranfenicol, incubándose a 37°C para eliminar el plásmido pKD46 (termosensible).

En algunas de las colonias resistentes a cloranfenicol obtenidas se verificó la inserción del casete de resistencia realizando reacciones de PCR con los oligonucleótidos apropiados.

El producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos escUF y grlrR fue de 1319 pb en el cromosoma de la cepa mutante y de 719 pb para la cepa silvestre (Figura 56), lo que indicó la presencia del casete de resistencia en la región esperada.

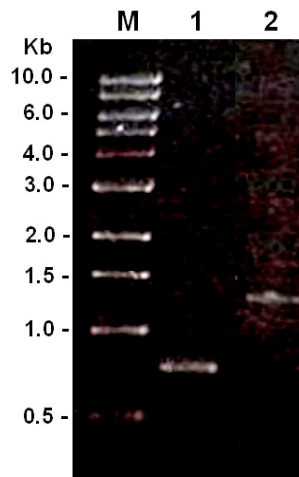


Figura 56. Amplificación de casete *cat* en EPEC nula en *rorf3*. M: marcador, carril 1: producto obtenido de la cepa silvestre, carril 2: producto de la cepa $\Delta rorf3::cat$.

También se realizaron reacciones adicionales con los oligonucleótidos *escUF* y *catR*, así como con *catF* y *grlR*, obteniéndose productos de 369 pb y de 300 pb, respectivamente, que coincidieron con las longitudes esperadas (Figura 57).

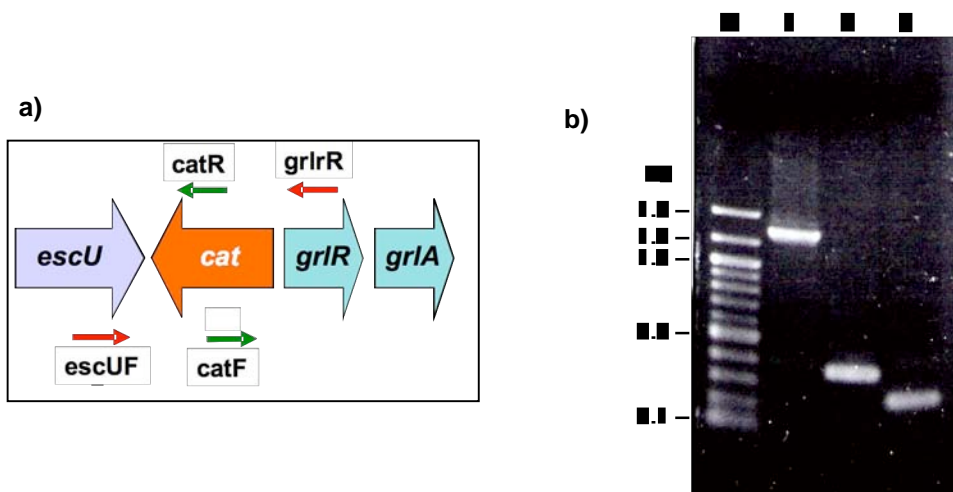


Figura 57. Amplificación del gen de resistencia a cloranfenicol. a) Esquema indicando las regiones homólogas a los oligonucleótidos utilizados en el cromosoma de la cepa $\Delta rorf3::cat$. b) Producto de PCR obtenido a partir de ADN cromosomal de la mutante x. M: marcador (100 pb), carril 1: producto obtenido usando los oligonucleótidos externos *escUF* y *grlR* (1319 pb), carril 2: *escUF* y *catR* (369 pb), carril 3: *catF* y *grlR* (300 pb).

Los productos amplificados con las distintas combinaciones de oligonucleótidos se secuenciaron para verificar que no se presentaran mutaciones en el casete ni en las regiones aledañas a éste en el cromosoma (dato no mostrado).

Ensayos de secreción de proteínas del SST3

Una vez obtenida la cepa mutante denominada $\Delta rorf3::cat$, se evaluó su fenotipo a través de la secreción de las proteínas translocadoras EspA, EspB y EspD. Las proteínas secretadas se observaron en un gel de acrilamida por tinción con Coomassie y a través de una inmunodetección.

Se observó que a diferencia de la cepa silvestre, la cepa $\Delta rorf3::cat$ no fue capaz de secretar proteínas como EspD, EspB ni EspA (Figura 58, carril 2). Sin embargo, la mutante no se pudo complementar en trans con el gen *rorf3* en el vector pTrc99A (pNTrorf3) (dato no mostrado).

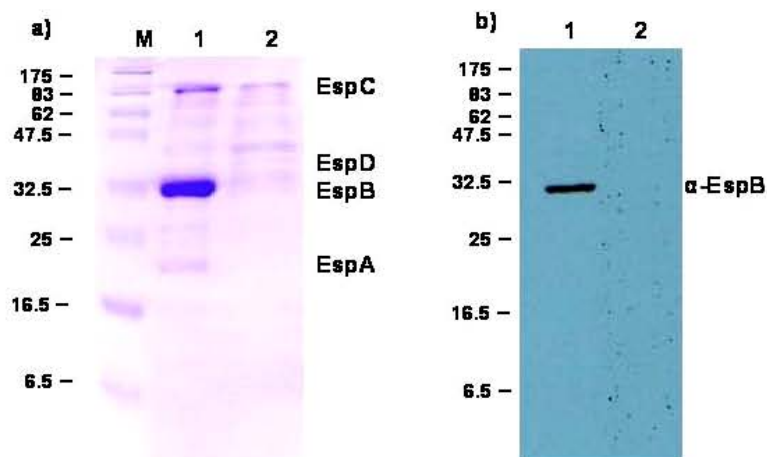


Figura 58. Ensayo de secreción de proteínas por el SST3. a) Gel de acrilamida de proteínas secretadas al medio de cultivo y precipitadas con TCA y b) Inmunodetección utilizando anticuerpos anti-EspB. M: marcador, carril 1: proteínas secretadas por la cepa silvestre, 2: proteínas secretadas por la cepa $\Delta rorf3::cat$.

Debido a esto, se evaluó la producción de proteínas del SST3, tanto en la cepa silvestre como en la cepa mutante. Utilizando anticuerpos contra la proteína EspB en lisados celulares completos, observamos que en la mutante $\Delta rorf3::cat$ la producción de EspB se ve reducida con respecto a EPEC

silvestre (Figura 59), probablemente debido a un efecto negativo sobre el sistema global de regulación de expresión de genes del LEE, ocasionado por la inserción del casete.

