



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

**CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LA
MURAMIDASA EtgA DEL SISTEMA DE SECRECIÓN
TIPO III DE *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

M. en C. ELIZABETH GARCÍA GÓMEZ

TUTORA:
DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO

CIUDAD UNIVERSITARIA, MÉXICO D. F. 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 (División Investigación Básica) del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la Dra. Bertha González Pedrajo. Se contó con el apoyo de los donativos IN224708 de la DGAPA, UNAM y 81847 del CONACYT; así como con la beca otorgada por CONACyT (registro 170088).

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Bertha González Pedrajo, por permitirme continuar en su grupo de trabajo, por su asesoría y paciencia constantes durante el desarrollo del proyecto. También le agradezco su apoyo, comprensión y consejos cuando más los necesité.

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

A los integrantes de mi comité tutorial: Dr. Diego González Halphen (IFC) y Dr. José Luis Puente García (Instituto de Biotecnología) por su orientación y observaciones del proyecto durante el transcurso del doctorado.

Al jurado de examen de grado: Dra María Soledad Funes Argüello, Dr. Roberto Coria Ortega (IFC), Dr. Javier Plasencia de la Parra y Dra. Herminia Loza Tavera (Facultad de Química), por las valiosas observaciones y aportaciones hechas al presente trabajo.

A la Dra. Laura Ongay y la unidad de Biología Molecular del IFC por el apoyo técnico otorgado.

La unidad de Cómputo del IFC, en particular al Ing. Juan Barbosa y a Ivette Rosas por su valiosa ayuda técnica.

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

A mis compañeros del laboratorio 325-N, por su ayuda en los experimentos y sobre todo por ser como una segunda familia durante los últimos seis años.

A Lety García (Coordinación MDCBQ), por su invaluable ayuda en cada trámite realizado, especialmente por su disposición y paciencia para resolver cualquier duda.

Agradecimientos personales

A mis papás María Elena y Gerardo, por su apoyo, paciencia y amor incondicionales en cada momento, por estar conmigo en cada error que cometí y cada logro que alcancé, por impulsarme siempre a seguir adelante y ser un ejemplo de dedicación al trabajo y a la familia. A mi hermana Ruth, por crecer conmigo, por tus porras constantes, aguantar mis ocurrencias y ser mi mejor amiga: te quiero mucho hermanita.

A mi abuelita María de Jesús y mis tías Tere y Chelito, quienes me han brindado siempre su amor, apoyo, confianza, consejos y oídos. A mi abuelito Secundino, porque a pesar del tiempo y la distancia tu cariño por mí sigue presente.

A Jesús González, por tu apoyo y amor inacabables, por escucharme siempre aunque no tengas nada que decir, por todo lo que he aprendido a tu lado y por la gran paciencia que siempre has tenido. Y por compartir conmigo el gran regalo que nos dio la vida. *Mi amor, mi cómplice y todo.*

A la familia González Márquez, por aceptarme como una hija y hermana más, por la hospitalidad, atenciones y cariño que desde un principio han tenido para mí.

A mi pollito travieso, mi pequeña Ximena, por tu cariño incondicional a pesar de pasar la mayor parte del tiempo sin mí, por esperarme siempre con los brazos abiertos y la mejor de tus sonrisas. Por que cada día crezco contigo y me recuerdas la curiosidad y la capacidad de asombro que me trajeron hasta aquí.

A las mujercitas que crecieron conmigo y son más que mis hermanas: Catita, Gaby, Lety, Monce, Pame, Pao Susy. Y a las que me han brindado su apoyo y amistad incondicionales a pesar del tiempo y la distancia: Angélica, Ara, Edna, Favy Gaby, Kary, Luz, Magali. Las quiero.

A mis tíos, primos y sobrinos de las familias Gómez González y García Pacheco, de quienes aprendí la importancia de una familia unida, por su cariño e interés por mí a lo largo de toda mi vida.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Infección por EPEC	5
Adherencia inicial	5
Secreción de efectores y transducción de señales	6
Adherencia íntima y formación de pedestal	11
Locus de esfacelamiento enterocítico	13
Sistema de secreción tipo III	16
Sistema de secreción tipo III de EPEC	20
Penetración de la pared celular durante el ensamblaje del sistema de secreción tipo III	24
Pared celular	24
Metabolismo de la pared celular	26
ANTECEDENTES	29
Transglicosilasas líficas	29
Transglicosilasas líficas asociadas a sistemas de secreción y bacteriófagos	31
Transglicosilasas líficas asociadas al sistema de secreción tipo III de virulencia	31
Muramidasa del sistema de secreción tipo III flagelar	33
Transglicosilasas líficas asociadas al sistema de secreción tipo IV	34
Transglicosilasas líficas asociadas con el pilus tipo IV	35
Transglicosilasas líficas de bacteriófagos	36
ANTECEDENTES EXPERIMENTALES	38
JUSTIFICACIÓN	40
HIPÓTESIS	40
OBJETIVOS	41
MATERIAL Y MÉTODOS	42
Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	42
Generación de construcciones plasmídicas	43
Mutagénesis sitio-dirigida de residuos conservados	46

Generación de mutantes nulas en <i>etgA</i>	47
Purificación de MBP-EtgAns	47
Análisis de actividad de muramidasa por zimogramas	48
Inmunodetección de proteínas	48
Detección de EtgA en EPEC	49
Purificación de periplasma de EPEC	49
Determinación del efecto de la sobreproducción de EtgA en cultivos de EPEC	50
Secreción de proteínas del sistema de secreción tipo III	51
Ensayo de hemólisis dependiente del sistema de secreción tipo III	52
Purificación de filamentos EspA	53
RESULTADOS	54
Actividad de muramidasa de la proteína recombinante MBP-EtgAns	54
Procesamiento de la secuencia señal de EtgA	55
Localización periplásmica de EtgA	58
Efecto de la sobreproducción de EtgA en EPEC	59
Efecto de mutaciones en residuos altamente conservados de los motivos GLMQ y AYNAG sobre la actividad de EtgA	65
Generación de la mutante $\Delta etgA$ en EPEC y caracterización de su fenotipo de secreción de proteínas	68
Capacidad de hemólisis de la mutante $\Delta etgA::kanr$	78
Purificación de filamentos EspA de la mutante $\Delta etgA::kanr$	79
Fenotipo de secreción de proteínas de la mutante <i>etgA::kanr</i> EAF-	80
Complementación heteróloga de una mutante $\Delta etgA$ en <i>Citrobacter rodentium</i>	82
DISCUSIÓN	84
CONCLUSIONES	99
PERSPECTIVAS	100
REFERENCIAS	102
ANEXO	112

ABREVIATURAS

A/E	Adherencia y esfacelamiento
Arp2/3	<i>Actin-related protein 2/3</i>
BFP	<i>Bundle forming pilus</i>
BSA	Albúmina sérica bovina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EAF	<i>EPEC adherence factor</i>
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
Esp	<i>EPEC secreted protein</i>
GlcNAc	N-acetilglucosamina
GrlA	<i>Global regulator of Ler Activator</i>
GrlR	<i>Global regulator of Ler Repressor</i>
LB	Luria-Bertani
LEE	Locus de esfacelamiento enterocítico
Ler	<i>LEE encoded regulador</i>
m-A ₂ pm	Ácido meso-diaminopimélico
Map	<i>Mitochondrial associated protein</i>
MBP	Proteína de unión a maltosa
MurNAc	Ácido N-acetilmurámico
Nle	<i>Non-LEE encoded effector</i>
N-WASP	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
PBP	Proteína de unión a penicilina
Per	<i>Plasmid-encoded regulator</i>
SST3	Sistema de secreción tipo III
SST4	Sistema de secreción tipo IV
Tir	<i>Translocated intimin receptor</i>
TL	Transglicosilasa lífica
UFC	Unidades formadoras de colonia

RESUMEN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) causa diarrea aguda en niños de países en vías de desarrollo. Durante el proceso de infección EPEC utiliza un sistema de secreción tipo III (SST3 o inyectisoma) para translocar proteínas efectoras directamente al citoplasma de la célula hospedero, en donde alteran las vías de señalización celular. Los genes necesarios para la formación del SST3 y la virulencia de EPEC se agrupan en la isla de patogenicidad cromosomal denominada locus de esfacelamiento enterocítico (LEE). Para su ensamblaje el SST3 requiere atravesar la envoltura celular, para lo que es necesaria la apertura de la capa de peptidoglicano. Este proceso se lleva a cabo por enzimas denominadas transglicosilasas líticas (TLs) especializadas. En la isla LEE se localiza el gen *etgA*, que codifica una proteína con similitud a TLs de distintos sistemas de secreción. Previamente se determinó que *EtgA* posee una secuencia señal en su extremo amino y en el presente estudio comprobamos el transporte de *EtgA* al periplasma y que éste es independiente del SST3. También se observó que la sobreproducción de *EtgA* produce una inhibición en el crecimiento bacteriano y lisis celular, para lo cual son indispensables el transporte al periplasma y el residuo glutamato catalítico. Para evaluar la participación de *EtgA* en la biogénesis del SST3 se generó una mutante nula en (*etgA::kanr*), que presentó una reducción en la secreción de proteínas por el SST3 y en su capacidad de hemólisis, lo que está relacionado con una reducción en el número de inyectisomas ensamblados. Al determinarse que la proteína *BfpH*, codificada en el plásmido EAF de EPEC no sustituye funcionalmente a *EtgA* se propuso que la atenuación de estos fenotipos no se debe a redundancia entre TLs. En conjunto los resultados obtenidos indican que la actividad de muramidasa de *EtgA* no es indispensable para el ensamblaje del SST3, sin embargo sí hace que este proceso sea más eficiente.

ABSTRACT

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) causes acute infantile diarrhea in developing countries. During its infection EPEC utilizes a type III secretion system (T3SS or injectisome) to translocate effector proteins directly into the host cells, subverting different signaling transduction pathways. All of the proteins required for T3SS formation and EPEC virulence are encoded within a chromosomal pathogenicity island called the locus of enterocyte effacement (LEE). During its biosynthesis, the T3SS has to traverse the physical barrier imposed by the peptidoglycan layer. To accomplish this task dedicated enzymes named specialized lytic transglycosylases (LTs) are employed. A LEE encoded protein called EtgA shares similarity with LTs associated to secretion systems. Previously, the existence of a signal sequence was predicted in EtgA. In this study, the periplasmic localization of EtgA was determined, and it was shown that this transport is independent of the T3SS. Overproduction of EtgA causes a growth rate inhibition and lysis of EPEC cultures. To observe these effects, the transport of EtgA to the periplasm and the catalytic glutamate residue were indispensable. Additionally, an *etgA* null mutant strain ($\Delta etgA::kanr$) was generated to evaluate the role of EtgA in T3SS assembly. We observed that secretion of proteins through the T3SS and the hemolytic capacity were reduced in the $\Delta etgA::kanr$ mutant. This attenuation was related with a reduction in the amount of fully assembled injectisomes. Furthermore, the attenuated phenotypes in the $\Delta etgA::kanr$ mutant were not attributed to functional redundancy among LTs, since BfpH, a LT homologue encoded in the EAF plasmid, was not able to functionally replace EtgA. Overall, these results indicate that EtgA is not indispensable for T3SS assembly in EPEC, but it is required to make the process efficient.

INTRODUCCIÓN

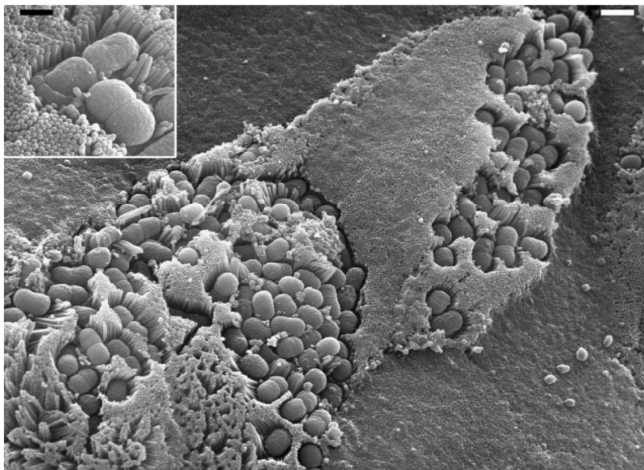
Entre las especies predominantes de la microbiota del ser humano, *Escherichia coli* desempeña un papel importante en el mantenimiento de la fisiología intestinal. Sin embargo, existen patovares implicados en infecciones del tracto urinario, sepsis, meningitis e infecciones gastro-intestinales. Entre éstos se encuentra *E. coli* enteropatógena (EPEC por sus siglas en inglés) (Chen y Frankel 2005).

EPEC es causante de diarrea potencialmente fatal en niños menores de dos años en países en vías de desarrollo. La diarrea producida por EPEC es aguda y a menudo se acompaña de otros síntomas como vómito y fiebre (Nataro y Kaper 1998; Kaper et al. 2004).

EPEC pertenece a una familia de patógenos que producen una histopatología denominada lesión de adherencia y esfacelamiento (A/E) en células del epitelio intestinal (Moon et al. 1983). La lesión A/E se caracteriza por la eliminación de las microvellosidades y la adherencia íntima entre la bacteria y la membrana del enterocito (Figura 1a) (Nataro y Kaper 1998).

En células epiteliales infectadas, EPEC produce profundas alteraciones del citoesqueleto y la acumulación de filamentos de actina por debajo del sitio en el que se adhiere la bacteria, lo que conduce a la formación de estructuras tipo pedestal ricas en actina (Figura 1b) (Rosenshine et al. 1996).

(a)



(b)

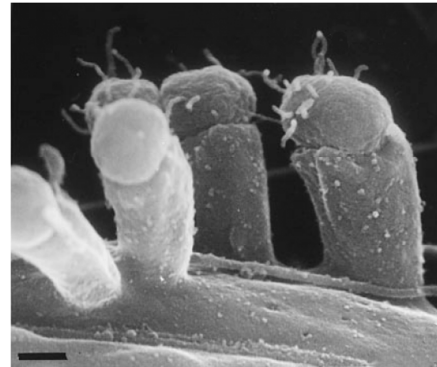


Figura 1. **Lesión A/E producida por EPEC.** (a). Fotografía de microscopía electrónica que muestra mucosa duodenal infectada por EPEC. Barra: 0.5 μm . En el recuadro se muestra un acercamiento en el que se observan algunas bacterias adheridas al epitelio y la eliminación de las microvellosidades (barra: 0.2 μm). Tomada de (Shaw et al. 2005). (b) Fotografía de microscopía electrónica que muestra la formación de pedestales en células HEL infectadas por EPEC. El pedestal se forma debajo del sitio de unión de la bacteria a la célula epitelial. Barra: 0.25 μm . Tomada de (Knutton et al. 1998).

Los otros patógenos que producen la lesión A/E son *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), el patógeno de ratones *Citrobacter rodentium* y la recientemente identificada *Escherichia alberti* (antes *Hafnia alvei*), bacteria asociada con diarrea en humanos (Croxen y Finlay 2010).

Todos los factores necesarios para la formación de la lesión A/E se encuentran codificados en una isla de patogenicidad cromosomal denominada locus de esfacelamiento enterocítico (LEE) (McDaniel et al. 1995). El locus LEE codifica los componentes de un sistema de secreción tipo III (SST3), reguladores transcripcionales, reguladores de secreción, chaperonas y proteínas efectoras (también llamadas efectores) (Jarvis et al. 1995; Elliott et al. 1998).

Infección por EPEC

Adherencia inicial. Un paso crítico para la colonización del intestino durante las infecciones diarreicas es la adhesión del microorganismo a la superficie del hospedero (Torres et al. 2005). La adherencia inicial de EPEC a los enterocitos del intestino delgado se produce por una fimbria o pilus tipo IV denominado *Bundle-forming pilus* (BFP), por su tendencia a formar trenzas o cordones (Figura 2). BFP permite a su vez la interacción de una bacteria con otra para formar microcolonias en un patrón definido denominado adherencia localizada (LA, por sus siglas en inglés) (Scaletsky et al. 1984; Giron et al. 1991). La fimbria BFP interactúa con receptores que contienen N-acetil-lactosamina sobre la superficie de la célula hospedero (Hyland et al. 2008).

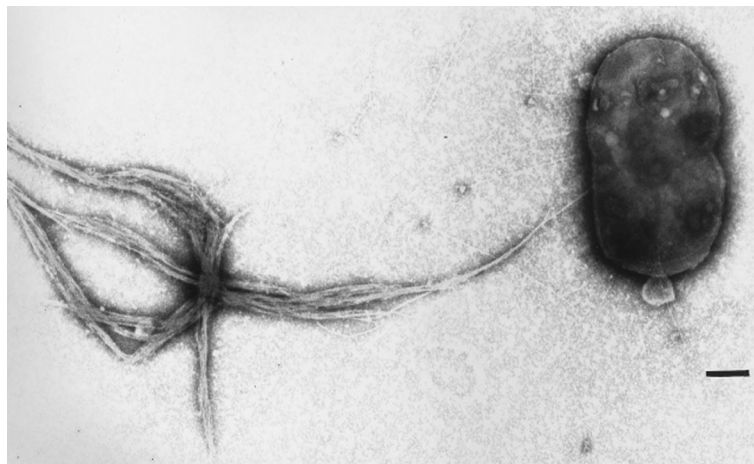


Figura 2. **Pilus BFP de EPEC.** Fotografía de microscopía electrónica mostrando la fimbria BFP producida por EPEC E2348/69. Barra: 0.35 μ m. Tomada de (Giron et al. 1995).

Los componentes del pilus BFP están codificados en un plásmido de virulencia de 95 kDa denominado EAF (por sus siglas en inglés, *EPEC adherence factor*) (Donnenberg et al. 1992). Un grupo de 14 genes de este plásmido, agrupados en el operón *bfp*, son suficientes para la biogénesis del pilus y para la exhibición del fenotipo LA. Entre estos genes se encuentra *bfpA* que codifica la subunidad principal de la porción extracelular del pilus. BfpA, también llamada pilina, que al

polimerizarse da lugar a los filamentos delgados mediante los que la bacteria se adhiere (Stone et al. 1996; Anantha et al. 2000).

La formación del pilus BFP se regula a nivel transcripcional en respuesta a las condiciones ambientales, fuentes de carbono y fase de crecimiento. La expresión de los genes *bfp* ocurre eficientemente a 37° C durante la fase exponencial de crecimiento, en medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, utilizado comúnmente para cultivos de células eucariontes) y en presencia de glucosa, mientras que se reprime en presencia de amonio (Puente et al. 1996; Mellies et al. 2007). En el plásmido EAF se localiza también el operón *perABC* (*plasmid-encoded regulator*) que codifica activadores transcripcionales de los genes *bfp*; entre éstos PerA se une directamente a las secuencias regulatorias que se encuentran río arriba de *bfpA* (Puente et al. 1996; Tobe et al. 1996).

En general, las cepas de EPEC se clasifican en: cepas típicas, cuando poseen el plásmido EAF y presentan el fenotipo LA; y cepas atípicas cuando no lo poseen. Sin embargo, se ha reportado que además de BFP, otras estructuras fimbriales, adhesinas e incluso el flagelo podrían participar en la adhesión de EPEC al hospedero (Chen y Frankel 2005).

Secreción de efectores y transducción de señales. Una vez que EPEC entra en contacto con el enterocito se produce la secreción de proteínas a través del SST3 de virulencia o inyectisoma. El SST3 es una vía de secreción (ver descripción en sección Sistema de secreción tipo III) que se utiliza para la translocación o inyección de proteínas efectoras directamente al citoplasma de la célula hospedero, en donde alteran diversas vías de señalización celular (Hueck 1998). Los efectores de EPEC tienen más de una función, e incluso éstas se sobrelapan, lo que se conoce como redundancia funcional (Dean y Kenny 2009).

En total, EPEC E2348/69 codifica 21 efectores, de los cuales 7 son codificados en la isla LEE. Los efectores codificados en LEE son EspB (*EPEC secreted protein B*), EspF, EspG, EspH, EspZ, Map (*Mitochondrial associated protein*) y Tir (*Translocated intimin receptor*); mientras que efectores como EspJ, EspG2, NleA (*non-LEE encoded effector*), NleB, NleC, NleD, NleE y NleH se encuentran codificados en profagos y elementos de integración en otras islas cromosomales (Iguchi et al. 2009).

Los procesos celulares afectados por los efectores inducen la reorganización de proteínas del citoesqueleto, lo que conduce a la retracción y pérdida de las microvellosidades del epitelio intestinal, la formación del pedestal, la modulación de la respuesta inmune y la producción de diarrea (Croxen y Finlay 2010).

La reorganización del citoesqueleto involucra tanto la despolimerización como la polimerización de sus componentes. En la etapa inicial de la infección por EPEC se forman extensiones tipo filopodio en el sitio de adhesión bacteriana de manera dependiente de Map, que actúa como factor de intercambio de guanina de la proteína de unión a GTP Cdc42. En cambio, la retracción y desaparición de los filopodios depende de Tir y EspH, que posiblemente inhiben a Cdc42 a través de la activación de GTPasas. En el caso de EspH la inhibición de Cdc42 también modula la cinética de ensamblaje y morfología de los pedestales (Tu et al. 2003; Berger et al. 2009).

Por otro lado, Tir, EspF, EspH y Map provocan el esfacelamiento de las microvellosidades al inducir la disgregación y relocalización de sus componentes (Shaw et al. 2005; Dean et al. 2006). EspG y EspG2 (homólogo de EspG codificado fuera del LEE), también participan en la eliminación de las microvellosidades al inducir la destrucción de las redes de microtúbulos localizados debajo del sitio de adhesión de la

bacteria, lo que conduce a la liberación del factor de intercambio de guanina GEF-H1, que a su vez activa la vía de señalización RhoA-ROCK que desencadena la formación de fibras tensas de actina (Matsuzawa et al. 2004; Shaw et al. 2005).

También se ha demostrado una alteración en la arquitectura de la red de filamentos intermedios, incluso algunas de las proteínas que los forman, citoqueratina 8 y citoqueratina 18, se reclutan en los pedestales, en este proceso participan EspF y Tir (Batchelor et al. 2004; Viswanathan et al. 2004).

EspB también participa en la reorganización del citoesqueleto, al desestabilizar el complejo E-cadherina/ β -catenina/ α -catenina que conforma las uniones adherentes (involucradas en el contacto célula-célula y en la morfología del citoesqueleto). Esta desestabilización se lleva a cabo a través de la interacción de EspB con α -catenina, la que a su vez se relocaliza al interactuar con los filamentos de actina que se acumulan debajo del sitio de adhesión bacteriana (Hamada et al. 2010).

El evento más importante de la alteración del citoesqueleto es la acumulación masiva de la actina del hospedero, lo que da lugar a la formación de los pedestales, proceso en el que participa Tir iniciando una cascada de eventos de señalización a través de su fosforilación en un residuo de tirosina (Garmendia et al. 2005). Este proceso se describirá con mayor detalle en la sección Adherencia íntima y formación de pedestal.

La mitocondria también se ve afectada por la actividad de los efectores Map y EspF. Map altera el potencial de membrana y la estructura mitocondrial induciendo malformaciones y estallamiento de este organelo (Ma et al. 2006; Papatheodorou et al. 2006), mientras que

EspF activa la vía de muerte mitocondrial vía la liberación de citocromo c (Nougayrede y Donnenberg 2004; Nagai et al. 2005). Otro organelo afectado es el retículo endoplasmático, a través de la actividad de NleA, que afecta el tráfico de proteínas hacia el aparato de Golgi (Kim et al. 2007).