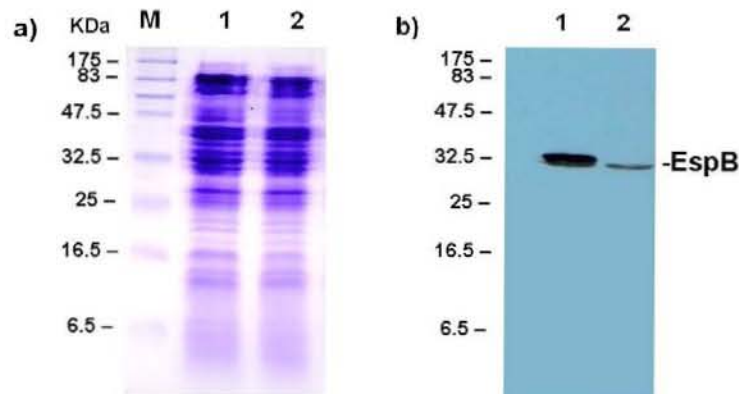


Figura 59. Producción de proteínas del SST3 de EPEC. a) Gel de poliacrilamida con lisados celulares completos de cultivos de EPEC; b) Inmunodetección de EspB en lisados completos. M: marcador, carril 1: proteínas producidas por EPEC silvestre, 2: proteínas producidas por EPEC $\Delta rorf3::cat$.

Río arriba del gen *rorf3* se encuentra la región intergénica que regula al operón *grlRA*, por lo que la inserción del casete pudiera estar afectando a *grlA*, un regulador transcripcional positivo de *ler*, el regulador positivo de todos los genes de la isla. Para verificar lo anterior, en la cepa nula en *rorf3* se sobreexpresó al gen *grlA* (a partir del plásmido pT3-*grlA* donado por el Dr. José Luis Puente, Instituto de Biotecnología, UNAM) y se determinó la producción y secreción de proteínas.

Se utilizaron las cepas de EPEC silvestre-pT3*grlA*, $\Delta escN$ -pT3*grlA* (como control) y $\Delta rorf3::cat$ -pT3*grlA*. Se observó que la producción de proteínas se recupera en la mutante nula en presencia de *grlA* al compararse con la misma cepa sin *grlA* (Figura 60). Lo anterior confirma el efecto polar producido sobre la expresión del operón *grlRA* por la delección de *rorf3* del cromosoma de EPEC, al ser este gen un sitio de unión del regulador Ler.

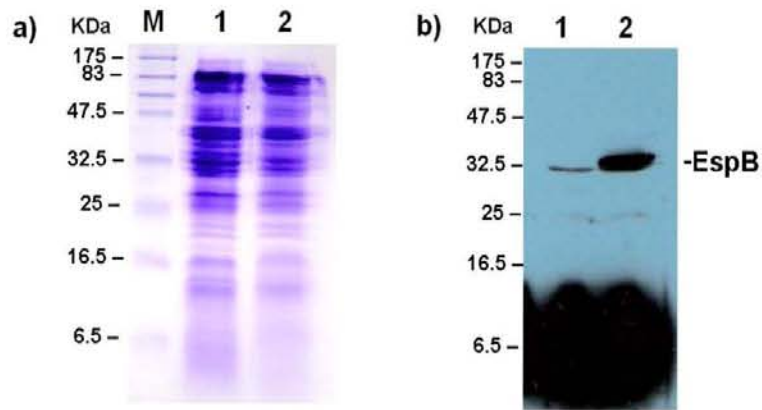


Figura 60. Producción de proteínas en EPEC $\Delta rorf3::cat$ con pT3grIA. a) Gel de poliacrilamida con lisados celulares completos, b) Inmunodetección de EspB en lisados completos. M: marcador, carril 1: proteínas producidas por EPEC $\Delta rorf3::cat$, 2: proteínas producidas por EPEC $\Delta rorf3::cat$ -pT3grIA.

En los ensayos de secreción se logró detectar la secreción de proteínas del SST3 por $\Delta rorf3::cat$ sobreproductora de GrIA; sin embargo, ésta fue menor que la de la cepa silvestre sobreproductora de GrIA, lo cual pudiera representar el efecto real del fenotipo de la delección de *rorf3*, es decir una secreción reducida (Figura 61).

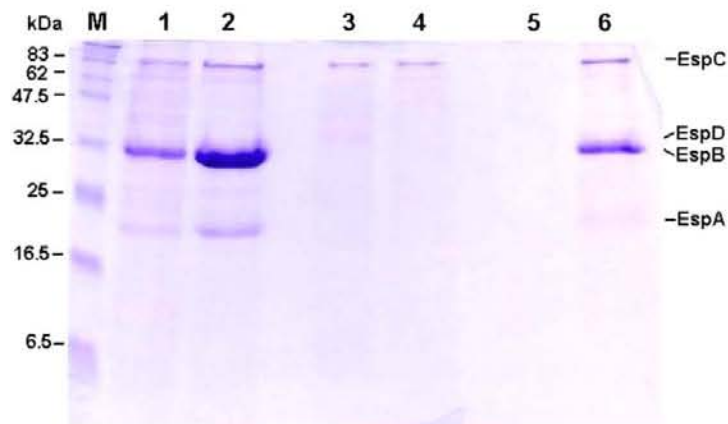


Figura 61. Ensayo de secreción de proteínas del SST3 de EPEC sobreproduciendo a GrIA. Gel de acrilamida de proteínas secretadas al medio de cultivo y precipitadas con TCA. M: marcador, carril 1: proteínas secretadas por EPEC silvestre, 2: EPEC silvestre-pT3grIA, 3: $\Delta escN$, 4: $\Delta escN$ -pT3grIA, 5: $\Delta rorf3::cat$, 6: $\Delta rorf3::cat$ -pT3grIA.

Sin embargo, la secreción de proteínas que se observa en la mutante *rorf3* no ocurre en las condiciones normales de expresión del LEE, por lo que de esta

forma no es posible determinar la importancia de rOrf3 en la biogénesis del SST3.

DISCUSIÓN

Las transglicosilasas líticas (TLs) son enzimas que funcionan como espaciadoras en la pared celular bacteriana, rompiendo los enlaces glicosídicos en la capa de peptidoglicano para permitir que se lleven a cabo diferentes procesos (Scheurwater *et al.* 2007). Son críticas para la expansión de la pared celular y por lo tanto para el crecimiento celular por medio de la formación de sitios para la inserción de precursores de peptidoglicano. También son requeridas para el recambio de este biopolímero y en bacterias Gram-negativas, para su reciclaje, liberando 1,6-anhidromuropéptidos que serán transportados de regreso al citoplasma para ser reutilizados (Höltje, 1998).

Otras TLs contribuyen a la patogenicidad de diferentes bacterias ya que sus productos desencadenan algunos de los síntomas característicos de las infecciones bacterianas, tales como fiebre (pirogenicidad), falta de apetito, somnolencia y estimulación de los receptores intracelulares NOD1 y NOD2 (Boneca 2005). Además el anhidro-monómero liberado puede funcionar como citotoxina, esto sucede en el caso de las infecciones por *Bordetella pertussis* y *Neisseria gonorrhoeae* (Cloud-Hansen *et al.* 2006).

Algunas TLs están asociadas con la germinación de endoesporas (Keep *et al.* 2006) y otras facilitan la inserción de complejos proteicos en la envoltura celular bacteriana, como los sistemas de secreción, flagelos y pilus; éstos son demasiado grandes para pasar a través de los poros naturales de la pared celular y por lo tanto se ha propuesto que requieren de la acción de enzimas muralíticas para remodelar localmente la capa de peptidoglicano y formar un espacio suficientemente grande para su inserción (Scheurwater *et al.* 2007).

Debido a su importancia biológica, las TLs son un blanco potencial para nuevos antibióticos; ya que son críticas para la función celular y reproducción bacterianas y actúan sobre una estructura única en las bacterias: la pared celular (Scheurwater *et al.* 2007). Su mecanismo de reacción, único entre las enzimas muralíticas, las hace un blanco atractivo para antimicrobianos desarrollados a partir de inhibidores de la actividad, que no interfieran con el

sistema inmune innato ni con el metabolismo humano, en los cuales no existen enzimas equivalentes (Dijkstra y Thunnissen, 1994; Blackburn y Clarke, 2002).

El modelo de estudio en nuestro laboratorio es el SST3 de EPEC, por lo cual estamos interesados en la caracterización de sus componentes, así como en la participación de éstos en su ensamblaje y funcionamiento. Dentro de la isla de patogenicidad LEE se encontró un gen que codifica un producto con similitud a TLs (rOrf3) y dada la importancia de este tipo de enzimas en diferentes procesos y a que probablemente sean necesarias durante la formación del SST3, degradando la pared celular y permitiendo el paso de las estructuras del inyectisoma, se decidió caracterizar dicha proteína y determinar su papel durante este proceso.

En este trabajo, se clonó y expresó el gen *rorf3*, produciéndose una proteína recombinante con una etiqueta de 10 residuos de histidina en su extremo amino. Sin embargo, no fue posible purificarla a partir de lisados celulares. Una explicación al problema anterior es que como se describió anteriormente, rOrf3 contiene una secuencia señal hidrofóbica de 17 aminoácidos en su extremo amino, lo que pudo afectar su solubilidad durante la sobreproducción. Por otro lado, en el extremo amino también se encuentra la etiqueta de histidinas, por lo que al lisar las células en las que se produjo la proteína, ésta entra en contacto con peptidasas de secuencia señal que cortan dicho péptido líder (Remaut y Waksman, 2004). Esto provoca también la pérdida de las histidinas necesarias para la purificación por medio de cromatografía de afinidad por níquel, por lo que no fue posible purificar la mínima cantidad de proteína que queda soluble. Por esta razón se decidió clonar el gen sin las bases que codifican la secuencia señal, lográndose purificar la proteína recombinante His-rOrf3ss a partir de la fracción celular soluble.

Una vez que His-rOrf3ss se purificó, se utilizó para inocular conejos y obtener anticuerpos policlonales anti His-rOrf3ss. Los anticuerpos obtenidos reconocieron a la proteína recombinante, pero también detectaron una banda de masa aproximada de 32.5 kDa que correspondería a la de un dímero. Sin embargo, no encontramos antecedentes en la literatura que indiquen que las

TLs se comporten como dímeros, por lo que probablemente se trate de reconocimiento inespecífico. Por lo anterior el suero será precipitado con sulfato de amonio y los anticuerpos serán purificados para eliminar los contaminantes que pudieran interferir con el reconocimiento de la proteína nativa en un extracto celular.

La actividad lítica de peptidoglicano por His-rOrf3ss se determinó por medio de zimogramas, ensayos en los que se utilizó la bacteria liofilizada *M. lysodeikticus*, bacteria Gram-positiva que posee una pared celular muy gruesa, por lo que ha sido utilizada para la caracterización de este tipo de enzimas (Buist *et al.* 1995). Con este ensayo se demostró la actividad muralítica de rOrf3.

Durante la realización del presente proyecto la proteína rOrf3 fue renombrada como EtgA (*E. coli transglycosylase*), esto a partir de estudios bioinformáticos basados en comparaciones de secuencias de los genes del LEE (usando PSI-BLAST), aunque en ese trabajo no se determinó su función como tal (Pallen *et al.*, 2005). Como se mencionó, en el presente trabajo demostramos que rOrf3 tiene actividad lítica, por lo que en estudios futuros será utilizada la nomenclatura asignada: EtgA.

Pudimos observar claramente una banda clara producida por rOrf3 a través de zimogramas y este método ha sido utilizado ampliamente para demostrar actividad de degradación de peptidoglicano por autolisinas en bacterias Gram-negativas (Koraimann 2003).

Se realizaron otros ensayos para determinar la actividad lítica de rOrf3, como los lisoplatos (en los cuales el sustrato se mezcla con agarosa) (Becktel y Baase, 1985) o ensayos turbidimétricos (en los que se monitorea un cambio en la densidad óptica de una solución de *M. lysodeikticus*, en un amortiguador de fosfatos con pH ácido, en presencia de la enzima) (Mörsky, 1982). A diferencia de la lisozima utilizada como control positivo, no fue posible observar degradación de *M. lysodeikticus* por His-rOrf3ss. La ausencia de actividad en estos ensayos podría deberse a una baja especificidad de rOrf3 por la pared

celular de una bacteria Gram-positiva. Esto ya ha sido sugerido para la TL Gp144 del fago Φ KZ de *Pseudomonas aeruginosa*, ya que los resultados de su caracterización indican que esta enzima degrada específicamente el peptidoglicano purificado de bacterias Gram-negativas, en particular el de *P. aeruginosa* (Paradis-Bleau *et al.*, 2007). Sin embargo, dado que His-rOrf3ss es capaz de degradar la pared de *M. lysodeikticus* en un zimograma, la ausencia de actividad en las otras técnicas puede también deberse a la poca solubilidad de la enzima, así como a la baja concentración en la que ésta pudo ser utilizada en dichos ensayos.

Debido a lo anterior, será necesario recurrir a otros métodos para poder realizar análisis cuantitativos de la actividad de muramidasa de rOrf3, que nos permitan caracterizar enzimáticamente a esta proteína y que incluyan la degradación de un sustrato para el cual sea más específica la actividad de rOrf3, es decir, peptidoglicano de *E. coli*. Entre estos métodos se encuentran los de cuantificación de la liberación de fragmentos solubles del sustrato, previamente marcado con colorantes fluorescentes como Cy3 (Zahrl *et al.*, 2005), o radioactivamente con [3 H]-A₂pm (Zahrl *et al.*, 2005) o [3 H]-glucosamina (Kohler *et al.*, 2007), por rOrf3. También será necesario caracterizar dichos productos de degradación, para comprobar que la reacción catalizada por esta enzima produce 1,6-anhidromuropéptidos y corroborar que efectivamente es una transglicosilasa lítica.