La diarrea inducida por EPEC es un proceso multifactorial en el que participa la pérdida de superficie de absorción epitelial, alteraciones en el transporte de iones, un incremento en la permeabilidad paracelular, disminución de la resistencia transepitelial e inflamación intestinal (Kaper et al. 2004; Viswanathan et al. 2009).

En general, la diarrea es resultado de un desbalance entre la absorción y la secreción de iones a través del epitelio, seguido por la salida de agua (Viswanathan et al. 2009). EPEC reduce los niveles del intercambiador de Cl^-/OH^- (DRA, *downregulated in adenoma*) en la superficie celular, inhibiendo la absorción de iones Cl^- . La internalización de DRA se ha atribuido a la degradación de los microtúbulos por la acción de EspG y EspG2 (Gill et al. 2007). Adicionalmente, EspF inhibe la absorción de Na^+ , por medio de la inactivación de los intercambiadores de Na^+/H^+ (NHE, *Na⁺/H⁺ exchanger*) (Hodges et al. 2008). Otra ruta de absorción de Na^+ que se altera es la del cotransportador de $\text{Na}^+/\text{glucosa}$ SGLT1 (*sodium-D-glucose cotransporter*), debido a la disminución que ocurre de la superficie epitelial como resultado de la eliminación de las microvellosidades y a la internalización en vesículas de dicho cotransportador. Esta alteración es dependiente de los efectores Tir, EspF y Map (Dean et al. 2006). Por otro lado, se ha hecho una correlación entre la internalización de las acuaporinas (canales de agua) AQP2 y AQP3 y la producción de diarrea, lo que posiblemente cause una reducción en la absorción de agua; esta relocalización en el citoplasma eucarionte es parcialmente dependiente de EspF y EspG, sin

embargo, no se han identificado otros efectores que podrían también estar involucrados (Guttman et al. 2007).

EPEC, como otros patógenos, induce una respuesta inflamatoria en el hospedero a través de los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Esto induce la activación de NF κ B (factor nuclear κ B), que se transloca al núcleo donde activa la transcripción del gen que codifica la interleucina 8 (IL-8). IL-8 es un quimioatrayente que estimula el reclutamiento y la trans migración de células polimorfonucleares (neutrófilos y leucocitos) en el lumen intestinal, donde liberan 5'AMP (Adenosín-5'-monofosfato), el cual es convertido en adenosina, la que interactúa con receptores A2b, induciendo la producción AMP cíclico. El AMPc activa el canal CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), induciendo la secreción de Cl⁻ (Savkovic et al. 1997; Goosney et al. 2000; Viswanathan et al. 2009).

La alteración de la función de barrera del epitelio intestinal, que se requiere para mantener los gradientes electroquímicos en el transporte transcelular, es otro mecanismo relacionado con la diarrea. La función de barrera es proporcionada por las uniones estrechas a través de su interacción con anillos contráctiles de miosina. EPEC estimula la apertura de las uniones estrechas y la salida de agua, por medio de la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina (MLC), la cual a su vez es resultado de la activación de la cinasa MLCK a través de un incremento en los niveles de Ca²⁺ intracelular ocasionado por los efectores translocados (Viswanathan et al. 2009). La alteración de la función de barrera de las uniones estrechas también involucra la redistribución de las proteínas que las conforman. Durante la infección por EPEC, por medio de la participación de EspF, la ocludina y ZO1 (*zonula occludens*) se desfosforilan, cambiando su localización de las uniones estrechas al citoplasma, provocando la salida de iones al lumen intestinal (McNamara et al. 2001; Dean y Kenny 2004; Viswanathan et al. 2009;

Zhang et al. 2009). Otros efectores involucrados en la alteración de la estructura de las uniones estrechas son Map y NleA (Dean y Kenny 2004; Thanabalasuriar et al. 2010).

Adherencia íntima y formación de pedestal. Tir, uno de los efectores translocados al citoplasma del enterocito por el SST3, se considera como el único absolutamente esencial para la formación del pedestal de actina (Rottner et al. 2005).

Una vez que es translocado, Tir se ancla en la membrana del hospedero a través de dos dominios transmembranales. Los extremos amino y carboxilo de Tir se localizan en el citoplasma eucarionte, mientras que su dominio central permanece extracelular. Este dominio interactúa con una adhesina de la membrana externa de EPEC denominada intimina (Figura 3). La interacción Tir-intimina permite que la bacteria se ancle firmemente al enterocito, lo que se conoce como adherencia íntima. De esta manera, la bacteria inyecta a la célula eucarionte lo que será su propio receptor (Kenny et al. 1997; de Grado et al. 1999; Hartland et al. 1999). La unión de Tir con intimina promueve el reclutamiento de Tir debajo de la bacteria adherida, formando una estructura reticular que se propone proporciona el soporte físico necesario para la acumulación de actina y permite desencadenar los eventos de señalización celular (Campellone et al. 2004; Touze et al. 2004).

Tir se fosforila en el residuo Y474, localizado en su región carboxilo (Kenny 1999), por las cinasas de tirosina del hospedero c-Fyn, Abl, Arg y Etk (Phillips et al. 2004; Swimm et al. 2004; Bommarius et al. 2007). La fosforilación de Tir en este residuo es un evento crítico para la acumulación de actina, ya que induce el reclutamiento directo de la proteína adaptadora del hospedero Nck, que estimula a la proteína N-WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*), la que a su vez activa al complejo heptamérico de nucleación de actina Arp2/3 (*Actin-related*

protein 2/3), que induce la polimerización y ramificación de filamentos de actina y en consecuencia la formación del pedestal (Figura 3) (Kalman et al. 1999; Gruenheid et al. 2001).

Además de fosforilarse en el residuo Y474, Tir también se fosforila en los residuos S434 y S463, lo que induce cambios conformacionales en la estructura de Tir y se ha sugerido que éstos podrían proveer la energía necesaria para la inserción de Tir en la membrana plasmática del hospedero (Warawa y Kenny 2001). Sin embargo, se ha visto que Tir es capaz de insertarse en la membrana de eritrocitos aún sin sufrir fosforilación (Shaw et al. 2002). Por otra parte, en un experimento *ex vivo* (en cultivos de órganos *in vitro*) se demostró que EPEC con un cambio Y474F en Tir, y por tanto deficiente en el reclutamiento de Nck, es capaz de producir lesiones A/E. Esto se atribuye a una probable capacidad de EPEC de formar pedestales de manera independiente de Nck, pero con la participación de N-WASP (Schuller et al. 2007).

Tir interactúa a través de su extremo amino con otros componentes del citoesqueleto como α -actinina, talina y vinculina. También se ha encontrado que los pedestales contienen ezrina, CD44, calpactina, cortactina, gelsolina, tropomiosina, vinculina y cadenas ligeras de miosina, aunque el reclutamiento de estas proteínas es independiente de Tir y no es esencial para la formación del pedestal (Garmendia et al. 2005; Bhavsar et al. 2007).

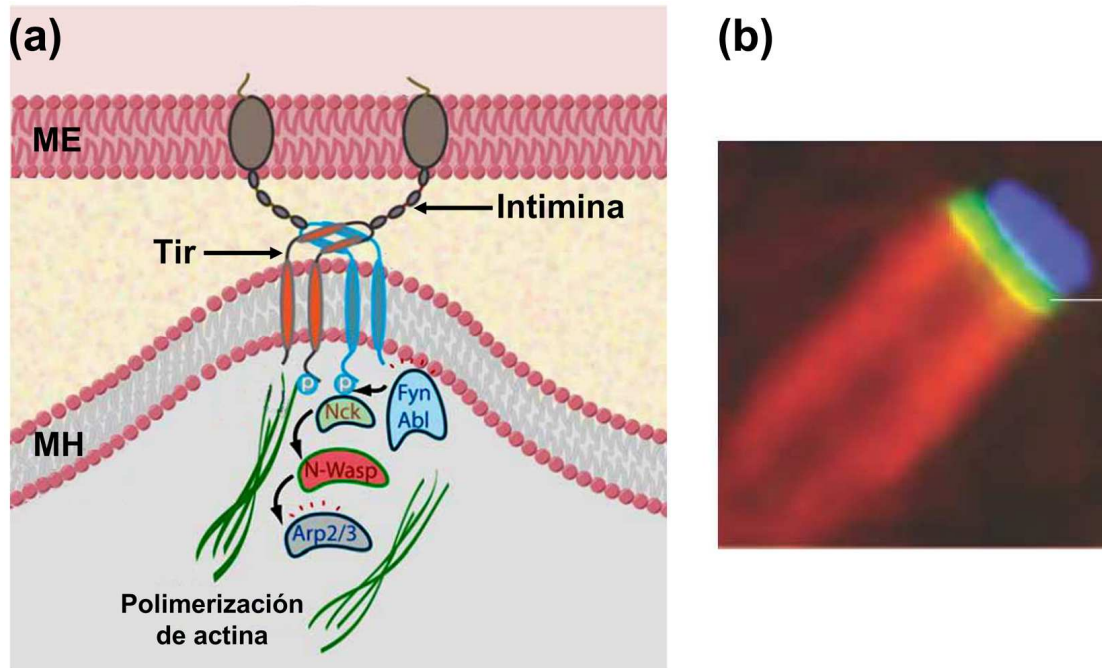


Figura 3: **Adherencia íntima y formación de pedestal.** (a) Interacción Tir-intimina. EPEC a través del SST3 transloca el efector Tir al citoplasma del enterocito. Tir se inserta en la membrana del hospedero y funciona como receptor para la adhesina intimina, dando lugar a la adherencia íntima entre la bacteria y el enterocito. Por otra parte, Tir se fosforila por cinasas del hospedero, se recluta la proteína adaptadora del hospedero Nck, ésta activa a N-WASP, que a su vez activa al complejo Arp2/3. La actina se polimeriza debajo del sitio de adherencia de la bacteria, originando una estructura en forma de pedestal. Ver detalles en el texto. ME: membrana externa de EPEC, MH: membrana del hospedero. Tomada de (Pizarro-Cerda y Cossart 2006). (b) Pedestal de actina. Fotografía de microscopía de fluorescencia que presenta un pedestal formado por EPEC en células eucariotes. La tinción con inmunofluorescencia muestra a la bacteria en azul, a Tir en verde y a la F-actina de la célula hospedero en rojo. Tomada de (Hayward et al. 2006)

Locus de esfacelamiento enterocítico

El locus de esfacelamiento enterocítico (LEE) es una isla de patogenicidad cromosomal de 35.6 kb responsable de la producción del fenotipo A/E. Al ser clonada y transferida a una cepa no patógena de *E. coli*, ésta es capaz de producir la histopatología mencionada. Probablemente el LEE de EPEC se adquirió mediante transferencia

horizontal, ya que su contenido de G+C es más bajo que el del cromosoma de *E. coli* (McDaniel et al. 1995; McDaniel y Kaper 1997) .

El LEE de EPEC (cepa E2348/69, serotipo O127:H6) contiene 41 genes, organizados en 5 operones policistrónicos (LEE1 a LEE5), dos operones bicistrónicos (*rorf1-espG* y *grlR-grlA*) y 4 unidades transcripcionales (*etgA*, *map*, *cesF* y *escD*) (Figura 4) (Elliott et al. 1998; Barba et al. 2005). Como se mencionó, en este locus se encuentran codificados los componentes del SST3, efectores, chaperonas, la adhesina intimina, reguladores transcripcionales y reguladores de secreción. Asimismo, existen genes que codifican proteínas cuya función aún se desconoce.

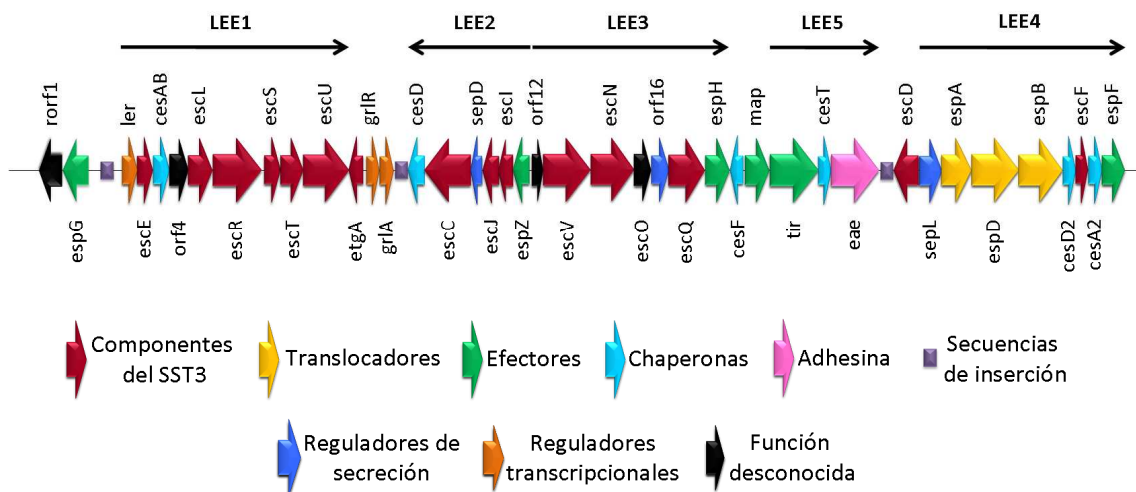


Figura 4. **Representación del LEE de EPEC.** Se muestran los genes organizados principalmente en 5 operones policistrónicos (LEE1 a LEE5), y se clasifican en distintos colores de acuerdo a la función de la proteína codificada por cada uno. Elaborada por Romo-Castillo M.

La expresión de los genes del LEE requiere de la proteína Ler (*LEE-encoded regulator*), codificada por el primer gen del operón LEE1. Ler tiene similitud con el regulador global H-NS (*histone-like nucleoid structuring protein*; 36% de identidad, 55% de similitud), una proteína de unión a ADN involucrada en la regulación negativa de múltiples genes y

que funciona induciendo plegamientos en el ADN que evitan el reconocimiento de promotores por la ARN polimerasa. Ler se requiere para contrarrestar la represión inducida por H-NS sobre los promotores de los operones LEE2 a LEE5, lo que logra al unirse a las regiones regulatorias de estos operones y alterar los complejos nucleoproteicos que forma H-NS. Esta activación se produce a 37°C en medio DMEM, durante la fase exponencial de crecimiento bacteriano (Mellies et al. 1999; Elliott et al. 2000; Sperandio et al. 2000; Bustamante et al. 2001; Sanchez-SanMartin et al. 2001; Haack et al. 2003; Barba et al. 2005). Además de regular la expresión de los genes del LEE, Ler se requiere para la expresión de genes localizados en otras islas de patogenicidad, como *espC*, que codifica una serín-proteasa autotransportadora con efectos enterotóxicos en células epiteliales (Elliott et al. 2000; Navarro-García et al. 2010).

A su vez, *ler* se regula positivamente por GrlA (*Global regulator of Ler Activator*), proteína codificada en LEE que posee un dominio de unión a ADN hélice-vuelta-hélice (HTH) y funciona como un antagonista de H-NS en el promotor de *ler*. Ler y GrlA forman un circuito de regulación positiva en el que Ler activa al operón *grlRA*, que también es reprimido por H-NS; y GrlA a su vez activa a *ler*, lo cual asegura el mantenimiento de una respuesta transcripcional apropiada de manera espacial y temporal (Barba et al. 2005; Jimenez et al. 2010). Otro de los reguladores positivos de *ler* es PerC, codificado por el operón *per* del plásmido EAF y que se une a la región reguladora de *ler*, siendo capaz de contrarrestar la represión ejercida por H-NS (Mellies et al. 1999; Bustamante et al. 2001; Bustamante et al. No publicado).

Respecto a las condiciones de activación de *ler* a través de PerC y GrlA, se ha observado que la activación de *ler* cuando EPEC se cultiva en condiciones estáticas bajo una atmósfera de CO₂ 5% se da a través de PerC, por lo que una cepa de EPEC curada del plásmido EAF (EAF-) no

es capaz de producir proteínas del SST3 en estas condiciones; por el contrario, en condiciones de agitación la activación de *ler* ocurre a través de GrlA, por lo que una cepa EAF- cultivada en agitación puede producir y secretar proteínas del SST3 (Bustamante et al. No publicado).

Otro regulador positivo de *ler* es el regulador global IHF (*integration host factor*), una proteína de unión a ADN que favorece la formación de complejos nucleoproteicos con la ARN polimerasa. IHF se une directamente a la región promotora de LEE1 y actúa en una forma coordinada con GrlA o con PerC, dependiendo de la condición en que se cultive EPEC (Friedberg et al. 1999; Bustamante et al. No publicado). Además de IHF, otros factores que regulan positivamente a *ler* son Fis (*factor for inversion stimulation*), la GTPasa BipA, así como la proteína QseA (*Quorum-Sensing E. coli regulator A*) (Mellies et al. 2007).

ler se regula negativamente por GrlR (*Global regulator of Ler Repressor*), que posiblemente actúa reprimiendo la expresión al interactuar con GrlA y prevenir su unión con el promotor de *ler* (Deng et al. 2004; Lio y Syu 2004; Jobichen et al. 2007). Por otro lado, Ler también funciona como autorepresor, al inhibir la expresión de LEE1 en una manera dependiente de su concentración, uniéndose a su región promotora (Berdichevsky et al. 2005).

Sistema de secreción tipo III

El sistema de secreción tipo III (SST3) es una estructura macromolecular que atraviesa las dos membranas bacterianas y el espacio periplásmico. El inyectisoma es utilizado por las bacterias Gram negativas para translocar proteínas desde su citoplasma directamente hasta el citoplasma de las células hospederas (Hueck 1998). Se encuentra tanto en bacterias patógenas de plantas y animales como

en bacterias simbiotes, estando presente en organismos como: *Bordetella bronchiseptica*, *Chlamydia trachomatis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. syringae*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia* spp., *Erwinia* spp., *Photobacterium luminescens*, *Sodalis glossinidius*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizobium* spp. y *Xanthomonas* spp. (Hueck 1998; Tampakaki et al. 2004).

La estructura del inyectisoma consiste de dos partes principales: una base cilíndrica o cuerpo basal compuesto de varios anillos que atraviesan las membranas interna y externa bacterianas, conectados por medio de un eje, y una estructura extracelular rígida, alargada y hueca denominada aguja (Figura 5a). A través de estas estructuras se forma un canal continuo por el cual se transportan los efectores desde el patógeno hasta el hospedero (Tampakaki et al. 2004). Un grupo de tres proteínas (dos hidrofóbicas y una hidrofílica) llamadas translocadores, se secretan a través del SST3 y se encargan de la formación de un poro en la membrana de la célula eucarionte, necesario para la translocación de efectores (Mueller et al. 2008).

El SST3 también se utiliza para la biogénesis del flagelo. El flagelo es un complejo macromolecular utilizado por las bacterias para desplazarse. Está integrado principalmente por tres componentes que son el cuerpo basal, el gancho y el filamento. El cuerpo basal está formado por un anillo de membrana interna, un anillo asociado con la capa de peptidoglicano, un anillo de membrana externa, un eje periplásmico y un aparato de exportación (Chevance y Hughes 2008). Ocho proteínas que componen el SST3 de virulencia presentan una alta similitud con los componentes del cuerpo basal flagelar (Figura 5b) (Tampakaki et al. 2004). Este grupo de proteínas conservadas integran el aparato de secreción (equivalente al aparato de exportación flagelar), cuyos componentes se insertan o asocian a la membrana interna y son necesarios para el reconocimiento y secreción de los sustratos (Galan y

Wolf-Watz 2006). Entre estas proteínas se encuentra una ATPasa, cuya actividad es necesaria para la secreción de proteínas a través del SST3 (Cornelis 2006).

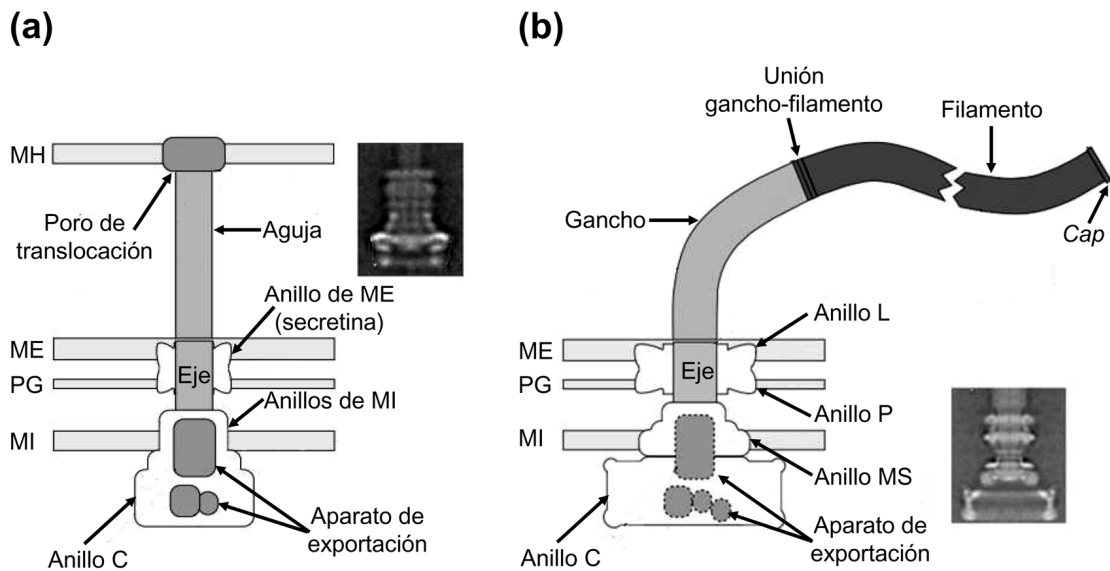


Figura 5. **Sistema de secreción tipo III.** Se muestra una representación esquemática del SST3 y se indican sus principales componentes. (a) SST3 de virulencia o inyectisoma. Se muestran las estructuras del cuerpo basal, la aguja y el poro de translocación. (b) SST3 flagelar. Se muestran las estructuras del cuerpo basal, gancho y filamento. Los recuadros en cada inciso corresponden a una reconstrucción a partir de fotografías de microscopía electrónica de cuerpos basales de inyectisoma y flagelo purificados de *Salmonella enterica*. ME: membrana externa, MI: membrana interna, PG: peptidoglicano y MH: membrana de célula hospedadora. Tomada de (Erhardt et al. 2010).

El ensamblaje del inyectisoma es un proceso secuencial. Primero se ensamblan los componentes membranales, algunos de los cuales poseen una secuencia señal o péptido líder dependiente de la translocasa Sec (Galan y Wolf-Watz 2006). Sec, conocida también como vía general de secreción, es una vía para el transporte de proteínas a través de la membrana citoplásmica y en algunos casos para su inserción en dicha membrana (Driessen y Nouwen 2008). En el siguiente paso se ensamblan el eje y la aguja, proceso que es independiente de

Sec y ocurre a través del aparato de secreción del SST3. Cuando la aguja alcanza un tamaño definido se produce un cambio en la especificidad de secreción de sustratos, y el sistema se torna competente para la secreción de efectores (Galan y Wolf-Watz 2006). Existen dos propuestas de la biogénesis del SST3, en una de ellas se sugiere que el ensamblaje de los componentes de la base conduce al reclutamiento de las proteínas del aparato de secreción (Diepold et al. 2010); sin embargo, en la segunda se demostró que el aparato de secreción puede ensamblarse antes que los componentes de los anillos membranales (Wagner et al. 2010).

Por otro lado, existen componentes auxiliares involucrados en la biogénesis del sistema y en la secreción de efectores, como las chaperonas, que desempeñan su papel desde el citoplasma bacteriano. Entre algunas de las funciones de estas chaperonas del SST3 están: mantener a las proteínas en un estado desplegado competente para la secreción, estabilizar los efectores para evitar su degradación y dirigirlos hacia el aparato de secreción (Ghosh 2004; Cornelis 2006).

En cuanto a la secreción tipo III, ésta ocurre en una forma Sec-independiente, es decir, no se reconoce una secuencia señal N-terminal o péptido líder en los sustratos (eje, aguja, translocadores y efectores), por lo que las proteínas se secretan en un solo paso a través de un canal central en el sistema secretor, sin que existan intermediarios periplásmicos. Se ha propuesto que las proteínas contienen una señal de secreción que podría estar codificada en el extremo N-terminal o en el ARN mensajero. Existen reportes que apoyan la teoría de que una secuencia peptídica de naturaleza anfipática en la región amino es la señal de secreción tipo III. De manera adicional, se ha observado que la composición de los primeros 20 a 50 residuos de los efectores es poco común, ya que es rica en serinas y contiene una baja proporción de

aspartato, lo cual también podría estar asociado al reconocimiento por el SST3 (He et al. 2004; Galan y Wolf-Watz 2006; Arnold et al. 2010).

Como se mencionó en secciones anteriores, el ensamblaje y funcionamiento del SST3 se regulan a distintos niveles, uno de ellos es el transcripcional, mediante el cual algunos reguladores responden a distintos estímulos ambientales, controlando la transcripción de los genes que codifican los componentes del sistema. A su vez, la secreción a través del inyectisoma sólo ocurre en respuesta a señales específicas como el contacto con la célula hospedero (Mota et al. 2005; Deane et al. 2010).

Sistema de secreción tipo III de EPEC

En el SST3 de EPEC (Figura 6) la proteína que conforma el anillo de membrana externa es EscC. EscC corresponde a la familia de proteínas conocidas como secretinas, que forman un canal o poro por medio del cual las proteínas bacterianas salen a través de la membrana externa (Gauthier et al. 2003; Spreter et al. 2009). Los anillos de membrana interna están formados por las proteínas EscJ y EscD. EscJ forma un anillo a través de la asociación de 24 subunidades en la cara periplásmica de la membrana interna, anclándose a ésta por medio de un dominio de lipidación N-terminal, mientras que su extremo C-terminal se extiende hacia el periplasma. Se propone que EscJ funciona como una plataforma molecular para el ensamblaje del SST3. Por otro lado, EscD posee un dominio citoplásmico N-terminal y un dominio periplásmico C-terminal. En este caso se asocian 18-24 subunidades de EscD para formar el segundo anillo de la membrana interna. (Crepin et al. 2005; Yip et al. 2005; Ogino et al. 2006; Spreter et al. 2009).

De las proteínas que integran el aparato de secreción, EscU es una proteína con un dominio N-terminal de 4 cruces transmembranales y un dominio citoplásmico C-terminal, asociados a través de un conector flexible. El dominio C-terminal se auto-proteoliza y se propone que el cambio conformacional inducido por este corte permitiría la interacción de EscU con otras proteínas del aparato de exportación (Zarivach et al. 2008). Por homología con su correspondiente en *Shigella flexneri*, EscU probablemente participe en el cambio de especificidad de secreción de las subunidades de la aguja a los translocadores (Botteaux et al. 2010). EscV es una proteína con múltiples dominios transmembranales, necesaria para el correcto ensamblaje de otros componentes del sistema. El dominio citoplásmico de la proteína correspondiente en el inyectisoma de *S. enterica* funciona como plataforma de anclaje para los componentes solubles del aparato de secreción (Gauthier et al. 2003; Worrall et al. 2010). Por otro lado, se predice que EscQ forma una estructura equivalente al anillo C flagelar que se ha demostrado es importante para el reclutamiento y exportación de sustratos (González-Pedrajo, 2006), lo cual también se ha reportado para el ortólogo de EscQ en el inyectisoma de *S. flexneri* (Pallen et al. 2005; Morita-Ishihara et al. 2006; Erhardt et al. 2010). De acuerdo a la función sugerida para las proteínas ortólogas de EscR, EscS y EscT en *S. enterica*, éstas podrían promover el ensamblaje de la base del inyectisoma, al ser los primeros componentes del sistema en insertarse en la membrana (Wagner et al. 2010). Todas las proteínas que constituyen el aparato secretor son esenciales para que se lleve a cabo la secreción tipo III.

La ATPasa EscN es una proteína citoplásmica asociada a la membrana interna, cuya actividad se requiere para la secreción de proteínas a través del inyectisoma (Gauthier y Finlay 2003; Andrade et al. 2007). De acuerdo al análisis de su secuencia y estructura cristalográfica, EscN comparte similitud con las subunidades α y β del sector F_1 de la ATPasa (Zarivach et al. 2007) y con la ATPasa flagelar Flil (Minamino et al. 2008).

A su vez, se ha propuesto que EscN participa en el reconocimiento de los complejos efector-chaperona en una forma independiente de su actividad hidrolítica. Además, se propone que EscN facilita la disociación de los complejos efector-chaperona y el desplegamiento parcial de los efectores de manera dependiente a la hidrólisis de ATP (Akedá y Galan 2005). Finalmente, se ha sugerido que EscN pudiera formar una estructura hexamérica y que la carga electronegativa en el interior del hexámero facilitaría la secreción de polipéptidos desplegados a través del SST3 por medio de fuerzas repulsivas (Zarivach et al. 2007).

El eje interno se predice que está constituido por la proteína EscI (Pallen et al. 2005). En *S. enterica*, la proteína correspondiente es necesaria para el correcto anclaje de la aguja al cuerpo basal del inyectisoma (Marlovits et al. 2006). La aguja a su vez, está formada por unidades polimerizadas de la proteína EscF, y se requiere para la secreción de proteínas y para el ensamblaje del filamento EspA (Sekiya et al. 2001; Wilson et al. 2001). El filamento EspA es una estructura asociada a la aguja, que resulta de la polimerización de la proteína translocadora EspA y que funciona como un conducto para la translocación de proteínas (Knutton et al. 1998; Daniell et al. 2001; Sekiya et al. 2001). Ya que EPEC es un patógeno extracelular, se sugiere que el filamento EspA permite al inyectisoma penetrar la barrera mucosa del epitelio y el glicocálix para alcanzar a los enterocitos (Daniell et al. 2001). Este filamento también se ha involucrado en la adherencia de EPEC a la célula hospedero, sin embargo esta adhesión es más débil que la generada por el pilus BFP (Cleary et al. 2004).

Las proteínas translocadoras EspB y EspD se secretan vía el SST3 y se insertan en la membrana de la célula hospedera a través de sus dominios transmembranales (uno en EspB y dos en EspD) para formar un

poro, permitiendo así la translocación de efectores al hospedero (Wachter et al. 1999; Ide et al. 2001). Recientemente se demostró la interacción directa de EspB con EspD y de EspD con EspA, y se propone que estas interacciones favorecen la correcta inserción de EspD y EspB en la membrana del hospedero (Mueller et al. 2008; Luo y Donnenberg 2011).

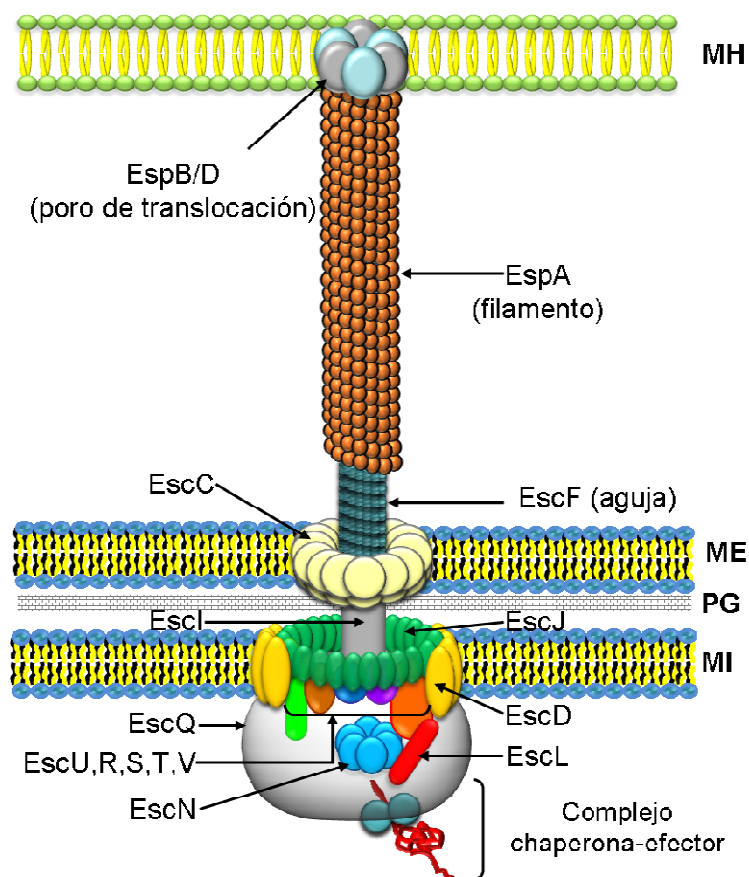


Figura 6. **Representación esquemática del SST3 de EPEC.** Se indican los nombres de los principales componentes del inyectisoma y su localización. MH: membrana del hospedero; ME: membrana externa; PG: capa de peptidoglicano; MI: membrana interna. Elaborada por García-Gómez E. y Díaz-Guerrero M. A.

La secreción de efectores a través del SST3 y la formación de la lesión A/E por EPEC se dan en respuesta a la temperatura y a la fase de crecimiento, produciéndose de forma óptima en medio DMEM a pH 7.4, a 37° C, cuando los cultivos están en la fase exponencial de crecimiento

y en osmolaridad fisiológica. También se ha determinado que se requiere la presencia de calcio, bicarbonato de sodio y nitrato de hierro, y que la secreción se inhibe en presencia de amonio (Kenny y Finlay 1995; Rosenshine et al. 1996; Kenny et al. 1997).

Penetración de la pared celular durante el ensamblaje del sistema de secreción tipo III

Para su ensamblaje, el SST3 requiere atravesar las membranas y el periplasma bacterianos, para lo que es necesaria la apertura de la pared celular (compuesta de peptidoglicano o mureína). Este proceso se lleva a cabo por enzimas denominadas transglicosilasas líticas (TLs) especializadas, que degradan la pared celular facilitando la biogénesis del sistema de secreción (Koraimann 2003).

Pared celular. La pared celular de las bacterias Gram negativas, también llamada capa de peptidoglicano o mureína, es una de las tres capas principales de la envoltura celular y se localiza en el periplasma, entre la membrana interna y la membrana externa bacterianas (Silhavy et al. 2010). Forma una estructura en forma de red cuyas principales funciones son mantener una forma celular definida y preservar la integridad de la célula ante la presión osmótica interna, siendo capaz de expandirse reversiblemente hasta tres veces sin sufrir ruptura. Incluso sirve como plataforma de anclaje de otros componentes de la envoltura celular como proteínas y lipoproteínas (Vollmer et al. 2008).

La capa de peptidoglicano es un polímero de unidades repetidas de disacáridos formados por los residuos N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc), unidos por enlaces glicosídicos β -1,4. Las cadenas de disacáridos se entrecruzan por medio de péptidos cortos que están unidos covalentemente al grupo lactilo del

MurNAc. Comúnmente la composición de los péptidos en *E. coli* es: L-Ala, D-Glu, m-A₂pm (ácido meso-diaminopimélico), D-Ala y D-Ala. El enlace entrecruzado se produce entre un residuo de D-Ala y otro de m-A₂pm de distintas cadenas (Figura 7), este último es un aminoácido dibásico y dicarboxílico, intermediario en la vía de biosíntesis de la lisina (Holtje 1998; Vollmer et al. 2008).

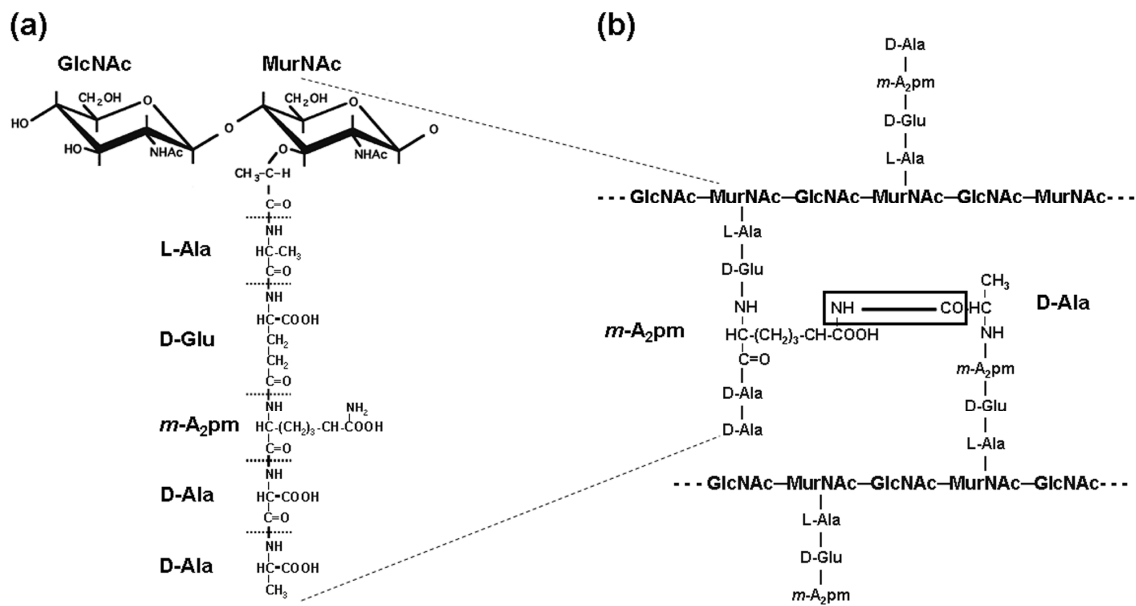


Figura 7. **Composición de la pared celular o capa de peptidoglicano en *E. coli*.** (a) Molécula de peptidoglicano (muropéptido), integrada por un disacárido de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acilmurámico (MurNAc), y un péptido asociado al MurNAc. (b) Enlace de entrecruzamiento que se forma entre los péptidos de dos cadenas de peptidoglicano. El entrecruzamiento se produce entre los aminoácidos D-Ala y m-A₂pm (indicado con un recuadro). Modificada de (Holtje 1998).

Debido a que las cadenas de disacáridos tienen una conformación helicoidal, no todos los péptidos asociados a una cadena se entrecruzan con los péptidos de una cadena vecina, lo que resulta en la formación de poros y le da a la pared celular una apariencia de panal (Meroueh et al. 2006). Los poros que se forman en la capa de peptidoglicano tienen un diámetro promedio de 2.06 nm, y se ha calculado que a través de ellos pueden pasar libremente proteínas

globulares con masas moleculares de 22-24 kDa, sin embargo cuando la capa de peptidoglicano está extendida pueden atravesar moléculas de hasta 50 kDa (Demchick y Koch 1996).

Las cadenas de disacáridos están integradas por 1 a 30 unidades, con un promedio de 9 unidades. Las evidencias experimentales sugieren que se orientan de forma paralela a la membrana citoplásmica, lo que concuerda con el grosor calculado para la capa de peptidoglicano. La pared celular tiene un grosor de 2.5 nm en el 75-80 % de su superficie, mientras que en el 20-25 % restante tiene un grosor máximo de 7 nm (Vollmer y Holtje 2004; Vollmer y Seligman 2010).

Metabolismo de la pared celular. La pared celular no es una estructura estática, ya que se agranda y se degrada constantemente durante el ciclo de vida bacteriano, además está en recambio y reciclaje continuos (Holtje 1998).

El crecimiento de la pared celular ocurre por medio de la incorporación de nuevas moléculas a la capa existente a través de dos reacciones: transglicosilación y transpeptidación, realizadas a menudo por enzimas bifuncionales conocidas como proteínas de unión a penicilina (PBP, por su afinidad a antibióticos β -lactámicos). Las cadenas de disacáridos se forman a través de las reacciones de transglicosilación, mediante las cuales se forma un enlace glicosídico entre el carbono 1 de un residuo de MurNAc de la cadena creciente y el carbono 4 del residuo GlcNAc de un muropéptido precursor (denominado lípido II). Los entrecruzamientos se forman por reacciones de transpeptidación, en las que se forma un enlace entre el grupo carboxilo de un residuo D-Ala en la cuarta posición de un péptido y el grupo amino ϵ del m-A₂pm en la tercera posición de otro péptido (Holtje 1998; Vollmer y Bertsche 2008).

Durante el metabolismo de la pared celular no sólo se requiere la síntesis e incorporación de nuevo material, sino la ruptura de los enlaces covalentes para originar espacios de inserción de moléculas precursoras, para la degradación del tabique transversal que se forma mediante una invaginación de la envoltura bacteriana durante la división celular y para la liberación de muropéptidos en el reciclaje del peptidoglicano. Esta ruptura de enlaces generalmente se lleva a cabo por enzimas hidrolíticas, también llamadas autolisinas, por su capacidad de digerir el peptidoglicano hasta reducirlo a pequeños fragmentos solubles. La actividad de estas enzimas líticas debe estar acoplada con la actividad de las enzimas de síntesis, posiblemente por medio de la formación de complejos multiproteicos, para evitar la lisis celular (Holtje 1998; Vollmer et al. 2008).

Existe al menos una enzima lítica para cada enlace covalente presente en el peptidoglicano (Figura 8). Entre éstas se encuentran peptidasas, glucosaminidasas, amidasas y transglicosilasas líticas (TLs). Las peptidasas hidrolizan los enlaces peptídicos, dependiendo del sitio de corte en el péptido se clasifican en carboxipeptidasas y endopeptidasas. Las amidasas hidrolizan el enlace covalente entre la L-Ala del péptido y el MurNAc. Por otro lado, las glucosaminidasas o glicosidasas hidrolizan el enlace glicosídico entre el GlcNAc y el MurNAc, mientras que las TLs rompen el enlace glicosídico entre el MurNAc y el GlcNAc (Vollmer et al. 2008).

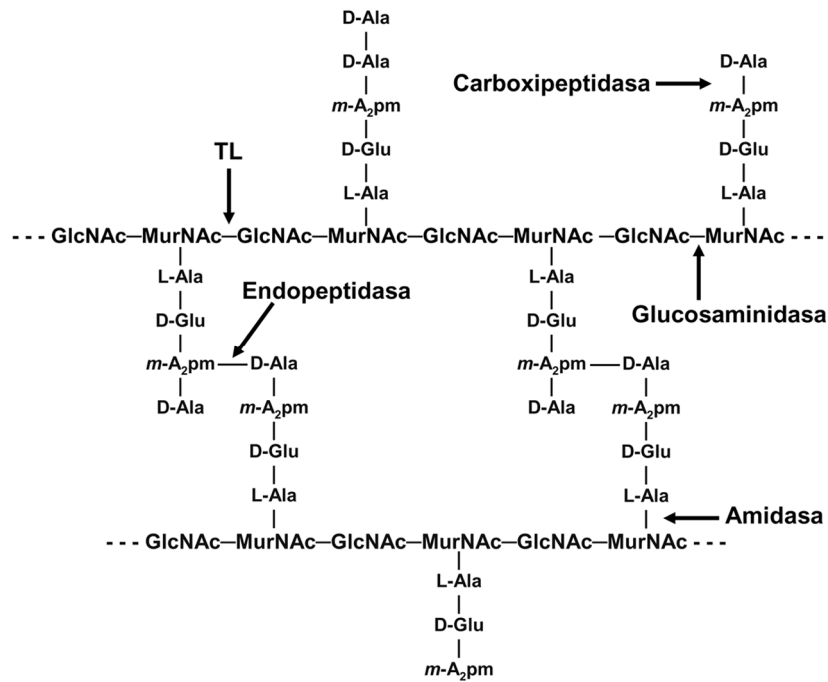


Figura 8. **Enzimas líticas que participan en el metabolismo del peptidoglicano.** Se indica con flechas el sitio de corte de cada tipo de enzima. Modificada de (Vollmer et al. 2008).

En el LEE de EPEC, se localiza el gen *etgA* (antes *rorf3*) que codifica una proteína con similitud a TLs. *etgA* es una unidad transcripcional ubicada entre el gen *escU* del operón LEE1 y el operón *grlRA*. En este trabajo se determinó que *EtgA* se transporta al periplasma, tiene actividad de degradación de peptidoglicano, es capaz de provocar lisis celular por medio de su actividad de muramidasa y es importante para el ensamblaje eficiente del SST3.

ANTECEDENTES

Transglicosilasas líficas

Las transglicosilasas líficas (TLs) son muramidazas que rompen el enlace glicosídico β -1,4 entre los residuos MurNAc y GlcNAc, enlace que también es reconocido por la lisozima. Sin embargo, a diferencia de la lisozima, las TLs no hidrolizan el sustrato, sino que catalizan una reacción de transglicosilación intramolecular en el residuo MurNAc que lleva a la formación de un residuo 1,6-anhidromurámico (1,6-anhidroMurNAc) (Figura 9) (Scheurwater et al. 2008).

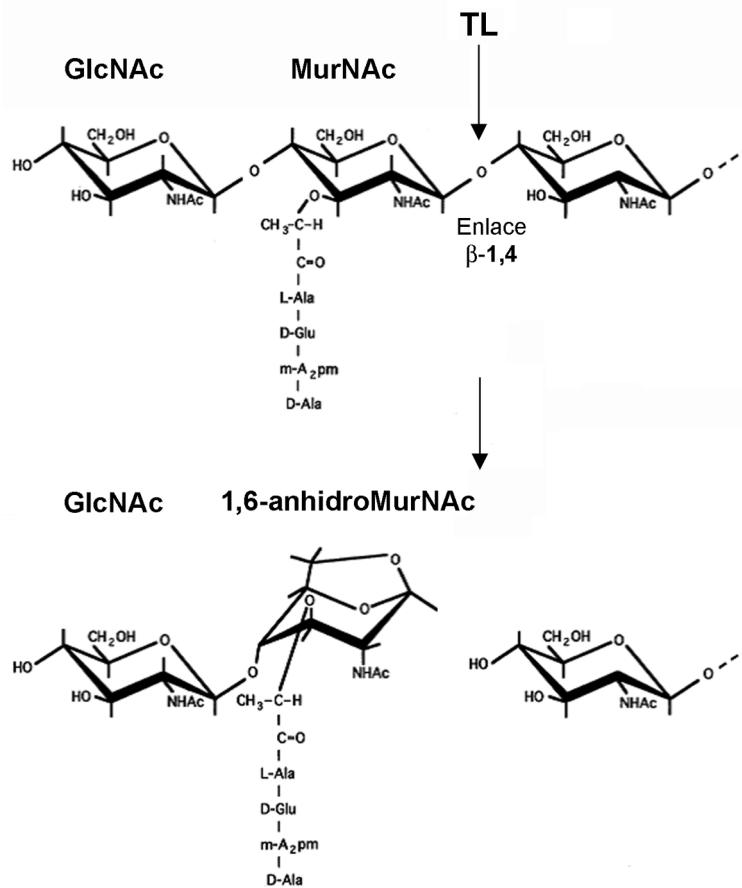


Figura 9. **Reacción catalizada por las transglicosilasas líficas (TL).** Se indica el enlace que se rompe durante la actividad de las TLs y se muestra el producto formado en la reacción (1,6-anhidroMurNAc). Tomada de (Holtje 1995).