Como se mencionó anteriormente, entre las TLs existen residuos altamente conservados, sin embargo sólo un residuo invariable de glutamato es indispensable para su actividad lítica, como se ha visto para algunas TLs, principalmente para aquellas asociadas con el metabolismo normal del peptidoglicano como Slt70 y Slt35, en las cuales el reemplazo del residuo de glutamato conservado resulta en la eliminación total de su actividad (Thunisen *et al.* 1994; Van Asselt *et al.*, 1999a). Para determinar el papel de este glutamato y otros residuos conservados en rOrf3, se llevó a cabo mutagénesis dirigida en His-rOrf3ss (reemplazando el aminoácido más conservado de cada motivo consenso: E42Q, E42A, Q65A y Y116A) y la actividad de cada mutante se evaluó por medio de zimogramas.

En la mutante con una sustitución del glutamato catalítico por glutamina (E42Q), no hubo pérdida total de la actividad, se observó una disminución de ésta en comparación con la proteína silvestre, aunque la reducción fue significativa con respecto a la disminución de actividad de los otros residuos mutados. Esto puede deberse a una probable desaminación de la glutamina originando glutamato (Lehninger *et al.*, 1993), lo que permitiría que la proteína no perdiera totalmente su actividad lítica. Esto sólo ha sido sugerido para la lisozima de pollo, aunque en ese caso la actividad parcial observada en una mutante E35Q pudo deberse a la contaminación con proteína silvestre (Kuroki *et al.*, 1986; Malcolm *et al.*, 1989).

Por lo anterior se decidió sustituir al residuo glutamato por uno más pequeño como la alanina. La mutante E42A no presentó actividad en zimogramas, por lo que se determinó que este residuo es esencial para la actividad de muramidasa de rOrf3, lo que sugiere que éste es el residuo catalítico y que la enzima es una TL, cuya actividad se caracteriza por depender de un solo aminoácido. Adicionalmente, con esta mutante se demuestra que no es la unión al peptidoglicano lo que se observa en el zimograma, sino que la banda clara producida por His-rOrf3ss es resultado de la actividad lítica de esta proteína. Además por medio de cristalografía de otras TLs se ha demostrado que el glutamato catalítico no está involucrado en la unión al sustrato (Van Asselt *et al.*, 1999b).

En el caso de la TL P19 del plásmido conjugativo R1 (del SST4), la mutación de dicho glutámico elimina totalmente su actividad lítica sobre cultivos de *E. coli* (Bayer *et al.* 2001). Recientemente, también se comprobó que este glutamato es el residuo catalítico de IpgF, la probable TL asociada al SST3 de *S. sonnei*, mediante la sustitución de dicho residuo por una glutamina, que originó una mutante que fue completamente inactiva (Zahrl *et al.*, 2005). Otra transglicosilasa lítica asociada con un sistema de secreción, para la que se determinó que el aminoácido catalítico es el glutámico conservado, es AtlA, proteína codificada en el locus que codifica el SST4 de *N. gonorrhoeae*, esto se comprobó al hacer la sustitución por alanina, ya que la mutante no fue capaz

de generar productos solubles de degradación del peptidoglicano (Kohler *et al.* 2007).

Con los residuos mutados de las cajas conservadas (Q65A y Y116A), sólo se observó una reducción en la actividad de la proteína, indicando que éstos son necesarios para la actividad de rOrf3, pero no esenciales. Se ha determinado por medio de cristalografía de rayos X, que estos residuos están involucrados en la interacción de algunas TLs con su sustrato (Dijkstra y Thunnissen, 1994; Van Asselt *et al.*, 1999b).

Como un ensayo alternativo para tratar de determinar la actividad *in vivo* de rOrf3, se evaluó el efecto de la sobreproducción de diversas versiones de la proteína sobre el crecimiento del cultivo bacteriano. Tres de éstas (His-rOrf3, His-rOrf3ss, y rOrf3ss) no tuvieron ningún efecto en el crecimiento de la cepa BL21. Sin embargo, al sobreproducir a rOrf3 se observó una disminución en el crecimiento del cultivo, diferencia que fue notable desde el momento de la inducción con IPTG. Cabe mencionar que los mismos resultados se obtuvieron al utilizar a EPEC.

Estos resultados se pueden explicar considerando que rOrf3 es la única de las cuatro proteínas capaz de salir al periplasma, en donde ejerce normalmente su función. En el caso de His-rOrf3, muy probablemente la presencia de la etiqueta de histidinas en el extremo amino esté evitando el reconocimiento de la secuencia señal, y en el caso de rOrf3ss y His-rOrf3ss, su sobreproducción no afecta al crecimiento celular ya que carecen del péptido líder y por lo tanto no pueden ser transportadas al periplasma.

Por otro lado, también se sobreprodujo la proteína rOrf3_E42A, que por ser inactiva, se esperaba no tuviera ningún efecto en el crecimiento del cultivo, pero, por el contrario, se comportó igual que rOrf3. Esto indica que no es la lisis de la pared celular lo que provoca la disminución del crecimiento. Podría ser que la proteína que sale al periplasma, independientemente que sea inactiva, pueda estar uniéndose al sustrato provocando alteraciones que afectan al crecimiento y división celular; o que el exceso de proteína en el espacio

periplásmico tenga un efecto tóxico. Para ver si este efecto era específico de rOrf3, se indujo la producción de una proteína del SST3 de localización periplásmica (asociada a la membrana interna): EscJ, la cual no produjo ningún efecto en la curva de crecimiento (dato no mostrado), indicando que la inhibición del crecimiento es específica de rOrf3.

En otros trabajos se ha logrado demostrar la lisis celular por TLs como P19 del plásmido R1 de *E. coli* (Bayer *et al.*, 2001), LtgB de *N. gonorrhoeae* (Kohler *et al.*, 2005), GP144 del fago Φ KZ de *P. aeruginosa* (Paradis-Bleau *et al.*, 2006) y AtIA del SST4 de *N. gonorrhoeae*. En esos trabajos observan no sólo disminución, sino una inhibición drástica del crecimiento bacteriano al sobreproducir las TLs mencionadas. Lo anterior también indica que el efecto observado por la sobreproducción de rOrf3 no se debe a lisis celular. Además, al observar las células por microscopía electrónica de barrido, no se detectó ninguna diferencia significativa entre la morfología de las bacterias que producían rOrf3 y las que no.