El mecanismo de reacción propuesto para las TLs involucra un residuo de glutamato, que funciona como el único aminoácido catalítico. Este residuo actúa inicialmente como un ácido, donando su protón al oxígeno del enlace glicosídico β -1,4, lo que induce su ruptura y la formación de un intermediario oxocarbanión, el cual es estabilizado por el grupo N-acetilo del carbono 2 del residuo MurNAc. El residuo catalítico desprotonado actúa entonces como una base, abstrayendo un protón del OH del carbono 6 del MurNAc. A continuación se produce un ataque nucleofílico intramolecular del carbono 6 al carbono 1 del MurNAc, lo que promueve el colapso del producto intermediario y la consecuente formación del producto característico de estas enzimas, el 1,6-anhidroMurNAc (Thunnissen et al. 1994; Reid et al. 2004; Scheurwater et al. 2008). Este mecanismo de reacción está determinado con base en análisis mutacionales, estructurales y bioquímicos, que incluyen el uso de inhibidores específicos para las TLs como bulgecina A, hexa-N-acetilquitohexosa y N-acetilglucosamin-tiazolina, los cuales son análogos del residuo de N-acetilglucosamina del peptidoglicano (Scheurwater et al. 2008).

Las TLs se agrupan en cuatro familias de acuerdo a sus secuencias de aminoácidos y a la conservación de tres motivos consenso: ES-GMLQ-AYNAG, en los que está incluido el glutamato catalítico. Estos motivos están contenidos a su vez en un dominio denominado SLT. En la familia 1 se agrupan principalmente las TLs solubles (Slf), que presentan la mayor conservación de los motivos consenso. En las familias 2 y 3 se agrupan generalmente las TLs asociadas a membrana (Mlf). Mientras que en la familia 4 se encuentran las TLs de bacteriófagos (Blackburn y Clarke 2001).

Transglicosilasas líticas asociadas a sistemas de secreción, adhesión y bacteriófagos

Para su biogénesis los complejos macromoleculares bacterianos como pili, flagelos y sistemas de secreción requieren atravesar la pared celular. Debido a que estos sistemas son demasiado grandes para pasar a través de los poros que se forman naturalmente en el peptidoglicano, requieren de la actividad de enzimas líticas que degraden localmente la capa de peptidoglicano y formen un hueco lo suficientemente grande para permitir su ensamblaje (Dijkstra y Keck 1996; Koraimann 2003). De acuerdo con lo anterior, se han encontrado TLs asociadas a diversos sistemas de secreción, cuya actividad muralítica está acoplada con el ensamblaje de estos complejos. Se ha encontrado al menos una proteína con similitud a TLs asociada a los sistemas de secreción tipo III (SST3, flagelar y de virulencia) y tipo IV (SST4); también se han encontrado TLs asociadas al pilus tipo IV y a bacteriófagos. Estas TLs se denominaron TLs especializadas, para distinguirlas de aquellas que están asociadas al metabolismo del peptidoglicano durante el crecimiento y la división celular (Koraimann 2003).

Transglicosilasas líticas asociadas al sistema de secreción tipo III de virulencia. El inyectisoma, cuyo diámetro es de 10 nm en su parte periplásmica, claramente requiere de una degradación localizada de la pared celular para su ensamblaje. Como ya se mencionó, esta degradación se lleva a cabo por enzimas especializadas que facilitan la biogénesis del complejo en la envoltura celular (Koraimann 2003).

Entre las TLs especializadas que se han identificado para el SST3 se encuentra IpgF de *Shigella sonnei*, que presenta actividad de degradación de peptidoglicano *in vitro*. Adicionalmente, se demostró que una mutación puntual en el glutamato catalítico ya no presenta actividad enzimática (Zahrl et al. 2005). Sin embargo, se reportó que una

mutante en *ipgF* no tiene un efecto aparente en la capacidad de invasión ni en la patogenicidad de *S. flexneri* (Allaoui et al. 1993).

Para la TL *lagB* codificada en la isla de patogenicidad SPI-1 de *S. enterica* también se determinó su actividad muralítica *in vitro* (Zahrl et al. 2005), aunque una cepa mutante en *iagB* no presentó alteraciones notables en el ensamblaje del inyectisoma (Sukhan et al. 2001).

En el patógeno de roedores *C. rodentium*, una mutante en *rorf3* del LEE (correspondiente a *etgA* de EPEC) presenta una reducción en la secreción de proteínas y en la virulencia (Deng et al. 2004). De igual forma, una cepa mutante en el gen *I0045* del LEE de EHEC presenta un fenotipo de secreción similar (Yu et al. 2010). Sin embargo, para ninguno de estos dos casos se demostró la actividad de TL.

En el caso de la proteína HpaH, codificada en la isla de patogenicidad *hrp* del patógeno de plantas *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, se determinó que esta proteína contribuye al crecimiento bacteriano y la inducción de la respuesta inmune en el hospedero (Noel et al. 2002) así como a la secreción de efectores (Buttner et al. 2007). Sin embargo, aún no se ha demostrado su actividad muralítica y la forma en que ésta contribuiría al funcionamiento del sistema. En cambio, para la TL Hpa2 de *X. oryzae* sí se ha determinado su capacidad de degradación de peptidoglicano así como su participación en la proliferación bacteriana y en la activación de respuesta inmune en plantas; y se ha sugerido que podría actuar durante el ensamblaje del SST3 generando huecos en la pared celular (Zhang et al. 2008).

En *P. syringae*, otra bacteria patógena de plantas, se identificaron tres Tls asociadas con el SST3: HrpH, HopP1 y HopAJ1. La sobreproducción de HrpH produce la inhibición del crecimiento de cultivos bacterianos, lo que no sucede cuando se introduce una mutación puntual en el

residuo glutamato catalítico. Mutaciones simples o combinadas en los genes que codifican estas proteínas presentan una reducción en la translocación de efectores y en la virulencia. Por otro lado, HrpH y HopP1 se translocan a células vegetales por medio del SST3, provocando la activación del sistema inmune del hospedero y muerte celular, lo que indica que tienen funciones adicionales a la actividad de muramidasa. Estas observaciones permitieron concluir que HrpH, HopP1 y HopAJ1 participan de forma coordinada en el funcionamiento del SST3 durante el proceso de infección (Oh et al. 2007).

Muramidazas del sistema de secreción tipo III flagelar. Durante la biogénesis flagelar se requiere que el eje atraviese el espacio periplásmico, lo que involucra la apertura o degradación localizada de la capa de peptidoglicano. En este proceso está involucrada la proteína FlgJ de *S. enterica*, que presenta actividad de muramidasa en su extremo C-terminal y se exporta al periplasma por medio del SST3. Mutantes catalíticas de FlgJ presentan una reducción en su capacidad de nado, por lo que se concluye que la actividad de muramidasa de FlgJ es importante para la biogénesis flagelar, pues permite el ensamblaje del eje en el periplasma, para que puedan formarse posteriormente el gancho y el filamento (Nambu et al. 1999). Sin embargo, se observó que la actividad de muramidasa de FlgJ no es esencial para este proceso, ya que la mutante $\Delta flgJ$ no recupera su capacidad de nado al introducir sólo la región C-terminal o catalítica de FlgJ; además, el nado se recupera parcialmente después de tiempos de incubación prolongados al complementar con la proteína conteniendo sólo la región N-terminal (Hirano et al. 2001).

En la bacteria acuática *Caulobacter crescentus* una mutación puntual en el residuo catalítico de la TL PleA impide la formación de flagelo, lo que indica la importancia de esta muramidasa en el ensamblaje de esta estructura. Además, PleA está presente en la bacteria sólo durante

la biogénesis flagelar, sugiriendo su participación en este proceso en una forma temporalmente controlada (Viollier y Shapiro 2003).

Otro caso en el que se ha demostrado la importancia de una muramidasa en el ensamblaje del flagelo es el de SlfF de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*. Esta proteína, en contraste con FlgJ de *S. enterica*, se exporta al periplasma a través de la translocasa Sec, en donde degrada la pared celular para permitir la penetración de la estructura flagelar en formación (de la Mora et al. 2007).

Transglicosilasas líticas asociadas al sistema de secreción tipo IV. El SST4 es un complejo utilizado tanto por bacterias Gram positivas como por Gram negativas y algunas arqueas para la transferencia de ADN, proteínas y complejos nucleoproteicos al medio extracelular o a células hospedero. Por lo tanto, es un sistema responsable tanto de la conjugación plasmídica como de la translocación de proteínas a células eucariontes durante procesos de virulencia. Las subestructuras que caracterizan a este sistema son un canal en la envoltura celular bacteriana para conducir los sustratos desde el citoplasma bacteriano y una adhesina de superficie celular o pilus que participa en el contacto entre células y la translocación de sustratos. Este sistema se encuentra en organismos como *Agrobacterium tumefaciens*, *Helicobacter pylori*, *Bordetella pertussis*, *Brucella suis* y *Legionella pneumophila* (Hayes et al. 2010; Wallden et al. 2010).

El modelo de SST4 mejor estudiado es el sistema VirB/VirD4 del patógeno de plantas *A. tumefaciens*, que se utiliza para la transferencia del complejo nucleoproteico oncogénico denominado ADN-T (ADN tumoral) (Beeckman y Vanrompay 2010; Hayes et al. 2010). La TL asociada a este sistema es VirB1, cuya actividad de muramidasa se ha demostrado *in vitro* (Zahrl et al. 2005). La inactivación de esta proteína por medio de una mutación puntual en el glutamato catalítico resulta

en una reducción en la capacidad de formación de tumores y por lo tanto de la virulencia (Mushegian et al. 1996). Por otro lado, VirB1 se procesa para dar lugar a un fragmento N-terminal que tiene la actividad de muramidasa y un fragmento C-terminal (VirB1*). Ambos dominios se requieren para la formación del pilus y la virulencia; sin embargo, sólo VirB1* participa directamente en la formación del pilus (Llosa et al. 2000; Zupan et al. 2007).

Otro ejemplo de TL del SST4 es AtlA de *Neisseria gonorrhoeae*. Se ha demostrado la capacidad de esta proteína para degradar peptidoglicano y producir residuos 1,6-anhidroMurNAc. En el mismo estudio, se evaluó la participación de AtlA en el SST4 y se determinó que se requiere para la secreción de ADN, probablemente facilitando el ensamblaje del sistema de secreción (Kohler et al. 2007).

Para el pilus de conjugación codificado por el plásmido R64 Incl de *S. enterica* y *E. coli*, se identificó a *pilT* como uno de los 14 genes esenciales para la formación del pilus y para el proceso de conjugación. PilT se detecta principalmente en la fracción periplásmica de *E. coli* y posee un dominio SLT, lo que sugiere su participación en la biogénesis del pilus (Yoshida et al. 1999; Sakai y Komano 2002). Otra TL asociada a pilus de conjugación es P19, para la que se ha demostrado tanto su localización periplásmica y su actividad de muramidasa *in vivo*, como su importancia en el ensamblaje de este sistema (Bayer et al. 2000; Bayer et al. 2001).

Transglicosilasas líficas asociadas con el pilus tipo IV. Los pili tipo IV son estructuras poliméricas adhesivas que se ensamblan en la superficie de diversas bacterias Gram negativas, incluyendo patógenos como EPEC, EHEC, *S. enterica*, *P. aeruginosa*, *L. pneumophila*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis* y *Vibrio cholerae*. Estos pili tienen la capacidad de retraerse mientras su extremo distal permanece firmemente adherido a una

superficie o a un receptor de la célula hospedero, lo que permite el desplazamiento bacteriano a través de superficies semisólidas como la mucosa epitelial; a este tipo de movimiento se le denomina "*twitching*". El pilus tipo IV también está implicado en la formación de microcolonias, en la formación de biopelículas y en la adquisición de ADN durante el proceso de transformación natural (Pizarro-Cerda y Cossart 2006; Craig y Li 2008).

Entre los genes que codifican los componentes del pilus BFP en el plásmido EAF de EPEC se localiza *bfpH*, cuyo producto tiene similitud con Tls; sin embargo, no se ha demostrado que tenga dicha actividad. Se ha sugerido la participación de BfpH en el ensamblaje de BFP debido a que una cepa mutante en *bfpH* presenta una reducción importante en su capacidad de autoagregación, aunque aparentemente no presenta alteración en el ensamblaje del pilus ni en la formación de microcolonias (Anantha et al. 2000).

Otro ejemplo es el de PleA, que además de estar involucrada en la biogénesis flagelar, participa en la formación del pilus tipo IV de *C. crescentus*, facilitando su penetración a través de la capa de peptidoglicano de forma temporal y espacialmente controlada (Viollier y Shapiro 2003).

Transglicosilasas líticas de bacteriófagos. Los bacteriófagos son virus que infectan bacterias y que, en el caso de los de virus de tipo lítico, después de la replicación de las partículas virales, inducen la muerte del hospedero. En general los bacteriófagos están formados por dos estructuras principales: la cápside que está compuesta de una o más proteínas diferentes y contiene el ácido nucleico del virus (ADN o ARN), y la cola que está unida a la cápside y funciona como un conducto a través del cual el ácido nucleico pasa a la célula hospedero durante la infección (Rossmann et al. 2004).

En algunos bacteriófagos se ha encontrado una TL asociada que se ha propuesto está involucrada en la generación de huecos localizados en la pared celular bacteriana al inicio de su ciclo infeccioso, con el fin de permitir la inyección del genoma del virus en la célula hospedero (Lehnherr et al. 1998; Koraimann 2003). Entre estas TLs está la proteína Gp16 del fago T7 de *E. coli*, que contiene el motivo SLT en su extremo N-terminal y está involucrada en el proceso de infección. Probablemente es una extensión de la cola del fago que forma un canal en la envoltura celular bacteriana a través del cual el ADN puede ser translocado (Moak y Molineux 2000).

De forma similar, el fago PRD1 contiene una proteína con el dominio SLT denominada P7 que presenta actividad muralítica. En ausencia de esta enzima el virus presenta retraso tanto en la replicación de ADN como en la lisis del hospedero, indicando que ésta participa en el ciclo de vida del fago al inicio del proceso de infección (Rydman y Bamford 2000).

Para la proteína Gp144 del fago ϕ KZ de *P. aeruginosa* también se determinó actividad de lisis de peptidoglicano, predominantemente en paredes celulares de bacterias Gram negativas. Asimismo, se determinó su localización periplásmica y su capacidad de lisis celular en cultivos de *E. coli*. Se propone que Gp144 podría estar participando en la lisis del hospedero para permitir la liberación de la progenie del virus (Paradis-Bleau et al. 2007), a diferencia de las TLs Gp16 y P7 que participan al inicio de la infección.

ANTECEDENTES EXPERIMENTALES

Previamente, como parte de los resultados de mi tesis de maestría, determinamos que *EtgA* presenta similitud de secuencia con Tls especializadas de distintos sistemas de secreción y con *Slt70*, Tl involucrada en el crecimiento y la división celular, compartiendo con éstas los motivos conservados ES-GLMQ-AYNAG, entre los que se encuentra el glutamato catalítico (Figura 10).

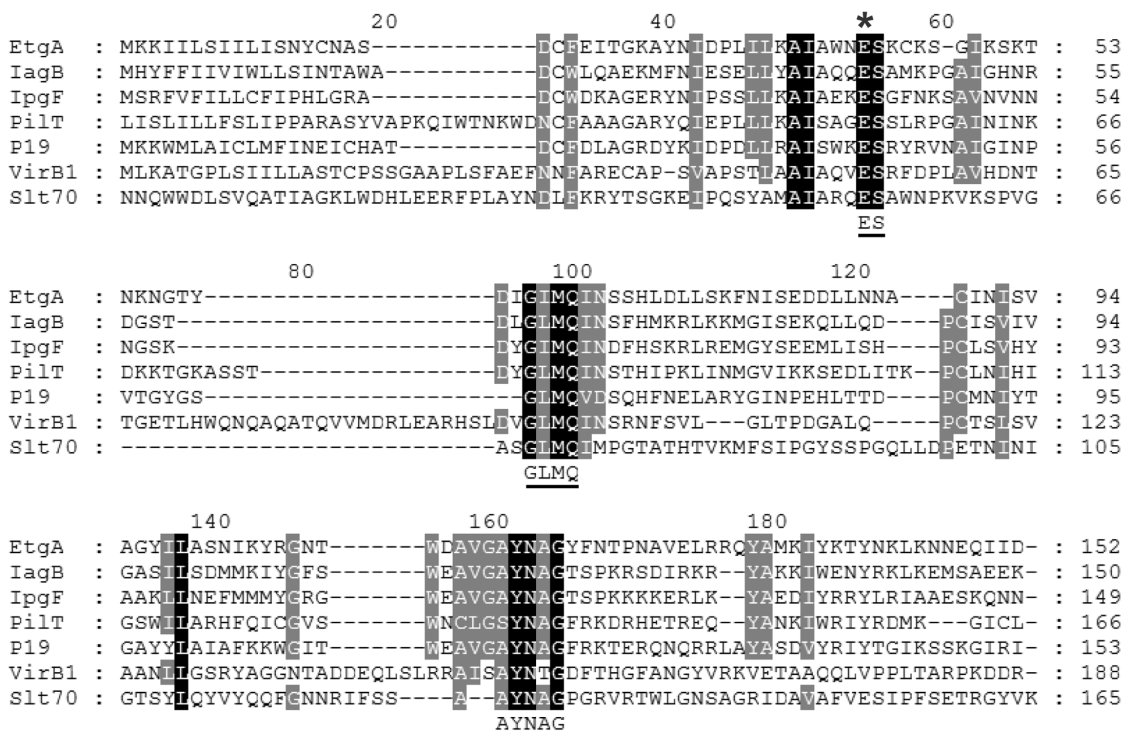


Figura 10. **Similitud de *EtgA* con Tls especializadas y *Slt70*.** Se muestra un alineamiento múltiple realizado con el programa ClustalW 2.0 (Thompson et al. 1994) entre *EtgA* del SST3 de EPEC (número de acceso Swiss-Prot Q9AJ25) y las Tls especializadas *IagB* del SST3 de *S. enterica* ser. Typhi (P43018), *IpgF* del SST3 de *S. flexneri* (Q07568), *PilT* del pilus tipo IV de *E. coli* (O07378), *P19* del pilus de conjugación R1-16 de *E. coli* (P17738), *VirB1* del SST4 de *A. tumefaciens* (P17791) y *Slt70* de *E. coli* (P0AGC3). Se indican los motivos conservados ES-GLMQ-AYNAG. Se resaltan los residuos similares en gris y los residuos idénticos en negro. Se señala el glutamato catalítico con un asterisco.

Por medio de un análisis bioinformático con el programa SignalP 3.0 (Bendtsen et al. 2004) se determinó la presencia de una secuencia señal

dependiente de la translocasa Sec en EtgA, con un sitio de corte probable entre los aminoácidos A17 y S18 (dato no mostrado).

Se demostró, por medio de zimogramas, la actividad de muramidasa de una versión recombinante de EtgA a la que se le eliminó la secuencia señal predicha (His-EtgAns), y que para esta actividad es indispensable el glutamato identificado como el residuo catalítico (Figura 11). Adicionalmente, la proteína His-EtgAns se utilizó para la generación de anticuerpos policlonales en conejo (García-Gómez 2007).

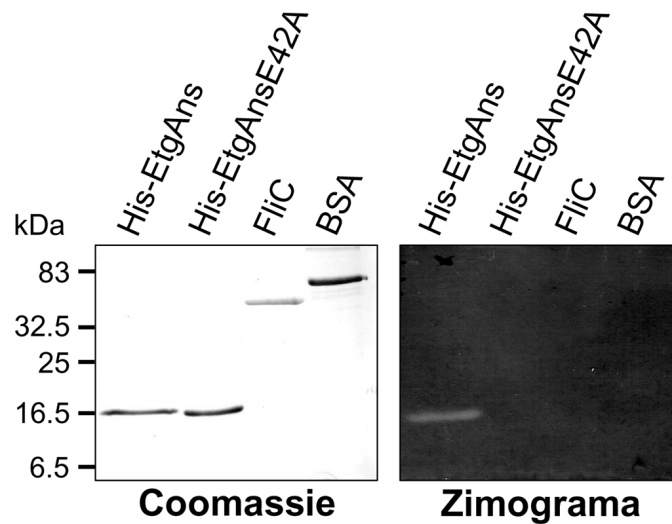


Figura 11. **Actividad de muramidasa de EtgA en zimogramas.** Se determinó la actividad de degradación de peptidoglicano de la proteína recombinante His-EtgAns en geles de acrilamida-SDS copolimerizados con un extracto de la bacteria *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato (panel derecho). Después de la electroforesis, los geles se tiñeron con azul de metileno. Se incluyeron como controles negativos las proteínas FliC (flagelina) y BSA (albúmina sérica bovina). En el panel izquierdo se muestran las proteínas utilizadas en el ensayo en un gel de acrilamida-SDS teñido con azul de Coomassie.

JUSTIFICACIÓN

Los sistemas de secreción, en particular los SST3, son utilizados por una gran variedad de bacterias patógenas durante el proceso de infección, siendo esenciales para su virulencia al permitir la manipulación y explotación de las vías de señalización del hospedero. El estudio de los principales componentes del inyectisoma permitirá la comprensión de su funcionamiento durante dichos procesos patogénicos. Específicamente, el estudio funcional de la muramidasa EtgA permitirá determinar la importancia de esta enzima para la biogénesis y actividad del inyectisoma de EPEC. Esta información en un futuro podría ser la base para el desarrollo de fármacos que mediante la inactivación de las muramidosas pudieran afectar el ensamblaje de los sistemas de secreción y posiblemente atenuar al patógeno, que sería eliminado por el sistema inmune. El uso de estos fármacos no tendría consecuencias negativas para el hospedero, como el daño a la microbiota o el surgimiento de bacterias resistentes que se promueve con el uso de antibióticos convencionales.

HIPÓTESIS

La proteína EtgA pertenece al grupo de transglicosilasas líticas especializadas; se transporta al periplasma de EPEC en donde degrada la pared celular, facilitando la biogénesis del inyectisoma durante el proceso de infección.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar el papel que desempeña *EtgA* en el funcionamiento del SST3 de EPEC.

Objetivos específicos

- Determinar la localización subcelular de *EtgA* en EPEC.
- Evaluar el efecto de la actividad de muramidasa de *EtgA* en cultivos de EPEC.
- Determinar el efecto de mutaciones puntuales en el residuo catalítico y en otros residuos altamente conservados de *EtgA* sobre su actividad de muramidasa.
- Generar una cepa mutante de *etgA* para evaluar su fenotipo y determinar la importancia de *EtgA* en el SST3 de EPEC.
- Determinar si alguna otra transglicosilasa lítica es capaz de sustituir funcionalmente a *EtgA* en la formación del SST3.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas de EPEC, *C. rodentium* y *E. coli* utilizadas en este trabajo se enlistan en la Tabla 1. Las cepas bacterianas se cultivaron a 37°C en agitación (250 rpm) en medio Luria-Bertani (LB; triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%), adicionado con los antibióticos apropiados cuando así se requirió: ampicilina 100 µg/ml, cloranfenicol 25 µg/ml, estreptomycin 25 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml o tetraciclina 25 µg/ml. EPEC y *C. rodentium* se cultivaron en medio DMEM (Gibco) adicionado con 1% de LB a 37°C en condiciones estáticas (CO₂ 5%), o en agitación en el caso de EPEC curada del plásmido EAF (JPEP30).

Tabla 1. Cepas utilizadas en este estudio.

Cepa	Descripción*	Fuente o referencia
Cepas de EPEC		
E2348/69	EPEC silvestre O127:H6, St ^R	(Levine et al. 1978)
JPEP30	E2348/69 sin plásmido EAF, St ^R	Bustamante V. H., et al., no publicado.
JPEP24	E2348/69 con una eliminación en fase de <i>ler</i> , St ^R y Km ^R	Bustamante V. H., et al., no publicado
Δ <i>escN</i>	E2348/69 con una eliminación en fase de <i>escN</i> , St ^R	(Gauthier et al. 2003)
Δ <i>etgA::kan</i>	E2348/69 con una eliminación en fase de los codones 41 a 131 de <i>etgA</i> , St ^R y Km ^R	Este estudio
Δ <i>etgA::kanEAF-</i>	JPEP30 con una eliminación en fase de los codones 41 a 131 de <i>etgA</i> , St ^R y Km ^R	Este estudio
Δ <i>etgA::kanr</i>	E2348/69 con una eliminación en fase de los codones 41 a 131 de <i>etgA</i> , St ^R y Km ^R	Este estudio
Δ <i>etgA::kanrEAF-</i>	JPEP30 con una eliminación en fase de los codones 41 a 131 de <i>etgA</i> , St ^R y Km ^R	Este estudio
Cepas de <i>C. rodentium</i>		
DBS100	<i>C. rodentium</i> silvestre	(Deng et al. 2004)

$\Delta rorf3$	DBS100 con una eliminación en fase de <i>rorf3</i>	(Deng et al. 2004)
Cepas de E. coli		
BL21 DE3 pLysS	F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)</i> λ (DE3) [pLysS Cm ^R], cepa de expresión	Novagen
Top10	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> λ ⁻ ; cepa de clonación	Invitrogen
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ['] <i>proAB lacI^q</i> Δ M15 Tn10 (Tc ^R)]	Stratagene

*Cm^R, resistente a cloranfenicol; Km^R, resistente a Kanamicina; Str^R, resistente a estreptomycin; Tc^R, resistente a tetraciclina.

Generación de construcciones plasmídicas

Los vectores de clonación utilizados y los plásmidos generados en este estudio están enlistados en la Tabla 2. Los oligonucleótidos usados para las reacciones de PCR se enlistan en la Tabla 3.

Tabla 2. Plásmidos utilizados en este estudio.

Plásmido	Descripción*	Fuente o referencia
pET3a	Vector de expresión, promotor T7, Ap ^R	Novagen
pET19b	Vector de expresión, promotor T7 <i>lac</i> , Ap ^R , producción de proteínas recombinantes con una etiqueta de Histidinas N-terminal	Novagen
pKD4	Plásmido molde para amplificar el casete de resistencia a Km; Ap ^R y Km ^R	(Datsenko y Wanner 2000)
pKD13	Plásmido molde para amplificar el casete de resistencia a Km; Ap ^R y Km ^R	(Datsenko y Wanner 2000)
pKD46	Plásmido de expresión de la recombinasa Red, promotor pBAD, Ap ^R	(Datsenko y Wanner 2000)
pMALc2Xa	Vector de expresión, promotor <i>tac</i> , Ap ^R , producción de proteínas recombinantes fusionadas a la proteína de unión a maltosa (MBP en el extremo) N-terminal	New England Biolabs
pTrc99A	Vector de expresión, promotor <i>trc</i> , Ap ^R	Amersham-Pharmacia
pTrc99AFF4	Vector de expresión pTrc99A modificado, promotor <i>trc</i> , Ap ^R	(Ohnishi et al. 1997)
pEEetgA	<i>etgA</i> clonado en pET19b	(García-Gómez 2007)

pEEetgAns	<i>etgA</i> sin secuencia señal clonado en pET19b	(García-Gómez 2007)
pEEetgAE42A	<i>etgA</i> con la mutación E42A clonado en pET19b	Este estudio
pEEetgAQ65A	<i>etgA</i> con la mutación Q65A clonado en pET19b	Este estudio
pEEetgAY116A	<i>etgA</i> con la mutación Y116A clonado en pET19b	Este estudio
pEE3aetgA	<i>etgA</i> clonado en pET3a	Este estudio
pEE3aetgAns	<i>etgA</i> sin secuencia señal clonado en pET3a	Este estudio
pEE3aetgAE42A	<i>etgA</i> con la mutación E42A clonado en pET3a	Este estudio
pNLetgAnsB	<i>etgA</i> sin secuencia señal clonado en pMALc2X	Este estudio
pNTetgA	<i>etgA</i> clonado en pTrc99AFF4	Este estudio
pNTetgAns	<i>etgA</i> sin secuencia señal clonado en pTrc99AFF4	Este estudio
pNTetgAQ65A	<i>etgA</i> con la mutación Q65A clonado en pTrc99AFF4	Este estudio
pNTetgAY116A	<i>etgA</i> con la mutación Y116A clonado en pTrc99AFF4	Este estudio
pETHetgA	<i>etgA</i> con etiqueta de Histidinas clonado en pTrc99A	Este estudio

*Ap^R, resistente a Ampicilina; Km^R, resistente a Kanamicina.

Tabla 3. Lista de oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')*	Fuente o referencia
etgAnsBfw	ACTGTAATGGATCCGATTGTTTTG	Este estudio
etgAHRv	CGATAGACCAAGCTTATTAATGCA	Este estudio
etgAGluAFw	CAATTGCATGGAATGCATCAAAATGCAAAGC	Este estudio
etgAGluARv	GCTTTTGCATTTTGGATGCATTCCATGCAATTG	Este estudio
etgAGlnAFw	TATAGGTATAATGGCAATTAATTCATCTCATT	Este estudio
etgAGlnARv	AATGAGATGAATTAATTGCCATTATACCTATA	Este estudio
etgATyrAFw	GATGCAGTTGGTGC GC GCTAATGCAGGTTAC	Este estudio
etgATyrARv	GTAACCTGCATTAGCCGCACCAACTGCATC	Este estudio
deletgA4Fw	TCATTATTCTTTAATTTATTATATGTTTTATATAT TTTCATTGCGTATTGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Este estudio
deletgA4Rv	CAGGAAAAGCATATAACATAGATCCACTAATATTA AAAGTCAATGATGCGATGAATATCCTCCTTAGTTC	Este estudio

deletgA13Rv	CAGGAAAAGCATATAACATAGATCCACTAATATTA AAAGCAATTGCATGG ATTCCGGGGATCCGTTCGACC	Este estudio
escUFw	TAAACTGGCTGAACTCTATG	Este estudio
grlRRv	TATCCATAAGCAATATCAAG	Este estudio
K1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	(Datsenko y Wanner 2000)
K2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	(Datsenko y Wanner 2000)
KT	CGGCCACAGTCGATGAATCC	(Datsenko y Wanner 2000)

*Los sitios de restricción se indican con letras cursivas; el codón modificado para generar mutantes puntuales está subrayado; las secuencias homólogas a los plásmidos pKD4 o pKD13 se indican en negritas.

etgA y *etgA* sin secuencia señal (*etgAns*) se subclonaron a partir de los plásmidos pEE*etgA* y pEE*etgAns* en los sitios *NdeI* y *BamHI* del vector pTrc99AFF4, para generar las construcciones pNT*etgA* y pNT*etgAns*, respectivamente. La construcción pETH*etgA* se generó por medio de la subclonación de His-*etgA* desde pEE*etgA* en los sitios *NcoI* y *BamHI* del vector pTrc99A. A su vez, *etgA* y *etgAns* se subclonaron en los sitios *NdeI* y *BamHI* del vector pET3a, para originar los plásmidos pEE3a*etgA* y pEE*etgAns*. Las enzimas de restricción se obtuvieron de New England Biolabs. Para la purificación de insertos y productos de PCR se utilizó el estuche *Qiaquick Gel Extraction* (Qiagen). Para las reacciones de ligación se utilizó la enzima ADN ligasa T4 (New England Biolabs).

Por otro lado, para la producción de una versión recombinante de *EtgA* fusionada con la proteína de unión a maltosa (MBP) en su extremo N-terminal, *etgAns* se amplificó a partir de ADN cromosomal de EPEC silvestre usando los oligonucleótidos *etgAnsBfw* y *etgAHRv*. La reacción se realizó con la ADN polimerasa *Taq* (Qiagen). El producto de PCR se digirió con las enzimas *BamHI* y *HindIII* y se clonó en el vector pMALc2Xa, generando así la construcción pN*LetgAnsB*.

Para la transformación de ligaciones y plásmidos se utilizaron las cepas de *E. coli* Top10 y XL1-Blue. Los plásmidos se purificaron usando el estuche *Qiaprep Spin Miniprep* (Qiagen). La secuenciación de los plásmidos se realizó en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Mutagénesis sitio-dirigida de residuos conservados

Para la generación de mutantes puntuales en *etgA* se utilizó el sistema QuikChange de mutagénesis sitio-dirigida (Stratagene). Las mutaciones se introdujeron por medio de reacciones de PCR utilizando oligonucleótidos que portan el cambio deseado. De esta manera, los codones que codifican los residuos E42 (oligonucleótidos *etgAGluAFw* y *etgAGluARv*), Q65 (*etgAGlnAFw* y *etgAGlnARv*) y Y116 (*etgATyrAFw* y *etgATyrARv*) se modificaron dando lugar a un codón de alanina. La amplificación se realizó con la ADN polimerasa *PfuTurbo* (Stratagene) usando como molde la construcción pEEetgA. Los productos de PCR se trataron con la enzima *DpnI* y se transformaron en la cepa XL1-Blue. Una vez confirmadas las mutaciones esperadas por medio de secuenciación, las construcciones modificadas se denominaron pEEetgAE42A, pEEetgAQ65A y pEEetgAY116A.

Para originar los plásmidos pNTetgAE42A y pEE3aetgAE42A, el gen modificado *etgAE42A* se subclonó en los sitios *NdeI* y *BamHI* de los vectores pTrc99AFF4 y pET3a, respectivamente. A su vez, *etgAQ65A* y *etgAY116A* se subclonaron en los sitios *NdeI* y *BamHI* del vector pTrc99AFF4 para generar los plásmidos pNTetgAQ65A y pNTetgAY116A.

Generación de mutantes nulas en *etgA*

Para la eliminación en fase de los codones 41 al 131 de *etgA* se utilizó el sistema de la recombinasa Red del fago λ , que por medio de recombinación permite el reemplazo del gen de interés con un casete de resistencia a un antibiótico (Datsenko y Wanner 2000). Para la amplificación del casete de resistencia a kanamicina funcionaron como moldes los plásmidos pKD4 y pKD13 (los casetes de 1.6 y 1.4 kb, respectivamente, se denominaron *kan* y *kanr*, en este último el gen de resistencia está codificado en la cadena complementaria del plásmido) (Tabla 1). Para generar la mutante $\Delta etgA::kan$ la amplificación del casete se realizó con los oligonucleótidos *deletgA4Fw* y *deletgA4Rv*, mientras que para generar la cepa $\Delta etgA::kanr$ se utilizaron los oligonucleótidos *deletgA4Fw* y *deletgA13Rv*. Los productos de PCR se introdujeron por electroporación en EPEC E2348/69 o JPEP30 conteniendo el plásmido pKD46. Las mutantes se seleccionaron en LB sólido adicionado con kanamicina (100 μ g/ml). La introducción del casete de resistencia en el sitio esperado se confirmó por PCR usando combinaciones de los oligonucleótidos K1, K2, KT, *escUFw* y *grlRRv*.

Purificación de MBP-EtgAns

La cepa BL21 BDP pLysS con el plásmido pNLetgAnsB se cultivó en 200 ml de medio LB adicionado con glucosa 0.2 % y ampicilina, a 30°C en agitación. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{600} de 0.6 se agregó IPTG 0.1 mM y se continuó la incubación por 4 h más. Las bacterias se colectaron por centrifugación a 8,000 x g durante 10 min y se almacenó la pastilla a -20°C. Posteriormente, la pastilla se descongeló y se resuspendió con amortiguador de unión (Tris-HCl 50 mM pH 8.0, NaCl 0.5 M) adicionado con PMSF 1mM; las células se lisaron por sonicación (2 ciclos de 1 min cada uno a 60 Khz, con 1 min de reposo entre ambos).

Las fracciones soluble e insoluble del lisado celular se separaron por centrifugación a 27,000 x g. El lisado soluble se sometió a un paso de ultracentrifugación a 145,000 x g durante 1h y se cargó en una columna de resina de amilosa (New England Biolabs). Se hicieron lavados con amortiguador de unión conteniendo maltosa 0.5 mM. La proteína recombinante MBP-EtgAns se eluyó con maltosa 10 mM y se dializó con amortiguador TNEED (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 0.5 M, EDTA 0.1 mM pH 7.5 y DTT 0.2 mM) con glicerol 20%. La concentración de proteína se determinó con reactivo de Bradford (Bio-Rad).

Análisis de actividad de muramidasa por zimogramas

La bacteria liofilizada *Micrococcus lysodeikticus* (Sigma) se incorporó como sustrato en geles de acrilamida-SDS al 15%, a una concentración final de 0.5%. En estos geles se separaron por electroforesis muestras de MBP-EtgAns y de los controles negativos BSA (Sigma) y FliC (purificada de *S. enterica*). Los geles se incubaron durante 48 h en amortiguador de renaturalización (citrato de sodio 10 mM pH 4.0, Tritón X-100 0.1%) a 4°C y se tiñeron con azul de metileno 0.1%-KOH 0.01%, lo que permitió observar las zonas claras que indicaron la degradación del sustrato (Bernadsky et al. 1994; Zahrl et al. 2005).

Inmunodetección de proteínas

Las muestras con las proteínas de interés se separaron por electroforesis en geles de acrilamida-SDS al 15% (Laemmli 1970) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Whatman). Las membranas se bloquearon con una solución de leche libre de grasa al 5% en amortiguador salino de Tris (TBS; Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4) adicionado con Tween-20 al 0.1 % (TBS-T) durante 12 horas a 4°C. Las membranas se lavaron con

amortiguador TBS-T, se incubaron con el anticuerpo primario dirigido contra la proteína de interés (diluido con TBS-T). Los anticuerpos primarios se emplearon en las siguientes diluciones: anti-CesT 1:5,000, anti-CesD2 1:5,000 anti-DnaK (Assay Designs) 1:5,000, anti-EspA 1:30,000, anti-EspB 1:20,000, anti-EspF 1:5,000, anti-EtgA 1:20,000, anti-MBP (New England Biolabs) 1:5,000, anti-SepL 1:5,000, anti-Tir 1:2,500. Posteriormente las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios GAR (*goat anti-rabbit*; dilución 1:10,000) o GAM (*goat anti-mouse*; dilución 1:5,000) acoplados a peroxidasa de rábano (ambos de Santa Cruz Biotechnology). La detección se realizó con las soluciones del estuche *SuperSignal West Pico* (Pierce), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Detección de EtgA en EPEC

Para llevar a cabo la detección de las distintas variantes de EtgA en lisados de EPEC, tanto la cepa silvestre como las cepas Δ escN y JPEP24 (Δ ler) con el plásmido pNTetgA se cultivaron en 50 ml de medio DMEM (dilución 1:50 a partir de los cultivos originales en LB). También se cultivó EPEC silvestre con los plásmidos pNTetgAns y pETHetgA. Los cultivos se incubaron en las condiciones ya mencionadas y cuando alcanzaron una DO_{600} de 0.6 se indujeron con IPTG 1 mM. Se tomaron muestras de 1.5 ml a distintos tiempos de incubación, colectando las células a 16,000 x g durante 5 min. Se analizaron los lisados celulares por inmunodetección utilizando anticuerpos policlonales anti-EtgA.

Purificación de periplasma de EPEC

Para verificar la localización de EtgA en EPEC se realizó un procedimiento de fraccionamiento celular previamente descrito

(Gauthier et al. 2003), con algunas modificaciones. Se realizaron cultivos de EPEC silvestre con el plásmido pNTetgAE42A (mutante catalítica, para evitar lisis celular por la actividad de EtgA) o pNTetgAns en 100 ml de DMEM (en este caso la inoculación con los cultivos iniciales en LB se hizo a una dilución 1:100). Los cultivos se incubaron a 37°C en CO₂ 5% hasta que alcanzaron la DO₆₀₀ de 0.6 y se indujeron con IPTG 0.1 mM. Se continuó incubando en las mismas condiciones durante una hora. Se tomó una muestra de 1.5 ml de cultivo para el análisis de los lisados celulares. Las bacterias se cosecharon por centrifugación, se lavaron con amortiguador salino de fosfatos (PBS; NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2mM, pH 7.4) y se resuspendieron con una solución de choque osmótico (Tris-HCl 50 mM pH 7.0, PMSF 1mM, sacarosa al 20%), para después agregar EDTA 2 mM e incubar 10 min a temperatura ambiente. Esta suspensión se centrifugó a 8,000 x g por 10 min a 4°C, obteniéndose del sobrenadante la fracción periplásmica. Esta fracción se analizó por inmunodetección con distintos anticuerpos para verificar su pureza y confirmar la localización de EtgA.

Determinación del efecto de la sobreproducción de EtgA en cultivos de EPEC

EPEC silvestre con el vector pTrc99AFF4 (control) y los plásmidos, pNTetgA, pNTetgAns, pNTetgAE42A o pETHetgA se cultivó inicialmente en LB durante 12 h, y estos cultivos se utilizaron para inocular 30 ml de DMEM, (dilución 1:50). Se incubaron los cultivos en CO₂ 5% a 37°C hasta que llegaron a una DO₆₀₀ de 0.2, en este punto se indujeron con IPTG 1 mM y se continuó la incubación durante 6 h más en las condiciones mencionadas. Se tomaron muestras de los cultivos cada hora para determinar la DO₆₀₀ de los cultivos y el número de unidades formadoras de colonia (UFCs). Para la determinación de las UFC/ml de los cultivos de EPEC con pTrc99AFF4 y pNTetgA, se tomó una muestra de 100 µl, a

partir de la que se realizaron diluciones seriadas en 1 ml de medio LB, desde 1:10 hasta 1:100,000 (10^{-1} a 10^{-5}). Se tomaron 100 μ l de la dilución 1:100,000 y se sembraron en medio LB sólido adicionado con ampicilina. Después de 12 h de incubación a 37°C se realizó el conteo de colonias en cada caja. Para el cálculo de UFC/ml se utilizó la siguiente fórmula: UFC/ml = número de colonias x factor de dilución/ ml sembrados.

Alternativamente, se sobreprodujeron EtgA, EtgAns y EtgAE42A en cultivos de EPEC silvestre en 8 ml de DMEM (inoculando con una dilución 1:50), los cuales se incubaron e indujeron en las condiciones ya mencionadas (37°C en CO₂ 5%, con IPTG 1 mM cuando la DO₆₀₀ llegó a 0.2). A las 4 horas de inducción se cosecharon las células y se recuperó el sobrenadante para su posterior análisis (ver sección Secreción de proteínas del SST3).

Secreción de proteínas del sistema de secreción tipo III

Este ensayo se realizó de acuerdo al procedimiento reportado (Kenny et al. 1997) con algunas modificaciones. EPEC y *C. rodentium* se cultivaron inicialmente durante 12 h a 37°C con agitación en 3 ml de medio líquido LB adicionado con los antibióticos apropiados, para después cultivarlas en 8 ml de medio DMEM (dilución 1:50). La incubación se realizó a 37°C en CO₂ 5%, o con agitación para la cepa JPEP30, hasta que los cultivos alcanzaron una DO₆₀₀ de 0.6. Los cultivos se centrifugaron a 16,100 x g durante 5 min a 4°C para separar el sobrenadante de la pastilla celular. Las proteínas secretadas al sobrenadante se precipitaron con ácido tricloroacético (TCA) al 10% a 4°C durante 12 h. Las proteínas precipitadas se recuperaron por centrifugación a 16,100 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 normalizando de acuerdo a la DO de los cultivos, y se agregó Tris saturado al 10% para

neutralizar los residuos de TCA. Tanto las proteínas de los lisados completos como las proteínas secretadas se analizaron en geles de acrilamida-SDS al 15% (Laemmli 1970) y por inmunodetección.

Ensayo de hemólisis dependiente del sistema de secreción tipo III

Para la obtención de eritrocitos se extrajeron 5 ml de sangre por punción venosa de voluntarios del laboratorio. La sangre se trató con EDTA 1% pH 7.5 (100 μ l por ml de sangre) para evitar su coagulación. Posteriormente se centrifugó a 3,500 x g 15 min a temperatura ambiente para concentrar los eritrocitos. Los eritrocitos se centrifugaron a 1,000 x g 10 min a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con un volumen de NaCl 0.9%.

Las cepas de EPEC a utilizar se cultivaron toda la noche a 37°C en agitación en medio líquido LB más los antibióticos apropiados. Con los cultivos iniciales se inocularon 4 ml de medio DMEM (dilución 1:50), se incubó a 37°C en CO₂ 5% hasta una DO₆₀₀ de 0.4. Se agregaron 0.5 ml de cultivo a 0.5 ml de solución de eritrocitos 4% (en DMEM). Esta mezcla se centrifugó a 2,500 x g durante 1 min a temperatura ambiente. Posteriormente, la pastilla se incubó a 37°C en CO₂ 5% durante 4 horas y se resuspendió suavemente para facilitar la liberación de hemoglobina. Las células se centrifugaron nuevamente (12,000 x g por 1 min) y se analizó la liberación de hemoglobina en el sobrenadante a DO₄₅₀. Como control positivo se utilizó EPEC silvestre, considerando la hemólisis producida por esta cepa como 100%. Como controles negativos se utilizaron la mutante Δ escN y la solución de eritrocitos sin infectar. Los ensayos se realizaron por triplicado (Warawa et al. 1999; Ide et al. 2001) .