Para determinar la participación de rOrf3 en la biosíntesis del SST3 se construyó una mutante nula en el gen *rorf3*, por medio de la recombinación de un casete de resistencia a cloranfenicol en que sustituye al gen. Al analizar el fenotipo de dicha mutante, como se esperaba, no se secretaron las proteínas translocadoras EspB, EspD y EspA. Sin embargo, la mutante no se pudo complementar con el gen silvestre en *trans*. La posible existencia de un efecto polar del casete se comprobó al evaluar la producción de diferentes proteínas (como EspB) en lisados completos, la cual estaba afectada en el caso de Δ *rorf3::cat*. Esto indicó que la inserción del casete pudo haber afectado a un regulador transcripcional de todos los genes de la isla. En el ensayo de secreción tampoco se detectó al autotransportador EspC, el cual, a pesar de ser secretado vía sistema de secreción tipo V, es regulado por Ler, lo cual sugiere que podía existir un problema con la expresión de dicho regulador positivo de los genes del LEE.

Río abajo de *rorf3* se localiza el operón bicistrónico *grlRA* (*global regulator of LEE repressor and activator*) que codifica los reguladores transcripcionales de

Ler: GrlR y GrlA . GrlA es un regulador positivo de la expresión de *ler* (Barba *et al.*, 2005; Figura 62); de esta forma, si se afectara la expresión de *grlA*, se reprimiría la expresión del resto de los genes del locus y por lo tanto la producción de proteínas. Sin embargo, la secuenciación nucleotídica del casete *cat* y de las regiones aledañas a éste (130 bases río arriba y río abajo), indicó que el casete se insertó en el sitio correcto (en lugar de *etgA*) y que no existen errores en las bases secuenciadas dentro de la región intergénica entre *rorf3* y el operón *grlRA*, por lo que la expresión de *grlA* no debería estar afectada.

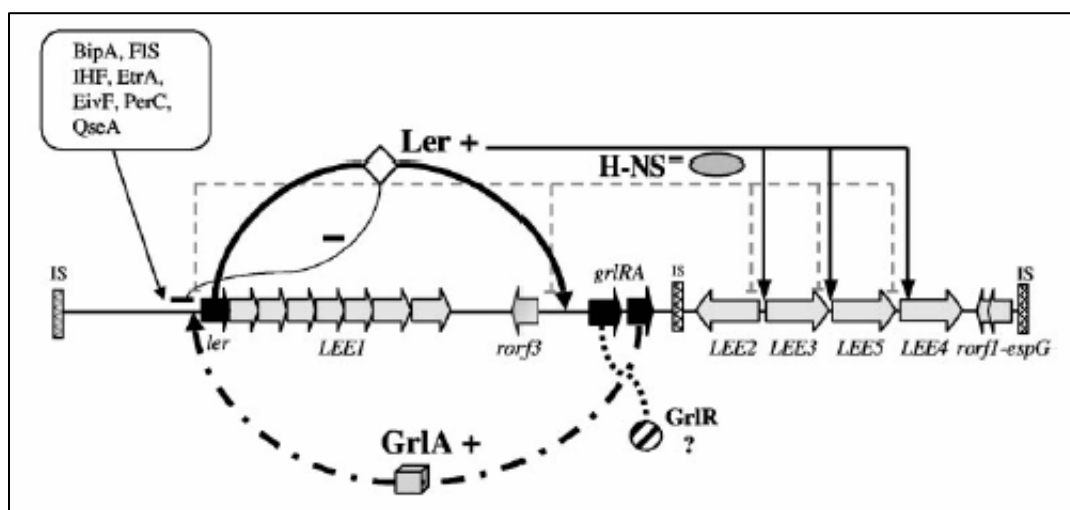


Figura 62. Modelo de regulación de los genes del LEE en patógenos A/E. (Tomada de Barba *et al.* 2005).

Recientemente se determinó que dentro de la región codificante de *rorf3* existe un sitio al que se une Ler (Ruíz Díaz, 2006). Por lo tanto, al eliminar el sitio de unión de Ler dentro del gen *rorf3*, permanece unido el regulador H-NS a la región intergénica, la expresión de *grlA* se reprime y consecuentemente la expresión de *ler* y del resto de los genes del LEE, debido a lo cual no hay producción de proteínas del SST3.

Para corroborar lo anterior, se decidió sobreproducir a GrlA en la cepa $\Delta rorf3::cat$ (introduciendo el plásmido pT3-*grlA*) y analizar la producción y secreción de proteínas. La producción de proteínas con sobreproducción de GrlA se incrementó considerablemente con respecto a la cepa sin el plásmido,

indicando que en la mutante nula en *rorf3* la expresión de *grlA* sí está siendo reprimida, al no existir el sitio de unión para Ler.

En cuanto a la secreción, la mutante *rorf3* con GrIA sí es capaz de secretar proteínas. Esto podría representar el fenotipo real de la eliminación del gen, sin embargo, al haber una elevada producción de proteínas del SST3 y en condiciones no fisiológicas, es probable que este sistema se esté ensamblando en los huecos que se forman normalmente en la pared celular (Fisher *et al.*, 2006). Estos espacios podrían ser los suficientemente grandes para permitir el ensamblaje del SST3, sin ser necesaria la lisis de la pared celular (Hirano *et al.*, 2001; Koraimann, 2003; de la Mora *et al.*, 2007).

Por el contrario, la delección del mismo gen en la isla LEE de *C. rodentium* sólo presentó una disminución en la secreción y la producción de proteínas no se alteró al compararse con la cepa silvestre (Deng *et al.*, 2004). Pensamos que esto se debe a que en dicho trabajo no se eliminó al gen completamente, ya que sólo se eliminó la región entre los codones 45 y 129, lo que sugiere que el sitio de unión de Ler probablemente se encuentre en las bases restantes.

Debido a lo anterior, para determinar la importancia de rOrf3 como TL en el ensamblaje del SST3, será necesario generar otra mutante nula en *rorf3*, eliminando solamente la región entre los codones 41 y 131 (delección que además incluye al glutámico catalítico) y así evitar el efecto polar observado al eliminar completamente el gen.

Una vez que se logre obtener dicha mutante, se espera poder observar el fenotipo real producido por la ausencia de la TL. Para esto, además de los ensayos de secreción de proteínas del SST3 de EPEC se recurrirá a otras metodologías. Para obtener una mejor comprensión de la función de rOrf3 en el ensamblaje del inyectisoma, se aislarán complejos aguja de cultivos de la cepa mutante en *rorf3* para determinar si se forman o no dichas estructuras y en qué cantidad.