Purificación de filamentos EspA

La purificación de filamentos EspA de la superficie de EPEC se llevó a cabo tomando como referencia un protocolo ya descrito (Daniell et al. 2003). A partir de cultivos de EPEC en LB se inocularon 150 ml de DMEM (1:50), se incubó a 37°C en agitación hasta que la DO_{600} llegó a 0.7. El cultivo se centrifugó a 7,600 x g durante 5 min a 4°C para cosechar las bacterias. La pastilla celular se resuspendió suavemente con 20 ml de Tris-HCl 20 mM pH 7.5 y se incubó a 4°C durante 10 min. Esta suspensión se agitó vigorosamente con vortex durante 4 min para desprender los filamentos EspA de la bacteria. Para eliminar las células bacterianas se centrifugó dos veces a 38,000 x g durante 20 min a 4°C. Posteriormente, el sobrenadante se ultracentrifugó a 160,000 x g por 1h a 4°C y se decantó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió con 50 μ l de Tris-HCl 20 mM pH 7.5, la concentración de la muestra se normalizó de acuerdo a la DO de los cultivos. Se realizó el análisis de la cantidad de proteína EspA ensamblada por medio de geles de acrilamida-SDS 15% (Laemmli 1970) e inmunodetección con anticuerpos anti-EspA.

RESULTADOS

Con base en los antecedentes descritos, en el presente trabajo se realizó el análisis funcional de *EtgA*, para determinar su papel en el ensamblaje del SST3 de EPEC. La mayor parte de los resultados descritos a continuación forman parte de un artículo publicado recientemente (García-Gomez et al. 2011).

Actividad de muramidasa de la proteína recombinante MBP-EtgAns

Con el objetivo de obtener una proteína recombinante en cantidades suficientes para realizar ensayos cuantitativos de degradación de peptidoglicano, *etgAns* se clonó en el vector pMALc2Xa, que permite producir proteínas fusionadas a la proteína MBP. La construcción obtenida se denominó pNLetgAnsB y a partir de ésta se sobreprodujo MBP-EtgAns (56.2 kDa), que se purificó por medio de cromatografía de afinidad por amilosa. MBP-EtgAns se obtuvo con un rendimiento de 600 µg a partir de 200 ml de cultivo (Figura 12a). Sin embargo, esta cantidad es equivalente a la obtenida con His-EtgAns, para la que se determinó un rendimiento de 600-900 µg a partir de 200 ml de cultivo) (García-Gómez 2007).

Se determinó que MBP-EtgAns presenta actividad de muramidasa en ensayos de zimograma (Figura 12b), lo que indica que la actividad de degradación de peptidoglicano de *EtgA* no se altera por la presencia de una etiqueta de MBP. Sin embargo, MBP-EtgAns no presentó actividad en otro tipo de experimentos, como los ensayos turbidimétricos, en los que se determina la actividad de muramidasa a través del monitoreo la DO_{450} de una solución de *M. lysodeikticus* en presencia de la enzima. Posiblemente la concentración obtenida de

MBP-EtgAns no resultó suficiente para degradar el sustrato bajo las condiciones probadas en el experimento (dato no mostrado).

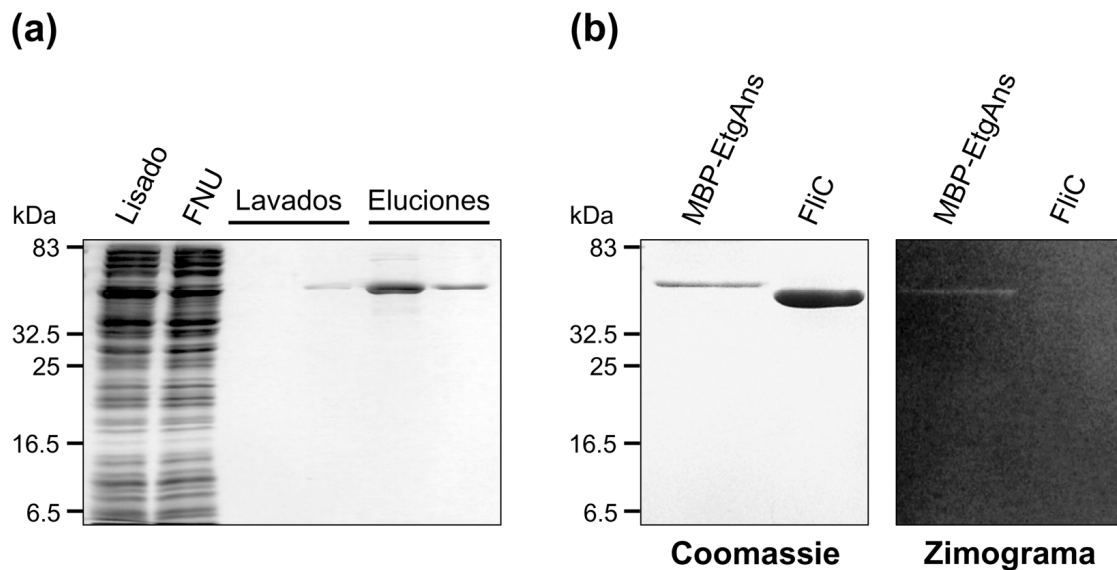


Figura 12. **Purificación y actividad de muramidasa de MBP-EtgAns.** a) Purificación de MBP-EtgAns por cromatografía de afinidad por amilosa. Se muestran en un gel de acrilamida-SDS 15% la fracción soluble del lisado que se cargó en la columna, la fracción no unida (FNU) así como los dos lavados realizados con maltosa 0.5 mM y las eluciones con maltosa 10 mM. b) Capacidad de degradación de peptidoglicano de MBP-EtgAns en un gel con sustrato (zimograma, panel derecho). Se utilizó como control negativo a la proteína FliC. Las proteínas utilizadas para este ensayo se muestran en un gel de acrilamida-SDS 15% teñido con Coomassie (panel izquierdo). El ensayo se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en la sección de Material y métodos.

Procesamiento de la secuencia señal de EtgA

Las proteínas que se transportan por medio de la translocasa Sec, una vez que salen al periplasma, son procesadas por peptidasas de secuencia señal ancladas a la membrana interna, que eliminan el péptido líder (Pugsley 1993; Natale et al. 2008). Ya que las TLs deben localizarse en el periplasma para llevar a cabo su función, la predicción

de una secuencia señal en el extremo amino de EtgA sugirió su transporte a dicho compartimento celular en EPEC.

Inicialmente se determinó de una forma indirecta el transporte de EtgA al periplasma bacteriano por medio de su sobreproducción en la cepa silvestre de EPEC, a partir de la construcción pNTetgA (basada en el vector pTrc99AFF4). Se tomaron muestras a distintos tiempos desde la inducción de los cultivos, y se analizaron las pastillas celulares por inmunodetección con anticuerpos dirigidos contra EtgA (Figura 13). Se observa que a partir de los 15 minutos de inducción se produce una proteína correspondiente a la versión precursora de EtgA (17.1 kDa) y a partir de las 2 horas es posible detectar otra forma de la proteína que por su migración corresponde a la forma procesada o madura (EtgAns*, 15.2 kDa). Lo anterior sugiere que EtgA se reconoce por la translocasa Sec y su secuencia señal se procesa por peptidasas.

Al analizar las pastillas celulares de cultivos de EPEC en los que se sobreprodujo EtgAns (a partir de pNTetgAns) se observa sólo una forma de la proteína, correspondiente a una masa molecular de 15.2 kDa, lo que indica que la proteína es incapaz de procesarse cuando no posee secuencia señal. La cantidad de EtgAns disminuye a partir de las 3 horas de inducción y ya no se detecta a las 6 horas, sugiriendo que esta forma de EtgA es inestable en el citoplasma.

Asimismo, al sobreproducir a la versión recombinante His-EtgA (con el vector pETHetgA) también se observa sólo una forma de la proteína (19.6 kDa), lo que indica que no está siendo procesada. Al analizar la secuencia de His-EtgA usando el programa SignalP (Bendtsen et al. 2004) no se predice una secuencia señal (dato no mostrado), por lo que posiblemente la etiqueta de histidinas en el extremo amino de la proteína esté impidiendo el reconocimiento de la secuencia señal por la translocasa Sec.

Para determinar si este procesamiento es dependiente del SST3, EtgA se sobreprodujo en la cepa $\Delta escN$, en la que está eliminado el gen que codifica la ATPasa del inyectisoma por lo que sólo se forman los componentes del sistema que se ensamblan vía Sec (Gauthier et al. 2003; Zarivach et al. 2007). Sin embargo, de la misma forma que en EPEC silvestre, EtgA se procesa, lo que se determinó al detectar tanto la forma nativa como la forma madura de la proteína en los lisados celulares. Asimismo, al sobreproducir EtgA en la cepa Δler , mutante en el regulador positivo de la isla LEE y en la cual no se produce ninguno de los componentes del SST3 (Elliott et al. 2000; Bustamante et al. No publicado), también se observa su procesamiento por medio de la detección de las dos formas de la proteína. Estos resultados indican que el procesamiento de EtgA depende de la secuencia señal y es independiente de los componentes del inyectisoma.

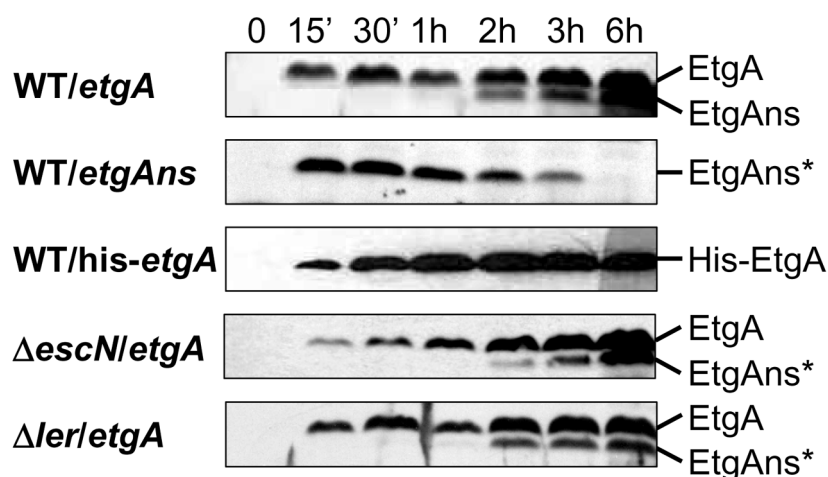


Figura 13. **Procesamiento de la secuencia señal de EtgA independiente del SST3.** Se analizaron las pastillas celulares de cultivos de EPEC en los que se sobreprodujeron EtgA, EtgAns y His-EtgA. Las distintas versiones de la proteína se detectaron con anticuerpos anti-EtgA. Se observan dos formas de EtgA, correspondientes a la forma no procesada (EtgA, 17.1 kDa) y a la forma madura de la proteína (EtgAns*, 15.2 kDa) tanto en EPEC silvestre como en las mutantes $\Delta escN$ y Δler . EtgAns y HisEtgA no se procesan.

Localización periplásmica de EtgA

Para determinar la localización de EtgA se realizó el fraccionamiento celular y purificación de la fracción periplásmica de EPEC silvestre, como se detalla en la sección de Material y métodos. Se sobreprodujo una versión de EtgA con una sustitución en el glutamato catalítico (EtgAE42A, a partir del plásmido pNTetgAE42A) para evitar lisis celular (ver más adelante), también se sobreprodujo EtgAns a partir del plásmido pNTetgAns. La presencia de ambas versiones de EtgA en las pastillas celulares se determinó por inmunodetección (Figura 14, panel derecho). En la fracción periplásmica se detectó sólo la forma procesada de EtgAE42Ans* (15.2 kDa), mientras que EtgAns no se detecta (Figura 14, panel izquierdo), como se esperaba al no ser procesada (Figura 13).

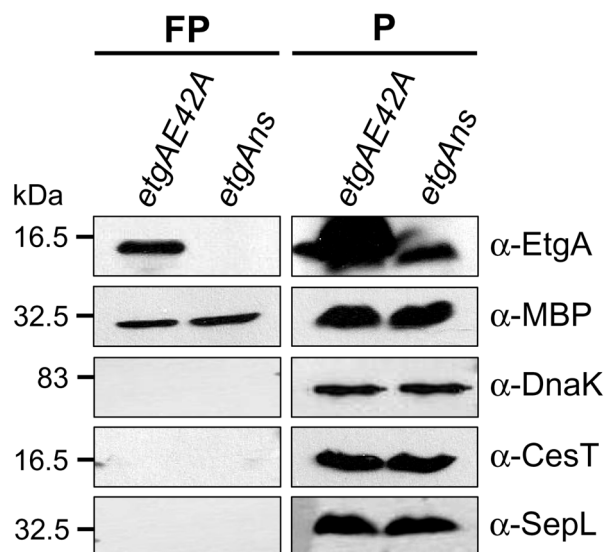


Figura 14. **Localización periplásmica de EtgA.** Se muestra la fracción periplásmica (FP) purificada a partir de cultivos de EPEC silvestre en los que se sobreprodujeron las proteínas EtgAE42A y EtgAns. Tanto la fracción periplásmica (FP) como las pastillas celulares (P) se analizaron por inmunodetección con distintos anticuerpos (anti-EtgA, anti-MBP, anti-DnaK, anti-CesT y anti-SepL).

Para verificar la pureza de estas muestras se realizó la inmunodetección de la proteína periplásmica MBP, así como de las proteínas

citoplásmicas DnaK, CesT y SepL (Gauthier et al. 2003; Thomas et al. 2005; Wang et al. 2008). De esta manera se determinó de forma directa la localización periplásmica de EtgA.

Efecto de la sobreproducción de EtgA en EPEC

Para determinar el efecto *in vivo* de la actividad de muramidasa de EtgA, se sobreprodujeron distintas versiones de la proteína a partir de las construcciones pNTetgA, pNTetgAE42A, pNTetgAns y pETHetgA en EPEC silvestre. Para monitorear el crecimiento de los cultivos se determinó la DO₆₀₀ durante cada hora de incubación, antes y después de la inducción con IPTG (Figura 15).

La sobreproducción de EtgA dio lugar a una disminución en el crecimiento del cultivo con respecto al cultivo con el vector pTrc99AFF4. Aunque no es evidente una lisis celular masiva, esta observación sugirió que EtgA es capaz de inducir algún tipo de estrés y lisis bacteriana, e incluso la muerte celular. Se determinó entonces el número de unidades formadoras de colonia (UFC) en el último tiempo de inducción de los cultivos, en el cultivo con pTrc99AFF4 se cuantificaron 4.4×10^9 UFC/ml, mientras que al sobreproducir EtgA se determinaron 7.8×10^8 UFC/ml, lo que significó una reducción del 82% en la viabilidad de las células bacterianas.

En cambio, al sobreproducir la proteína EtgAE42A no se observó ningún efecto sobre el crecimiento de EPEC, que presentó un comportamiento similar al cultivo control con pTrc99AFF4. Al sobreproducir las versiones EtgAns y His-EtgA que no se procesan ni se transportan al periplasma (Figuras 13, 14 y dato no mostrado) no se observó diferencia en el crecimiento de los cultivos con respecto al control. Lo anterior demuestra que el efecto tóxico observado sobre el crecimiento de

EPEC se debe al transporte de EtgA al periplasma y a su actividad de muramidasa, para lo que son esenciales la secuencia señal y el glutamato catalítico.

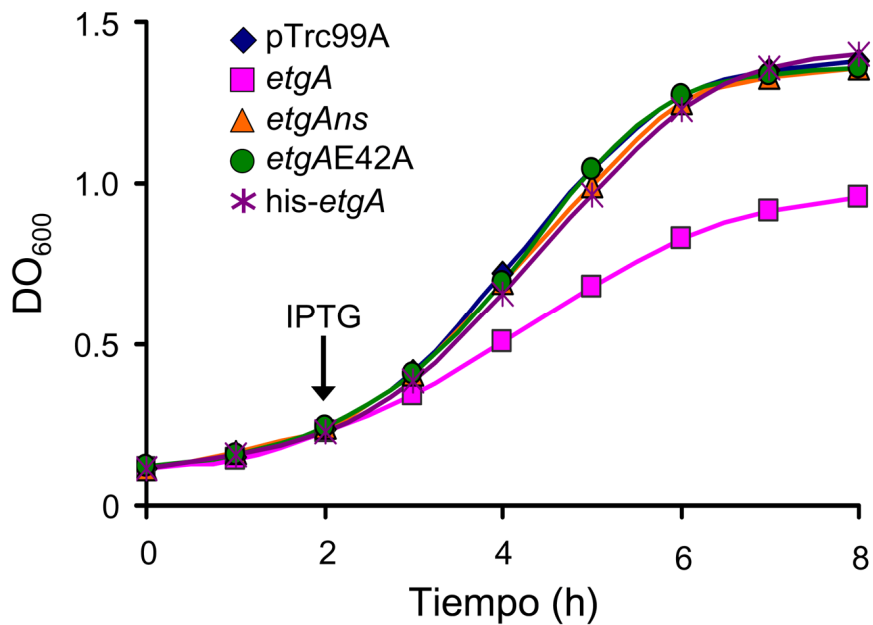


Figura 15. **Efecto de la sobreproducción de distintas versiones de EtgA sobre el crecimiento de EPEC.** Se sobreprodujeron las proteínas EtgA, EtgAns, EtgAE42A y His-EtgA en cultivos de EPEC silvestre. Se utilizó como control EPEC con el vector pTrc99AFF4. Se indica el tiempo de inducción con IPTG 1 mM. Se determinó la DO₆₀₀ de los cultivos durante cada hora de incubación hasta 6 horas después de inducir.

Al analizar en un gel de acrilamida las proteínas precipitadas del sobrenadante del cultivo de EPEC silvestre se observan a las proteínas translocadoras EspA, EspB y EspD, así como a la proteína autotransportadora EspC, que se secreta de manera independiente del SST3 (Figura 16, panel superior). Otra proteína que corresponde al perfil normal de secreción de EPEC es el efector Tir, que se observa por inmunodetección (Figura 16, panel intermedio). El mismo perfil de secreción se observa en el cultivo que contiene pTrc99AFF4 al analizarse tanto por tinción con Coomassie como por inmunodetección. Al analizar el sobrenadante del cultivo en el que se sobreprodujo a EtgA, se observaron una serie de proteínas que no corresponden al fenotipo

de secreción tipo III de EPEC silvestre (Figura 16, panel superior). Al hacer inmunodetecciones de éste, se encontraron las proteínas citoplásmicas DnaK y CesT, lo que confirmó que se trataba de lisis celular (Figura 16, panel intermedio).

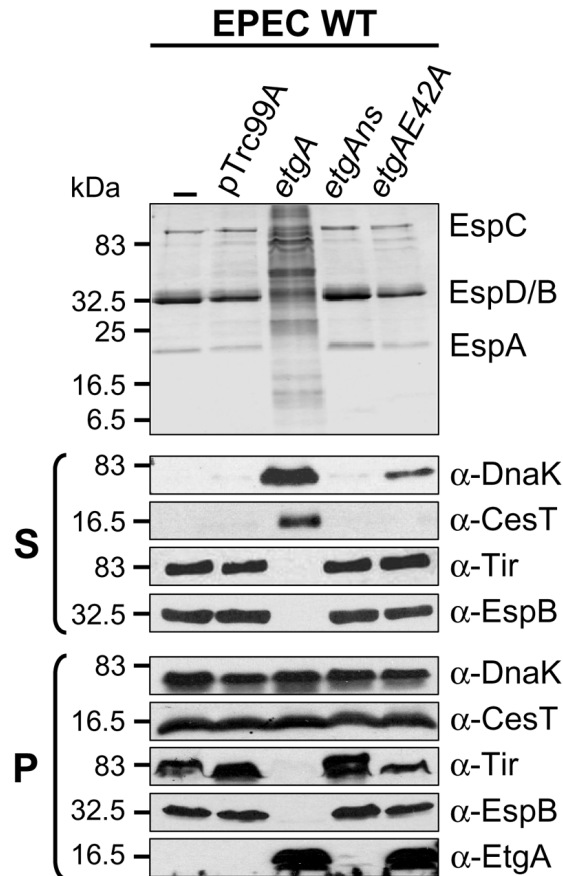


Figura 16. **Análisis de la secreción y producción de proteínas del SST3 al sobreproducir EtgA.** Se sobreprodujeron EtgA, EtgAns y EtgAE42A en EPEC silvestre, como controles se utilizaron cultivos de EPEC silvestre (WT) y EPEC silvestre con pTrc99AFF4. Los cultivos se indujeron durante 4h y se colectó el sobrenadante.. Se realizaron inmunodetecciones con anticuerpos anti-DnaK, anti-CesT, anti-Tir, anti-EspB y anti-EtgA. (S): sobrenadantes, (P): lisados completos.

Al analizar el sobrenadante del cultivo en el que se sobreprodujo EtgAns se determinó que no hay diferencia con respecto al patrón de secreción que EPEC silvestre (Figura 16, panel superior), lo que está de acuerdo con la incapacidad de esta proteína para procesarse y transportarse al periplasma (Figuras 13 y 14). En el caso del cultivo con

sobreproducción de EtgAE42A el perfil de secreción es equivalente al de EPEC silvestre, aunque se detecta una pequeña cantidad de DnaK en el sobrenadante, lo que indica que la versión inactiva de EtgA en el periplasma puede generar un poco de lisis. Sin embargo, los resultados demuestran que el glutamato catalítico es esencial para la capacidad de EtgA de inducir una considerable lisis celular.

Al hacer el análisis de otras proteínas, ni el translocador EspB ni el efector Tir se detectaron en los sobrenadantes del cultivo con EtgA, lo que sugiere que en estas condiciones éstas son inestables y posiblemente se degraden (Figura 16, panel intermedio). Cuando se analizaron las pastillas celulares del mismo cultivo (Figura 16, panel inferior), tampoco se detectan Tir ni EspB lo que también sugiere que están siendo degradadas o bien que se está afectando la expresión de los genes del LEE (ver discusión). En contraste, la producción de las chaperonas DnaK y CesT no se afecta con respecto a su producción en los cultivos control o en los cultivos con EtgAns o EtgAE42A. Se realizó la inmunodetección de EtgA para confirmar que el efecto observado no se debiera a un defecto en la producción de las distintas versiones (Figura 16); EtgAns no se detecta ya que se degrada a partir de las 3 h de inducción (ver Figura 13) y el experimento mostrado se realizó a las 4 h de inducción.

Para determinar de qué forma la actividad de muramidasa de EtgA estaba afectando la producción de proteínas se analizó la estabilidad de Tir, EspB, CesT y CesD2 a distintos tiempos de inducción de la producción de EtgA (Figura 17). Se observó que las chaperonas CesT y CesD2 se producen desde el inicio del cultivo y se mantienen estables hasta las 4h de inducción, mientras que la cantidad de Tir y EspB disminuye a partir de las 2h, tiempo que coincide con el inicio de la lisis celular, que se determinó al detectar a CesT y CesD2 en los sobrenadantes. Este resultado sugiere que el efecto observado sobre las proteínas del SST3 probablemente no se deba a una inhibición de la

transcripción, ya que CesT está codificado en el mismo operón que Tir (LEE5) y CesD2 está codificado en el mismo operón que EspB (LEE4). Además, este resultado sugiere que las chaperonas podrían ser más estables que los sustratos que son secretados por el SST3 (ver discusión).

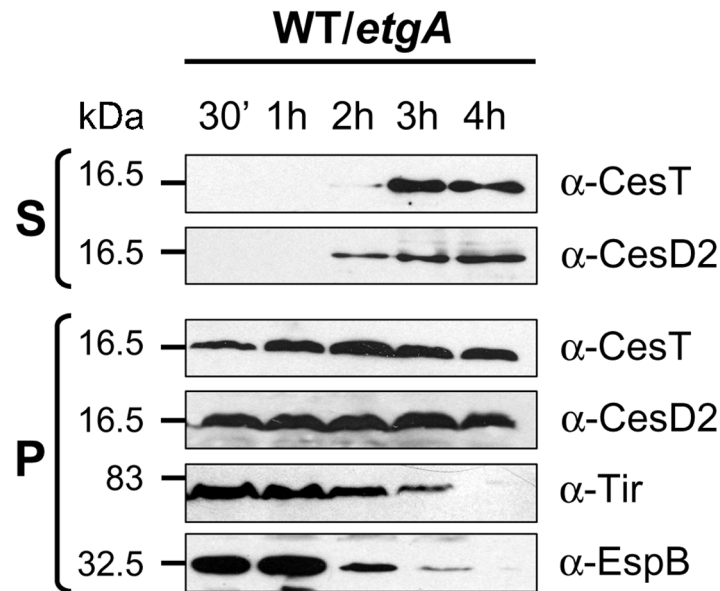


Figura 17. **Estabilidad de proteínas del SST3 al sobreproducir EtgA.** Se analizó la estabilidad de algunas proteínas del SST3 en sobrenadantes (S) y pastillas celulares (P) a distintos tiempos de inducción de la sobreproducción de EtgA en un cultivo de EPEC. Las inmunodetecciones se realizaron con anticuerpos anti-CesT, anti-CesD2, anti-Tir y anti-EspB.

Para establecer si al igual que el transporte al periplasma, la actividad de EtgA es independiente del SST3, se analizaron los sobrenadantes de cultivos de las cepas mutantes $\Delta escN$ y Δler en los que se sobreprodujo EtgA (Figura 18). En los sobrenadantes de ambas cepas mutantes se observa el mismo patrón de lisis que en EPEC silvestre, lo cual se confirmó con la detección de DnaK. Lo anterior indica que la actividad de EtgA en estas condiciones es independiente del SST3.

Al analizar las pastillas celulares de la cepa $\Delta escN$ se observa que, de manera similar a lo que sucede en EPEC silvestre, disminuye la

estabilidad de las proteínas EspA y EspF al producirse la lisis celular. Esto no se observa en la mutante Δler que no produce proteínas del SST3.

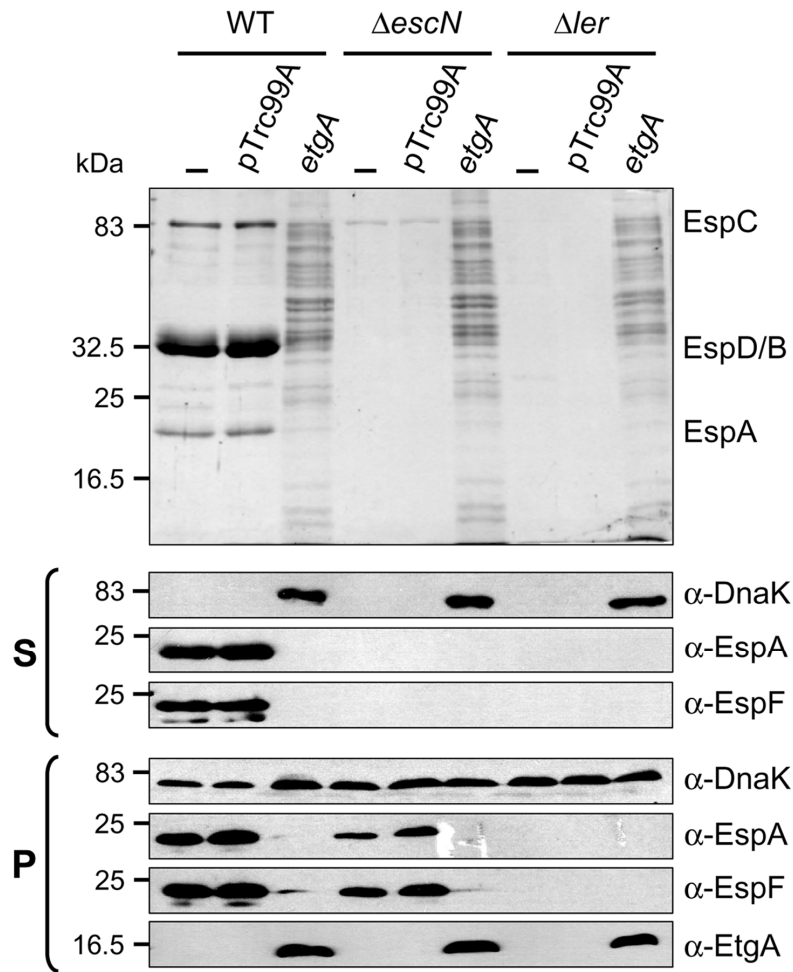


Figura 18. **Lisis celular de cultivos de EPEC $\Delta escN$ y Δler por la actividad de EtgA.** Se sobreprodujo EtgA en EPEC silvestre (WT), $\Delta escN$ y Δler y se analizaron tanto los sobrenadantes (S) como las pastillas celulares (P). Se realizaron inmunodetecciones con anticuerpos anti-DnaK, anti-EspA, anti-EspF y anti-EtgA. Como controles se utilizaron cultivos de las cepas mencionadas con y sin *pTrc99A*.

Efecto de mutaciones en residuos altamente conservados de los motivos GLMQ y AYNAG sobre la actividad de EtgA

En los motivos conservados de las Tls ES-GLMQ-AYNAG existen aminoácidos altamente conservados, que se observan al hacer un alineamiento de todas las proteínas de la familia SLT reportadas en la base de datos Pfam (PF01464; Figura 19). En el motivo ES el aminoácido invariable es el glutamato catalítico, mientras que en los motivos GLMQ y AYNAG los residuos más conservados son la glutamina y la tirosina, respectivamente.

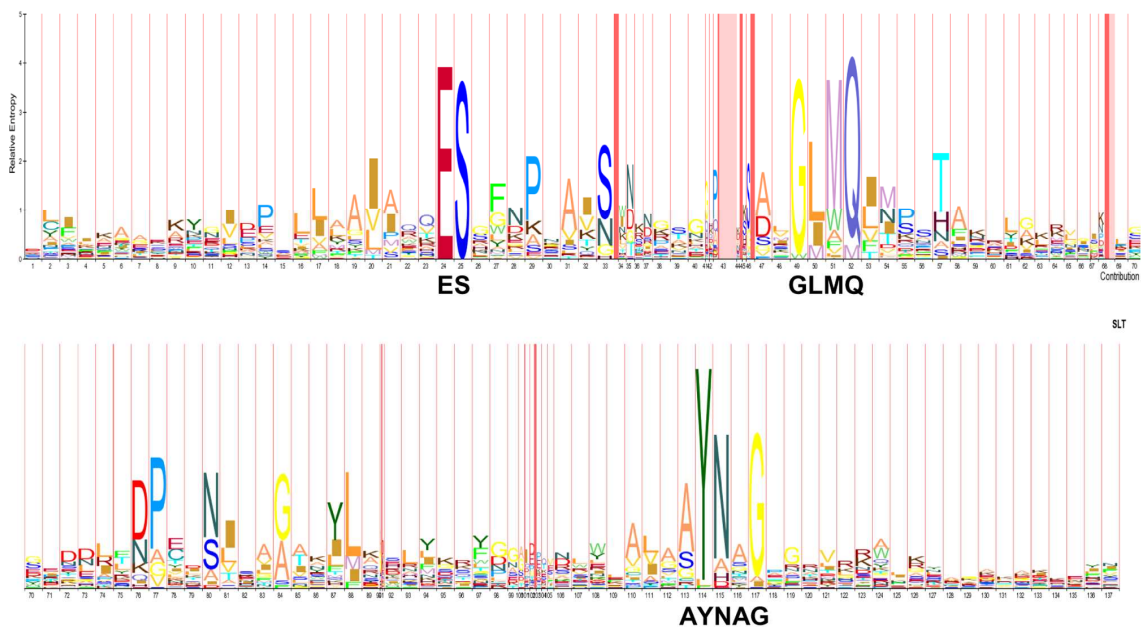


Figura 19. **Representación gráfica del alineamiento de las proteínas de la familia SLT.** Se indica el grado de conservación de los aminoácidos con distintos tamaños de letra, las letras de mayor tamaño indican mayor conservación. Se señalan los motivos conservados ES-GLMQ-AYNAG (HMM logo, base de datos Pfam).

Para determinar la importancia de la glutamina y la tirosina en la actividad de EtgA se sustituyeron estos aminoácidos en sus correspondientes posiciones 65 y 116 por un residuo de alanina. Como parte de los antecedentes experimentales, se analizó *in vitro* (zimogramas) la actividad muralítica de versiones recombinantes con estas sustituciones (His-EtgAnsQ65A y His-EtgA Y116A) y se observó que

éstas aún presentan actividad de degradación de peptidoglicano (García-Gómez 2007).

En el presente trabajo se evaluó la importancia de los residuos Q65 y Y116 *in vivo*. Al sobreproducir la proteína EtgAY116A en EPEC silvestre se observó una inhibición del crecimiento del cultivo, aunque el efecto es un poco menos severo que al sobreproducir EtgA silvestre. Por otro lado, la sobreproducción de EtgAQ65A induce una reducción más drástica en el crecimiento de EPEC silvestre al compararse con la reducción inducida por EtgA (Figura 20), lo que sugiere que el residuo Q65 pudiera ser importante en la regulación de la actividad de la enzima (ver discusión).

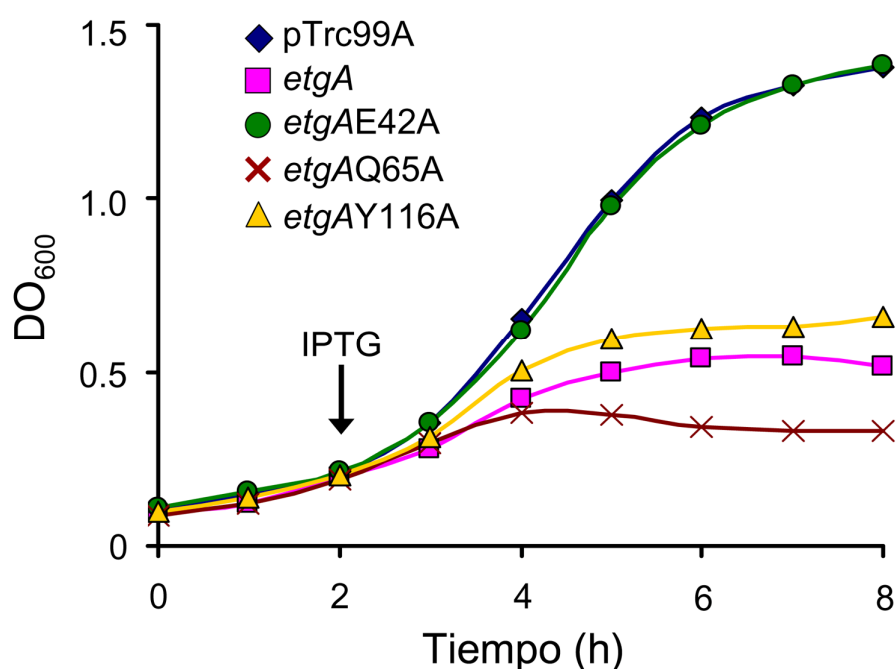


Figura 20. **Efecto de la sobreproducción de las variantes EtgAQ65A y EtgAY116A en el crecimiento de EPEC.** Se sobreprodujeron en EPEC silvestre las proteínas EtgA, EtgAE42A, EtgAQ65A y EtgAY116A, se utilizó como control un cultivo con pTrc99AFF4. Se monitoreó la DO₆₀₀ de los cultivos durante cada hora de incubación. Se indica con una flecha el momento en el que se indujo la sobreproducción de las variantes de EtgA. El experimento se repitió 3 veces y los resultados son reproducibles.

Al analizar los sobrenadantes de los cultivos en los que se sobreprodujeron las versiones modificadas de EtgA (E42A, Q65A y Y116A) se observó que tanto EtgAQ65A como EtgAY116A provocan lisis celular de forma similar a EtgA, lo que se determinó por la detección de DnaK. Además, como en el caso de EtgA, la actividad de lisis afecta la estabilidad de las proteínas Tir y EspB (Figura 21).

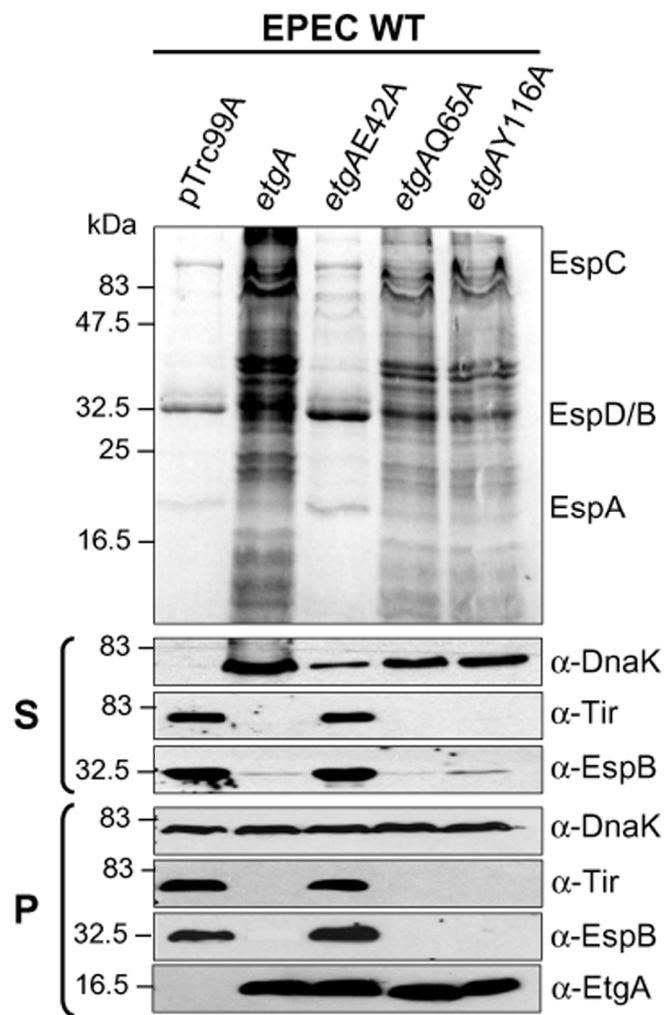


Figura 21. **Análisis de la secreción y producción de proteínas del SST3 al sobreproducir EtgAQ65A y EtgAY116A.** Se sobreprodujeron EtgA, EtgAE42A, EtgAQ65A y EtgAY116A en EPEC silvestre, como control se usó un cultivo de EPEC silvestre con pTrc99AFF4. Se realizaron inmunodetecciones con anticuerpos anti-DnaK, anti-Tir, anti-EspB y anti-EtgA. (S): sobrenadantes, (P): pastillas celulares .

Generación de la mutante $\Delta etgA$ en EPEC y caracterización de su fenotipo de secreción de proteínas

Para determinar la importancia de EtgA para el SST3 de EPEC se realizó una eliminación en fase del gen correspondiente, utilizando el sistema de la recombinasa Red del fago λ (Datsenko y Wanner 2000). Para generar dicha mutante se eliminó un segmento de 273 pb (Figura 22), equivalente a la región eliminada en una mutante de *etgA* en *C. rodentium* (Deng et al. 2004), y se sustituyó por un casete de resistencia a kanamicina. Inicialmente, el casete de kanamicina mencionado se introdujo en el mismo sentido en el que se encuentran codificados los genes del operón LEE1 (representado por el último gen, *escU*) y del operón *grlRA*; esta mutante se denominó $\Delta etgA::kan$ (Figura 22b).

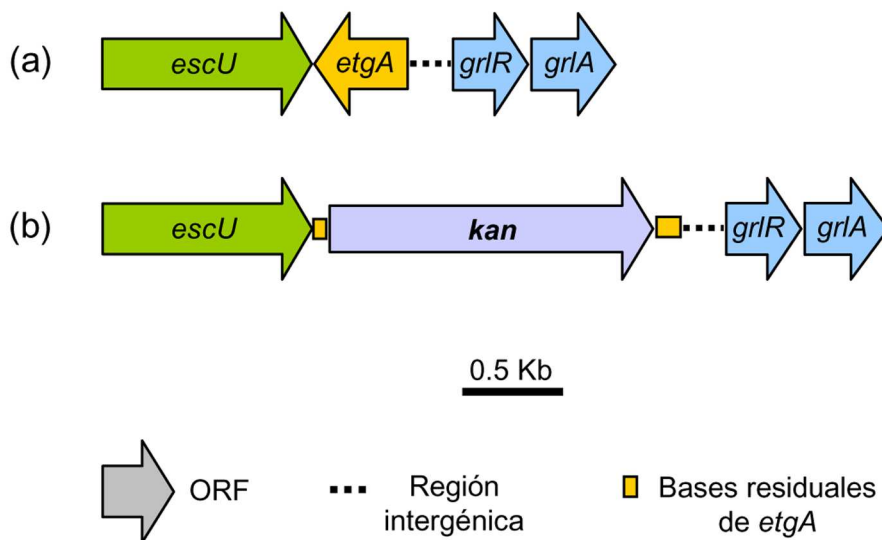


Figura 22. **Representación esquemática de la mutante $\Delta etgA::kan$ generada por medio del sistema de la recombinasa Red del fago λ .** a) Contexto genómico de *etgA* en el LEE de EPEC silvestre.. Se indica la orientación de los genes, los cuales se representan a escala. b) Mutante $\Delta etgA::kan$, en la que se eliminaron las bases de *etgA* correspondientes a los codones 41-131, se muestra la orientación del casete de kanamicina (*kan*) y las bases residuales de *etgA* (en amarillo).

Al analizar el fenotipo de secreción de proteínas del SST3 de la mutante $\Delta etgA::kan$ se observó que presenta una secreción de proteínas reducida con respecto a EPEC silvestre. Aparentemente esta reducción no se debió a un defecto en la producción de proteínas, lo que se determinó por medio de inmunodetecciones de Tir, EspB y EspA en las pastillas celulares de los cultivos (Figura 23).

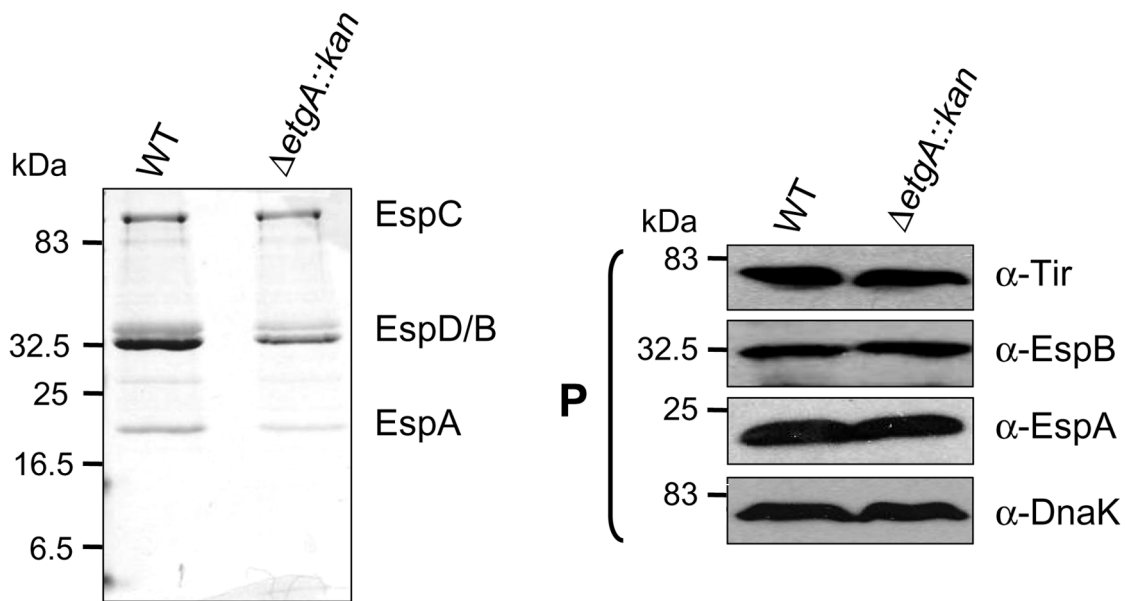


Figura 23. **Perfil de secreción de la mutante $\Delta etgA::kan$.** Se analizó la secreción de proteínas de EPEC silvestre (WT) y de la cepa $\Delta etgA::kan$ en un gel de acrilamida-SDS 15% teñido con azul de Coomassie. Se analizaron las proteínas de las pastillas celulares (P) con anticuerpos anti-Tir, anti-EspB, anti-EspA y anti-DnaK.

En distintos ejemplos de eliminaciones de genes en TLs, los fenotipos parciales o débiles que se observan, se explican a través de una posible redundancia funcional entre estas enzimas (Koraimann 2003). En este trabajo buscamos una explicación al fenotipo de reducción en la secreción de la cepa $\Delta etgA::kan$. Inicialmente, considerando la hipótesis de redundancia funcional se hizo una búsqueda de las TLs codificadas en el genoma de EPEC (FM180568) con base en la secuencia de *EtgA*, para lo cual se utilizó el programa BLASTP (disponible

en <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Las TLs que se identificaron se enlistan en la Tabla 4.

Tabla 4. Comparación de TLs codificadas en el genoma de EPEC con EtgA.

Proteína*	% identidad**	% similitud**	Secuencia señal/corte predicho***
BfpH (B7UT0)	30.1	49.1	Sí/entre residuos 22 y 23
EmtA (B7UQ77)	21.7	32.8	Sí/entre 19 y 20
MltC (B7UI10)	17.7	30.4	Sí/ entre 23 y 24
MltD (B7UJA7)	11.2	19.6	Sí/ entre 26 y 27
Slf (B7UR22)	19.4	27.7	Sí/ entre 27 y 28
YfhD (B7UGZ8)	21.3	31	No se predice

*Se indica entre paréntesis el número de acceso de la base Swiss-Prot; ** porcentajes al comparar con EtgA; *** predicción con el programa SignalP 3.0.

Debido a que de estas proteínas BfpH presentó los mayores porcentajes de identidad y similitud con EtgA (30.1 y 49.1%, respectivamente), se consideró que tendría la mayor posibilidad de sustituir la función de EtgA en caso de que el fenotipo de reducción en la secreción de proteínas se debiera a redundancia funcional. BfpH es una proteína de 16.4 kDa codificada en el plásmido EAF de EPEC, plásmido que contiene los genes necesarios para la biogénesis del pilus BFP (Giron et al. 1991; Anantha et al. 2000). En un alineamiento con EtgA, se observa que BfpH comparte los residuos altamente conservados dentro de cada motivo de las TLs, entre ellos el glutamato catalítico (Figura 24). Adicionalmente, se predice que BfpH posee una secuencia señal con un sitio de corte probable entre los residuos 22 y 23 [SignalP 3.0 (Bendtsen et al. 2004); dato no mostrado]. Otro dato que apoya la posibilidad de que BfpH pudiera suplir la función de EtgA es que el operón *bfp* se expresa en las mismas condiciones en que se induce la expresión de los genes del LEE

(Mellies et al. 2007). Asimismo, PerC, que también se codifica en el plásmido EAF y se produce al mismo tiempo que el activador del operón *bfp* (PerA), activa la transcripción de *ler*, asociando así la expresión de los genes *bfp* con los genes del LEE (Mellies et al. 1999; Bustamante et al. 2001). De esta forma BfpH resultó el mejor candidato a evaluar.