Además, la mutante se complementará con las diferentes construcciones conteniendo *rorf3*, esperando recuperar el fenotipo de producción y secreción de proteínas al complementar con la versión silvestre. Adicionalmente, se complementará dicha mutante con las versiones con mutaciones puntuales en residuos conservados, esperando que no exista complementación con la mutante E42A, pero sí una recuperación parcial con las mutantes Q65A y Y116A, lo que indicaría la importancia de la función de TL en la biogénesis del SST3.

CONCLUSIONES

El gen *rorf3* del LEE de EPEC se amplificó y se clonó sin las bases de la secuencia señal en pET19b, lográndose su expresión y la purificación de la proteína His-rOrf3ss.

Se obtuvieron anticuerpos policlonales anti-rOrf3ss a partir de suero de conejos inoculados con la proteína recombinante, los cuales podrán ser utilizados para futuros ensayos de inmunodetección en los experimentos de interacción proteína-proteína.

Se demostró por zimogramas que la proteína codificada por *rorf3* es una muramidasa o transglicosilasa lítica.

Al sobreproducir la proteína rOrf3 se observó un efecto de inhibición en el crecimiento de los cultivos bacterianos, que no se debió a lisis celular por rOrf3.

Se observó que en las mutantes E42Q, Q65A y Y116A hay una reducción de la actividad lítica de la proteína, en cambio en la mutante E42A dicha actividad se perdió completamente, por lo que se determinó que el residuo glutamato es esencial para la actividad enzimática.

Se produjo una mutante de EPEC nula en el gen *rorf3*. Sin embargo, ésta tuvo efectos negativos sobre la expresión de los genes del locus y por lo tanto sobre la producción de proteínas, ya que se eliminó un sitio de unión del regulador positivo Ler.

PERSPECTIVAS

- Aislar una mutante nula de EPEC en *rorf3* y analizar su fenotipo de secreción y de biosíntesis de SST3. Realizar estudios de complementación de dicha mutante con construcciones con *rorf3*, así como con las construcciones conteniendo mutantes puntuales.
- Caracterizar la actividad de transglicosilasa lítica de rOrf3,
- Evaluar las interacciones proteína-proteína entre rOrf3 y componentes del SST3 de EPEC.

REFERENCIAS

- **Anantha R. P., Stone K. D. and Donnenberg M. S.** 2000. Effects of bfp mutations on biogenesis of functional Enteropathogenic *Escherichia coli* type IV pili. *J. Bacteriol.* 182: 2498-2506.
- **Barba J., Bustamante V. H., Flores-Valdez M. A., Deng W., Finlay B. B. and Puente J. L.** 2005. A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *J. Bacteriol.* 187:7918-7930.
- **Bayer M., Iberer R. T., Bischof K., Rassi E., Stabentheiner E., Zelling G. and Koraimann G.** 2001 Functional and mutational analysis of P19, a DNA transfer protein with muramidase activity. *J. Bacteriol.* 183:3176-3183.
- **Becktel W., J. and Baase W. A.** 1985. A lysoplate assay for *Escherichia coli* cell wall-active enzymes. *Anal Biochem.* 150:258-263.
- **Blackburn N. T. and Clarke A. J.** 2001. Identification of four families of peptidoglycan lytic transglycosylases. *J. Mol. Evol.* 52:78-84.
- **Blackburn N. T. and Clarke A. J.** 2002. Characterization of soluble and membrane-bound family 3 lytic transglycosylases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry.* 41:1001-1013.
- **Boneca I. G.** The role of peptidoglycan in pathogenesis. 2005. *Curr. Op. Microbiol.* 8:46-53.
- **Braun V., Gnrke H., Henning U. and Rehn K.** 1973. Model for the structure of the shape-maintaining layer of the *Escherichia coli* cell envelope. *J. Bacteriol.* 114:1264-1270.
- **Buist G, Kok J., Leenhouts K. J., Dabrowska, Venema G. and Haandrikman A. J.** 1995. Molecular cloning and nucleotide sequence of the gene encoding the major peptidoglycan hydrolase of *Lactococcus lactis*, a muramidase needed for cell separation. *J. Bacteriol.* 177: 1554-1563.
- **Campellone K. G. and Leong J. M.** 2003. Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H6. *Curr. Op. Microbiol.* 6:82-90.
- **Caron E., Crepin V. F., Simpson N., Knutton S., Garmendia J. and Frankel G.** 2006. Subversion of actin dynamics by EPEC and EHEC. *Curr. Op. Microbiol.* 9:40-45.
- **Cascales E. and Christie P. J.** 2003. The versatile bacterial type IV secretion system. *Nature. Rev. Microbiol.* 1:137-149
- **Chen H. D. and Frankel G.** 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 83-98.

- **Cloud-Hansen K. A., Peterson S. B., Stabb E. V., Goldman W. E., McFall-Ngai M., J. and Handelsman J.** 2006. Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interactions. *Nature Rev. Microbiol.* 4:710-716.
- **Cooper G. M.** 2000. *The Cell.* 2nd Edition. Sinauer Associates, Inc.
- **Crane J. K., McNamara B. P., and Donnenberg M. S.** 2001. Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* 3:197–211.
- **Creasey E. A., Dalahay R. M., Daniell S. J. and Frankel G.** 2003. Yeast two-hybrid survey of interactions between Lee-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol.* 149: 2093-2106.
- **Crepin V. F., Prasanna S., Shaw R. K., Wilson R. K., Creasey E., Abe C. M., Knutton S., Frankel G. and Matthews S.** 2005. Structural and functional studies of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III needle complex protein EscJ. *Mol. Microbiol.* 55:1658-1670.
- **Datsenko K. A. and Wanner B. L.** 2000. One step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS.* 97:6640-6645.
- **De la Mora F. J., Ballado T., González-Pedrajo B., Camarena L. and Dreyfus G.** 2007. The flagellar muramidase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* 189: 7998-8004.
- **Dean P. and Kenny B.** 2004. Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein. *Mol. Microbiol.* 54:665–675.
- **Dean P., Maresca M. and Kenny B.** 2005. EPEC's weapons of mass subversion. *Curr. Op. Microbiol.* 8:28-34.
- **Deng W., Puente J. L., Gruenheid S, Li YL, Vallance B. A., Vázquez A., Barba J., Ibarra J. A., O'Donnell P., Metalnikov P., Ashman K., Lee S., Goode D., Pawson T. and Finlay B. B.** 2004. Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *PNAS.* 101:3597-3602.
- **Dijkstra B. W. and Thunnissen A. M. W. H.** 1994. "Holy" proteins II: the soluble lytic transglycosylase. *Curr. Op. Struc. Biol.* 4:810-813.
- **Dijkstra A. J. and Keck W.** 1996. Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. *J. Bacteriol.* 178:5555-5562.
- **Dmitriev B., Toukach F. and Ehlers S.** 2005. Towards a comprehensive view of the bacterial cell wall. *Trends. Microbiol.* 13:69-574.
- **Donnenberg M. S., Kaper J. B. and Finlay B. B.** 1997. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol.* 3:109-114.
- **Donnenberg M. S.** 2000. Pathogenic strategies of enteric bacteria. *Nature.* 406: 768:774.

- **Elliot S. J., Wainwright L. A., McDaniel T. K., Jarvis K. G., Deng Y., Lai L. C., McNamara B. P., Donnenberg M. S. and Kaper J. B.** 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.* 28:1-4.
- **Elliot S. J., Sperandio V., Girón J. A., Shin S., Mellies J. L., Wainwright L., Hutcheson S. W., McDaniel T. K. and Kaper J. B.** 2000. A locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE and non-LEE-encoded virulence factors in Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 68: 6115-6126.
- **Fisher J. F., Meroueh S. O. and Mobashery S.** 2006. Nanomolecular and supramolecular paths toward peptidoglycan structure. *Microbe.* 1:420-427.
- **Frankel G., Phillips A. D., Rosenshine I., Dougan G., Kaper J. B. and Knutton S.** 1998. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol. Microbiol.* 30:911-921.
- **Galán J. E. and Collmer A.** 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science.* 284: 1322-1328.
- **Garmendia J., Frankel G. and Crepin V. F.** 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect. Immun.* 73:2573-2585.
- **Gauthier A. and Finlay B. B.** 1998. Protein translocation: Delivering virulence into the host cell. *Curr. Biol.* 8:768-770.
- **Gauthier A., Puente J. L. and Finlay B. B.** 2003. Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. *Infect. Immun.* 71:3310-3319.
- **Ghosh P.** 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 771-795.
- **González-Pedrajo B. y Dreyfus G.** 2003. Sistemas de secreción de proteínas en las bacterias Gram negativas: biogénesis flagelar y translocación de factores de virulencia. En: Flores Herrera O., Riveros Rosas H., Sosa Peinado A., y Vázquez Contreras E. (eds). Mensaje Bioquímico, Vol XXVII. Depto. Bioquímica, Fac. Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México. DF, México.
- **Goosney D. L., Gruenheid S. and Finlay B. B.** 2000. Gut feelings: Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) interactions with the host. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 16:173-189.
- **Hirano T., Minamino T. and Macnab R. M.** 2001. The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of Salmonella FlgJ, a flagelum-specific muramidase. *J. Mol. Biol.* 312: 359-369.
- **Höltje J. V., Mirelman D., Sharon N. and Schwarz U.** 1975. Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 124:1067-1076.
- **Höltje J. V.** 1995. From growth to autolysis: The murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* 164:243-254.

- **Höltje J. V.** 1996. Lytic transglycosylases. *EXS*. 75: 425-9.
- **Höltje J. V.** 1998. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 181-203.
- **Höppner C., Zhenying L., Domke N., Binns A. N. and Baron C.** 2004. VirB1 orthologs from *Brucella suis* and pKM101 complements defects or the lytic transglycosylase required from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 186:1415-1422.
- **Höppner C., Carle A., Sivanesan D., Hoepfner S. and Baron C.** 2005. The putative lytic transglycosylase VirB1 from *Brucella suis* interacts with the type IV secretion system core components VirB8, VirB9 and VirB11. *Microbiol.* 151:3469-3482.
- **Hueck C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 379-433.
- **Hyma E. K., Lacher D. W., Nelson A. M., Bumbaugh A. C., Janda J. M., Strockbine N. A., Young V. B. and Whittam T. S.** 2005. Evolutionary genetics of a new pathogenic *Escherichia* species: *Escherichia albertii* and related *Shigella boydii* strains. *J. Bacteriol.* 187:619-628.
- **Kaper J. B., Nataro J. P. and Mobley L. T.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature*. 2: 123-140.
- **Keep N. H., Ward J. M., Cohen-Gonsaud M. and Henderson B.** 2006. Wake up! Peptidoglycan lysis and bacterial non-growth states. *Trends. Microbiol.* 6: 271-276.
- **Kenny B.** 1999. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol. Microbiol.* 31:1229-1241.
- **Kenny B., Ellis S., Leard A. D., Warawa J., Mellor H. and Jepson M. A.** 2002. Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. *Mol. Microbiol.* 44:1095-1107.
- **Kenny B. and Jepson M.** 2000. Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria. *Cell. Microbiol.* 2:579-590.
- **Kohler P. L., Cloud K. A., Hackett K. T., Beck E. T. and Dillard J. P.** 2005. Characterization of the role of LtgB, a putative lytic transglycosylase in *N. gonorrhoeae*. *Microbiol.* 151:3081-3088.
- **Kohler P. L., Hamilton H. L., Cloud-Hansen K. and Dillard J. P.** 2007. AtIA functions as a peptidoglycan lytic transglycosylase in *Neisseria gonorrhoeae* type IV secretion system. *J. Bacteriol.* 189:5421-5428.
- **Knutton S., Lloyd D. R. and McNeish A. S.** 1987. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun.* 55:69-77.

- **Knutton S., Rosenshine I., Pallen M. J., Nisan I., Neves B. C., Bain C., Wolf C., Dougan G. and Frankel G.** 1995. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J.* 17:2166-2176.
- **Koraimann G.** 2003. Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 2371-2388.
- **Kostakioti M., Newman C. L., Thanassi D. G. and Stathopoulos C.** 2005. Mechanisms of protein export across the bacterial outer membrane. *J. Bacteriol.* 187:4306-4314.
- **Kuroki R., Yamada H., Moriyama T. and Imoto T.** 1986. Chemical mutations of the catalytic carboxyl groups in lysozyme to the corresponding amides. *J. Biol. Chem.* 261:13571-13574
- **Lee S. H. and Galán J. E.** 2004. Salmonella type III secretion-associated chaperones confer secretion-pathway specificity. *Mol. Microbiol.* 51: 483-495.
- **Lehninger A. L., Nelson D. L. and Cox M. M.** 1993. Chapter 21: Biosynthesis of aminoacids, nucleotides and related molecules. In: Principles of biochemistry. 2nd Edition. Worth Publishers. New York, N. Y.
- **Levine M. M., Bergquist E. J., Nalin D. R., Waterman D. H., Hornick R. B., Young C. R. and Sotman S.** 1978. *Escherichia coli* strains that cause diarrhea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet.* 1:1119-1122.
- **Macnab R. M.** 2004. Type III protein export and flagellar assembly. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1694: 207-217.
- **Madigan M. T., Martinko J. M. y Parker J.** 1998. Biología de los Microorganismos. Prentice Hall. Madrid.
- **Malcolm B. A., Rosenberg S., Corey M. J., Allen J., De Baetselier A. and Kirsch J. F.** 1989. Site-director mutagenesis of the catalytic residues Asp-52 and Glu-35 of chicken egg white lysozyme. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:133-137.
- **Meroueh S. O., Bencze K. Z., Heseck D., Lee M., Fisher J. F., Stemmler T. L. and Mobashery S.** 2006. Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:4404-4409.
- **Matsuzawa T., Kuwae A., Yoshida S., Sasakawa C., and Abe A.** 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* activates the RhoA signaling pathway via the stimulation of GEF-H1. *EMBO J.* 23:3570–3582.
- **McDaniel T. K., Jarvis K. G., Donnengerg M. S. and Kaper J. B.** 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92:1664-1668.
- **Mörsky P.** 1982. Turbidimetric determination of lysozyme with *Micrococcus lysodeikticus* cells: reexamination of reaction conditions. *Anal. Biochem.* 128:77-85.

- **Mushegian A. R., Fullner K. J., Koonin E. V. and Nester E. W.** 1996. A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:7321-7326.
- **Nataro J. P. and Kaper J. B.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 142-201.
- **Nambu T., Minamino T., Macnab R. M. and Kutsukake K.** 1999. Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol* 181: 1555-1561.
- **Niemann H. H., Schubert W. D. And Heinz D. W.** 2003. Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. *Microbes Infect.* 6:101-112.
- **Nougayrède J. P., Fernandes P. J. and Donnenberg M. S.** 2003. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol.* 5:359-372.
- **Nougayrède J.-P., and Donnenberg M. S.** 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. *Cell. Microbiol.* 11:1097–1111.
- **Ogino T, Ohno R., Sekiya K., Kuwae A., Matsuzawa T., Nonaka T, Fukuda H., Imahoh-Ohmi S. and Abe A.** 2006. Assembly of the type III secretion apparatus of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188:2801-2811.
- **Oliver D.** 1985. Protein secretion in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.* 39:615-648.
- **Pallen M. J., Beatson S. A. and Bailey C. M.** 2005. Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. *BMC Microbiol.* 5:9-29.
- **Paradis-Bleau C., Cloutier I., Lemieux L., Sanschagrín F., Laroche J., Auger M., Garnier A. and Levesque R. C.** 2007. Peptidoglycan lytic activity of the *Pseudomonas aeruginosa* phage Φ KZ gp144 lytic transglycosylase. *FEMS. Microbiol. Lett.* 266: 201-209
- **Phillips N., Hayward D. and Koronakis V.** 2004. Phosphorylation of the enteropathogenic *E. coli* receptor by the Src-family kinase c-Fyn triggers actin pedestal formation. *Nature.* 6:618- 625.
- **Pizarro-Cerdá J. and Cossart P.** 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell.* 124:715-727.
- **Puente J. L. and Finlay B. B.** 2001. Pathogenic *Escherichia coli*. En: Groisman E. A. (Ed.) Principles of Bacterial Pathogenesis. Academic Press. U. S. A.
- **Remaut H. and Waksman G.** 2004. Structural biology of bacterial pathogenesis. *Curr. Op. Struct. Biol.* 14:161-170.
- **Rosenshine I., Ruschkowski S., Stein M., Reinscheid D. J., Mills S. D. and Finlay B. B.** 1996. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *EMBO J.* 15:2613-2624.

- **Sekiya K., Ohishi M., Ogino T., Tamano K., Sasakawa C. and Abe A.** 2001. Supermolecular structure of the Enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *PNAS*. 98: 11638-11643.
- **Shaw R. K., Cleary J., Murphy M. S., Frankel G. and Knutton S.** 2005. Interaction of Enteropathogenic *Escherichia coli* with human intestinal mucosa: role of effector proteins in brush border remodeling and formation of attaching and effacing lesions. *Infect. Immun.* 73: 1243-1251.
- **Scheurwater E. Reid C. W. and Clarke A. J.** 2007. Lytic transglycosylases: bacterial space-making autolysins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* In press.
- **Tampakaki A. P., Fadouloglou V. E., Gazi A. D., Panopoulos N. J. and Kokkinidis M.** 2004. Conserved features of type III secretion. *Cell. Microbiol.* 6:805-816.
- **Thunnissen A. M. W. H., Dijkstra A. J., Kalk K. H., Rozeboom H. J., Engel H, Keck W. and Dijkstra B. W.** 1994. Doughnut-shaped structure of a bacterial muramidase revealed by X- ray crystallography. *Nature*. 367: 750-753.
- **Thunnissen A. M. W. H., Isaacs N. W. and Dijkstra B. W.** 1995. The catalytic domain of a bacterial lytic transglycosylase defines a novel class of lysozymes. *Proteins*. 22:245-258.
- **Torres A. G., Zhou X. and Kaper J. B.** 2005. Adherence of diarrheagenic *E. coli* strains to epithelial cells. *Infect. Immun.* 73:19-29.
- **Tu X., Nisan I., Yona C., Hanski E. and Rosenshine I.** 2003. EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 47:595–606.
- **Van Asselt E. J., Dijkstra A. J., Kalk K. H., Takacs B., Keck W. and Dijkstra B. W.** 1999a. Crystal structure of *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt35 reveals a lysozyme-like catalytic domain with an EF-hand. *Structure*. 7:1167-1180.
- **Van Asselt E. J., Thunnissen A. M. W. H. and Dijkstra B. W.** 1999b. High resolution crystal structures of the *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt70 and its complex with a peptidoglycan fragment. *J. Mol Biol.* 291:877-898.
- **Vollmer and Hötje J. V.** 2001. Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 625-633.
- **Warawa J. and Kenny B.** 2001. Phosphoserine modification of the enteropathogenic *Escherichia coli* Tir molecule is required to trigger conformational changes in Tir and efficient pedestal elongation. *Mol. Microbiol.* 42:1269-1280.
- **Wales A. D., Woodward M. J. and Pearson G. R.** 2005. Attaching-effacing bacteria in animals. *J. Comp. Pat.* 132:1-26.
- **Wilson R. K., Shaw R. K., Daniell S., Knutton S. and Frankel G.** 2001. Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* 3: 753-762.

- **Yip C. K., Kimbrough T. G., Felise H. B., Vuckovic M., Thomas N. A., Pfuetzner R. A., Frey E. A., Finlay B. B., Miller S. I. and Strynadka N. C. J.** 2005. Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature*. 435:702-707.
- **Zahl D., Wagner M., Bischof K., Bayer M., Zavec B., Beranek A., Ruckstuhl C., Zarfel G. E. and Koraimann G.** 2005. Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiol*. 151: 3455-3467.