Figura 24. **Alineamiento de EtgA con BfpH.** Se muestran los residuos idénticos en negro y los residuos conservados en gris. Se señalan con un asterisco los residuos altamente conservados dentro de cada motivo conservado de las Tls. El alineamiento se realizó con el programa ClustalW 2.0 (Thompson et al. 1994).

Para determinar si BfpH podía sustituir la función de EtgA en el SST3 se generó la mutante $\Delta etgA::kan$ en la cepa JPEP30, que es una cepa curada del plásmido EAF (EPEC EAF-), y por lo tanto carente de *bfpH*, originando así una doble mutante *etgA bfpH* denominada $\Delta etgA::kanEAF-$. Debido a que la cepa EAF- no secreta proteínas del SST3 en condiciones estáticas (incubación en CO₂ 5%) (Kenny y Finlay 1995), los cultivos para analizar el fenotipo de la mutante $\Delta etgA::kanEAF-$ se hicieron en agitación, ya que el regulador GrlA es el que activa a *ler* en estas condiciones (Bustamante et al. No publicado). De manera similar a la mutante $\Delta etgA::kan$, esta cepa sólo presentó una reducción en la secreción de proteínas con respecto a la cepa EAF- (Figura 25).

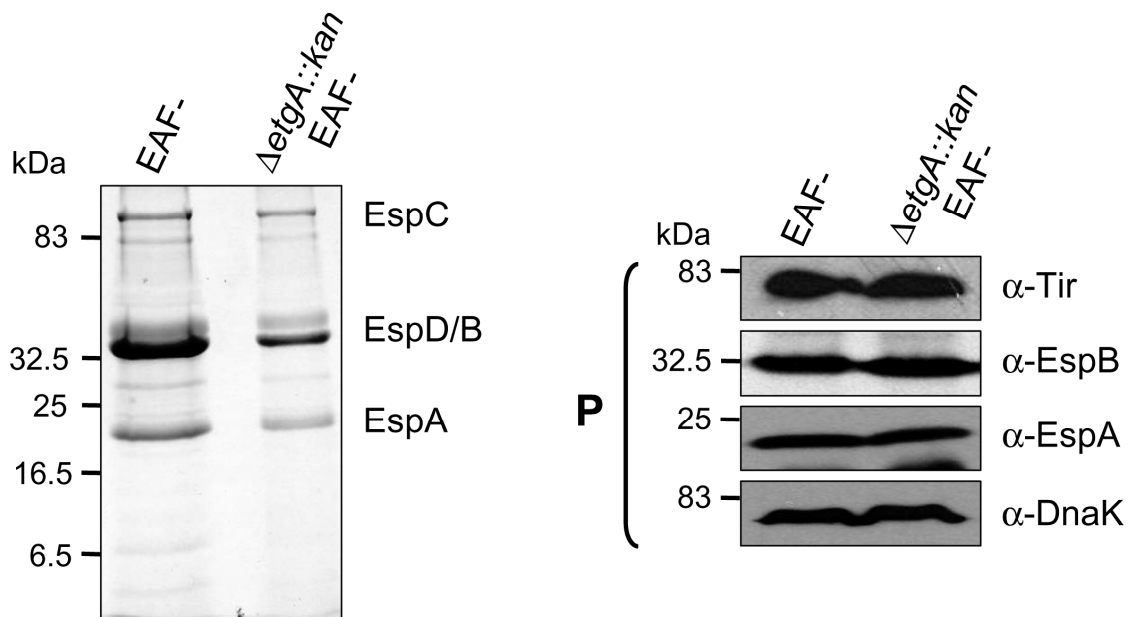


Figura 25. **Perfil de secreción de la mutante $\Delta etgA::kanEAF-$.** Se analizó la secreción de proteínas en agitación de las cepas EPEC EAF- y $\Delta etgA::kanEAF-$ en un gel de acrilamida-SDS 15% teñido con azul de Coomassie. Se analizaron las proteínas de las pastillas celulares (P) con anticuerpos anti-Tir, anti-EspB, anti-EspA y anti-DnaK.

Sin embargo, al analizar las proteínas de los sobrenadantes de la mutante $\Delta etgA::kanEAF-$ cultivada en condiciones estáticas (CO_2 5%, 37°C), condición en la que el regulador PerC del plásmido EAF activa a *ler* y por lo tanto no debe haber secreción (Bustamante et al. No publicado), se observó que la mutante presentó un aumento en la secreción de proteínas con respecto a la cepa EPEC EAF- cultivada en las mismas condiciones (Figura 26, panel izquierdo). Al analizar las pastillas celulares se determinó que este aumento en la secreción se debió a un incremento en la producción de proteínas (Figura 26, panel derecho). Este incremento en la expresión se atribuyó al sentido en el cual está codificado el casete de resistencia a kanamicina (Figura 22b), ya que está bajo el control de un promotor fuerte y no existen terminadores transcripcionales, lo que posiblemente indujo la expresión del operón adyacente *grlRA*, en el cual están codificados GrlA y GrlR, los reguladores positivo y negativo de *ler*, respectivamente. A pesar de que se estén sobreproduciendo ambos reguladores, el incremento en la

producción de EspB, EspA y Tir sugiere que se está favoreciendo la activación de *ler*, ya que se ha propuesto que GrIR lleva a cabo su función de represión de acuerdo a las condiciones de crecimiento de EPEC, principalmente en medio LB (Jiménez-Mejía 2010).

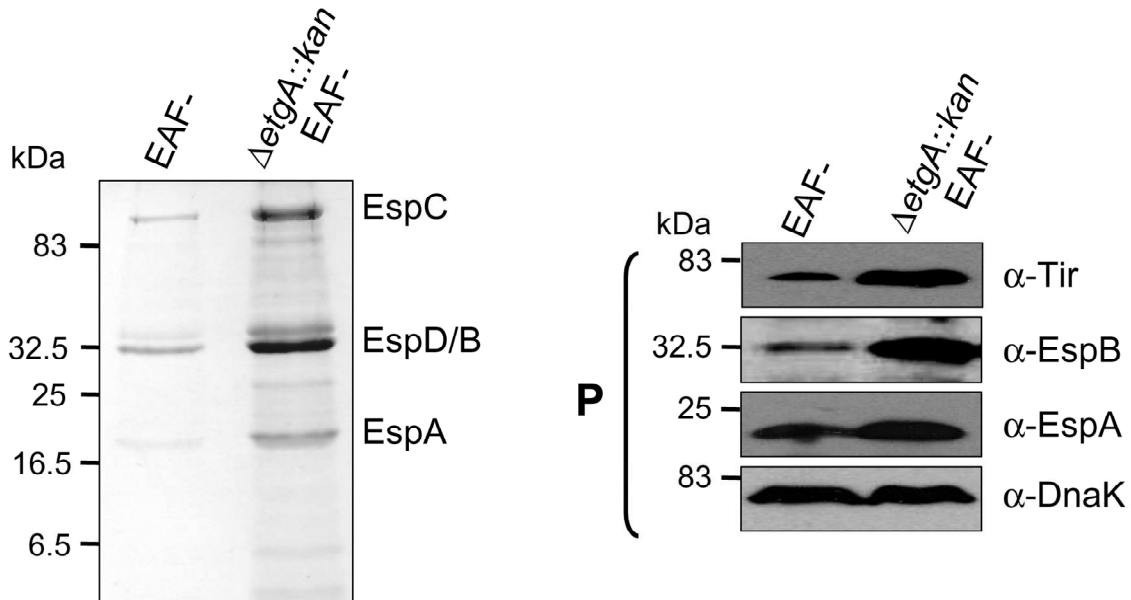


Figura 26. **Perfil de secreción de la mutante $\Delta etgA::kanEAF-$ en condiciones estáticas.** Se analizó la secreción de proteínas de las cepas EPEC EAF- y $\Delta etgA::kanEAF-$ cultivadas en CO₂ 5% en un gel de acrilamida-SDS 15% teñido con azul de Coomassie. Se analizaron las proteínas de las pastillas celulares (P) con anticuerpos anti-Tir, anti-EspB, anti-EspA y anti-DnaK.

Para evitar el efecto de la expresión del casete de resistencia sobre la expresión de los genes del LEE se generó una nueva mutante, en la que también se eliminaron las bases correspondientes a los codones 41-131 de *etgA*, sin embargo en ésta el casete de resistencia a kanamicina se insertó en el mismo sentido que está codificado *etgA*, esta mutante se denominó $\Delta etgA::kanr$ (Figura 27b).

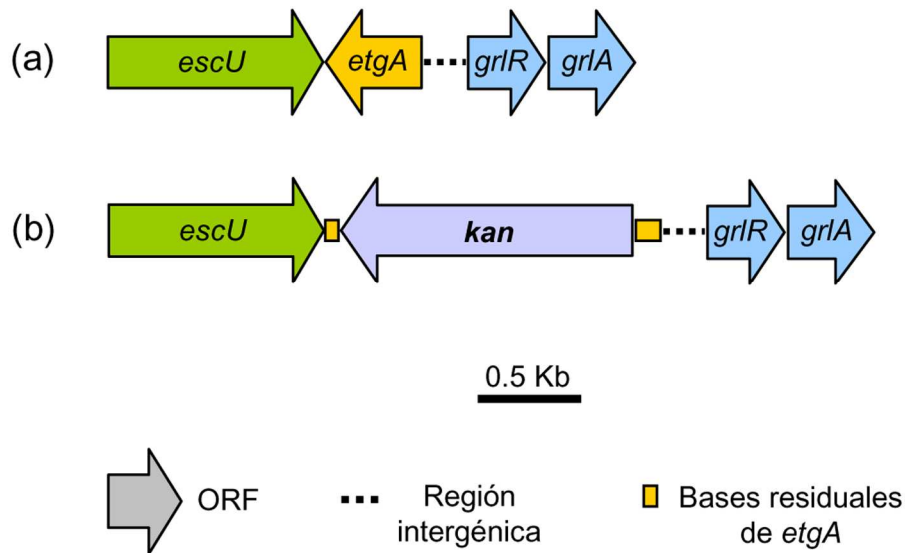


Figura 27. **Representación esquemática de la mutante $\Delta etgA::kanr$ generada por medio del sistema de la recombinasa Red del fago λ .** a) Contexto genómico de *etgA* en el LEE de EPEC silvestre. Los genes se representan a escala. b) Mutante $\Delta etgA::kanr$, en la que se eliminaron las bases de *etgA* correspondientes a los codones 41-131, se muestra la orientación del casete de kanamicina (*kan*) y las bases residuales de *etgA* (en amarillo).

Para verificar que en la cepa $\Delta etgA::kanr$ no se indujera un incremento en la producción de proteínas, se generó esta mutante en el fondo EAF- ($\Delta etgA::kanrEAF-$) y se cultivó en CO₂ 5% para analizar la secreción en los sobrenadantes. En este caso no se observó un incremento en la secreción de proteínas con respecto a la cepa EPEC EAF-, por lo que se consideró que en esta mutante el sentido del casete de resistencia a kanamicina no tuvo ningún efecto en la expresión de otros genes del LEE (Figura 28).

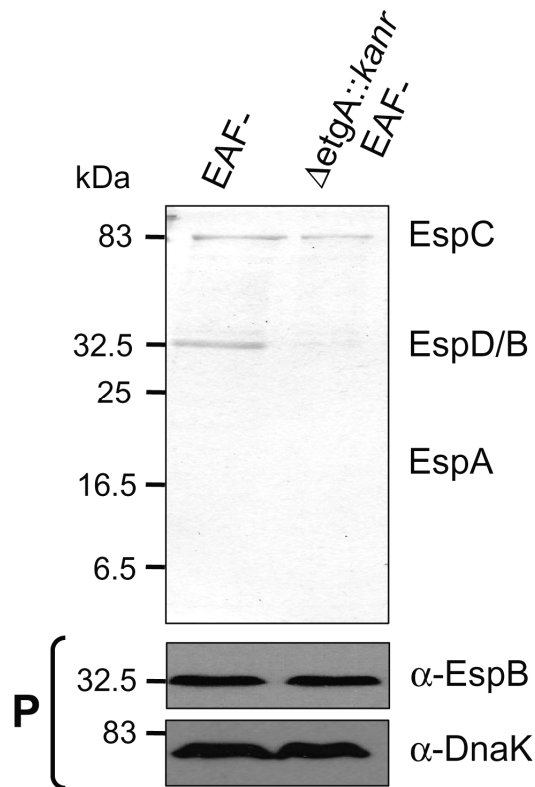


Figura 28. **Perfil de secreción de la mutante $\Delta etgA EAF^-$ en condiciones estáticas.** Se analizó la secreción de proteínas en CO₂ 5% de la cepa EPEC EAF⁻ y de la mutante $\Delta etgA::kanr EAF^-$ en un gel de acrilamida-SDS 15% teñido con azul de Coomassie. Se analizaron las pastillas celulares (P) con anticuerpos anti-EspB y anti-DnaK.

Una vez que se determinó que el casete de resistencia no alteró la producción de proteínas del SST3, se procedió a analizar nuevamente el fenotipo de la mutante $\Delta etgA::kanr$. Se observó que presentó una reducción en la secreción de proteínas del SST3 con respecto a EPEC silvestre, lo que se verificó con inmunodetecciones de los efectores Tir y EspF. También se comprobó que esta reducción no se debiera a una disminución en la cantidad de proteínas producida, por medio de la detección de EspF, Tir, EspA y EspB en las pastillas celulares (Figura 29). Este resultado indica que la proteína EtgA es necesaria para la formación del SST3, sin embargo no es indispensable para que ocurra este proceso.

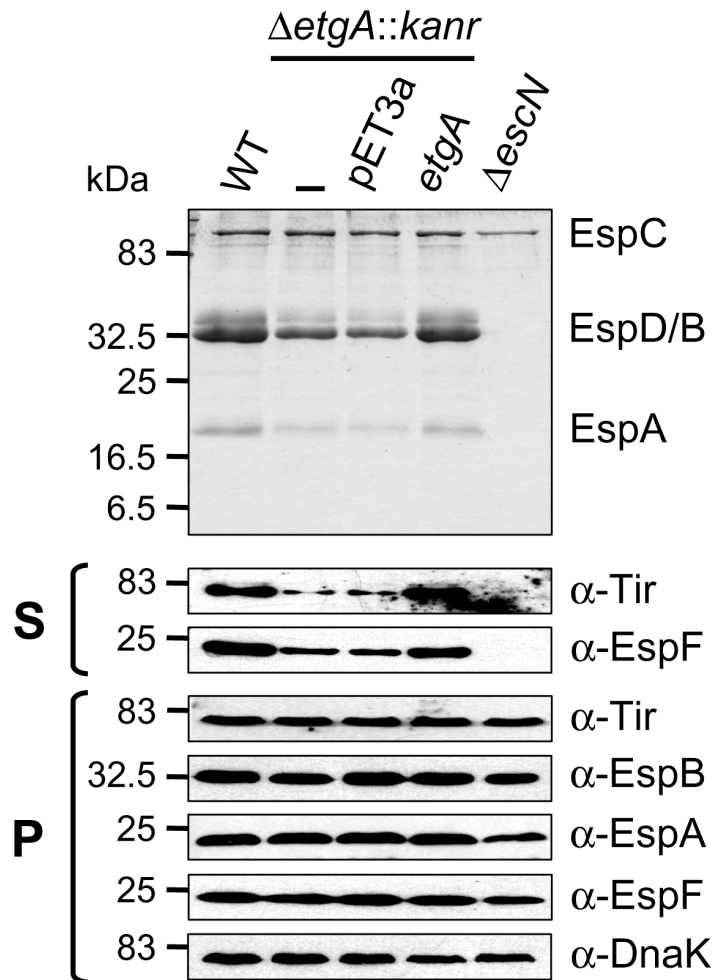


Figura 29. **Fenotipo de secreción de la mutante $\Delta etgA::kanr$.** Secreción de proteínas del SST3 por las cepas EPEC silvestre (WT), $\Delta etgA::kanr$ (-), $\Delta etgA::kanr$ conteniendo el vector pET3a y complementada con *etgA* en pET3a (pEE3a*etgA*). La mutante $\Delta escN$ se utilizó como control negativo. EspC es una proteína autotransportadora que no se secreta por el SST3. Se realizaron inmunodetecciones de proteínas del SST3 (efectores Tir y EspF, translocadores EspB y EspA) y de DnaK. (S): sobrenadantes, (P): lisados completos.

Para cuantificar la cantidad de proteínas secretadas por la mutante $\Delta etgA$ se realizó un análisis densitométrico de EspC (control) EspB y EspA sobre geles de acrilamida, utilizando el sistema Alpha Digi-Doc RT (Alpha Innotech). De esta manera se determinó que la reducción en la secreción de proteínas en la mutante $\Delta etgA$ es de aproximadamente 50% con respecto a la cepa silvestre (Figura 30).

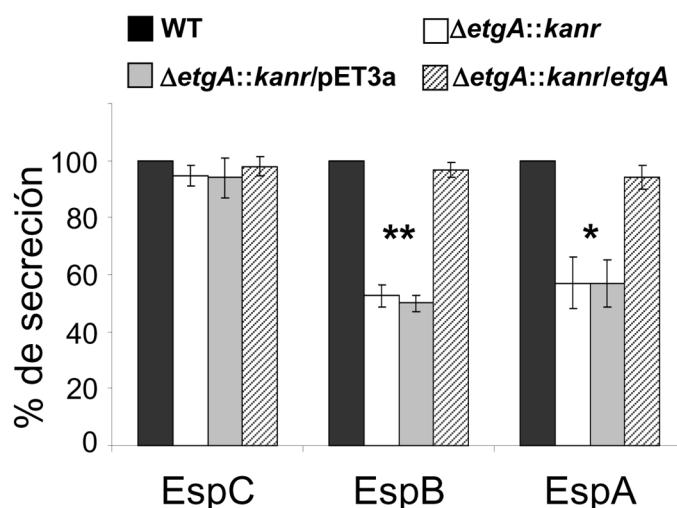


Figura 30. **Análisis densitométrico de las proteínas secretadas por la mutante $\Delta etgA::kanr$.** Se analizó sobre geles de acrilamida-SDS la cantidad de EspC, EspB y EspA secretadas por las cepas EPEC silvestre (WT), $\Delta etgA::kanr$, $\Delta etgA::kanr$ con el vector pET3a y complementada con pEE3aetgA. Los análisis se realizaron por triplicado. *, $P < 0.02$; **, $P < 0.002$ en la prueba estadística t de Student, al comparar con la cepa silvestre.

Por otra parte, se realizó la complementación de $\Delta etgA::kanr$ con *etgA* clonado en un vector de bajo número de copias (pET3a) (para evitar la lisis celular) y con expresión disminuida de *etgA* debido a la ausencia de la polimerasa T7 en EPEC, y de esta forma se logró la recuperación en la secreción de proteínas a niveles silvestres (Figura 29). Esto se corroboró por medio de las inmunodetecciones de Tir y EspF en los sobrenadantes, así como por un análisis densitométrico (Figuras 29 y 30, respectivamente). De esta manera se determinó que en la mutante no se produjo algún efecto polar por la eliminación de *etgA* e introducción del casete de resistencia, y que la disminución en la secreción de proteínas se debe a la ausencia de EtgA.

También se realizó la complementación de la mutante $\Delta etgA::kanr$ con *etgAns* y *etgAE42A* (ambos clonados en el vector pET3a) (Figura 31). Como se esperaba con la versión de EtgAns, al ser incapaz de transportarse al periplasma, no permite la recuperación de la secreción

de proteínas, esto tampoco sucede con la versión inactiva EtgAE42A; lo anterior demuestra la importancia del transporte de EtgA al periplasma de EPEC y de su actividad de muramidasa para la biogénesis del inyectisoma.

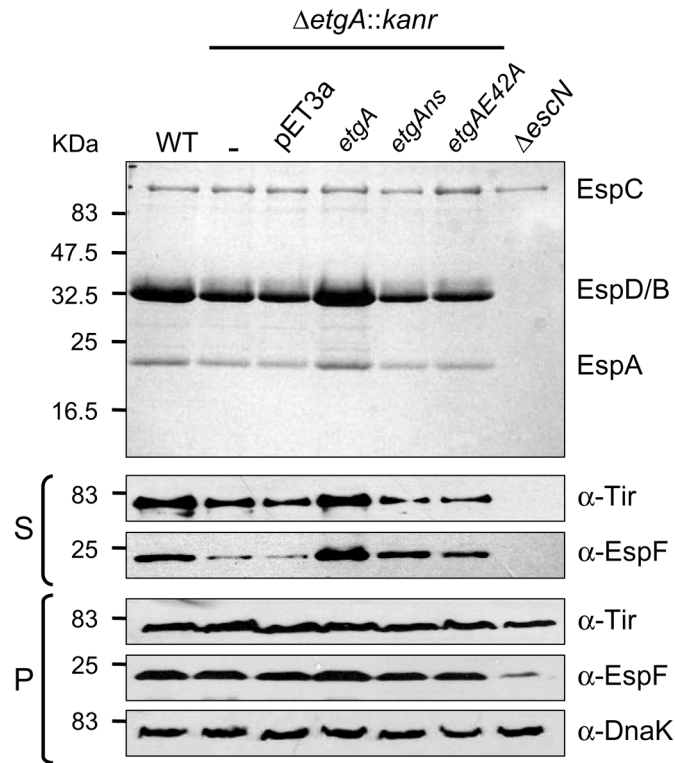


Figura 31. **Complementación de la mutante $\Delta etgA::kanr$ con distintas versiones de *etgA*.** Secreción de proteínas del SST3 por las cepas EPEC silvestre, $\Delta etgA::kanr$ (-), $\Delta etgA::kanr$ con el vector pET3a y $\Delta etgA::kanr$ complementada con *etgA*, *etgAns* y *etgAE42A* (en pET3a). La mutante $\Delta escN$ se utilizó como control negativo. Se realizaron inmunodetecciones de Tir, EspF, y DnaK. (S): sobrenadantes, (P): lisados completos.

Capacidad de hemólisis de la mutante $\Delta etgA::kanr$

Para completar la caracterización del fenotipo de la mutante $\Delta etgA::kanr$ se analizó su capacidad de lisar eritrocitos (Warawa et al. 1999; Ide et al. 2001). Para ello se incubaron eritrocitos con EPEC silvestre y con la mutante $\Delta etgA::kanr$ sin plásmido, con pET3a, o pEE3a*etgA*. Como control negativo se incubaron eritrocitos con la mutante $\Delta escN$.

La hemólisis inducida por cada cepa se determinó por medio de la detección de hemoglobina en los sobrenadantes. Se determinó que la mutante $\Delta etgA::kanr$ provoca una hemólisis de alrededor del 60% de la que genera la cepa silvestre. La capacidad de lisis de eritrocitos se recuperó al complementar con la construcción pEE3aetgA (Figura 32).

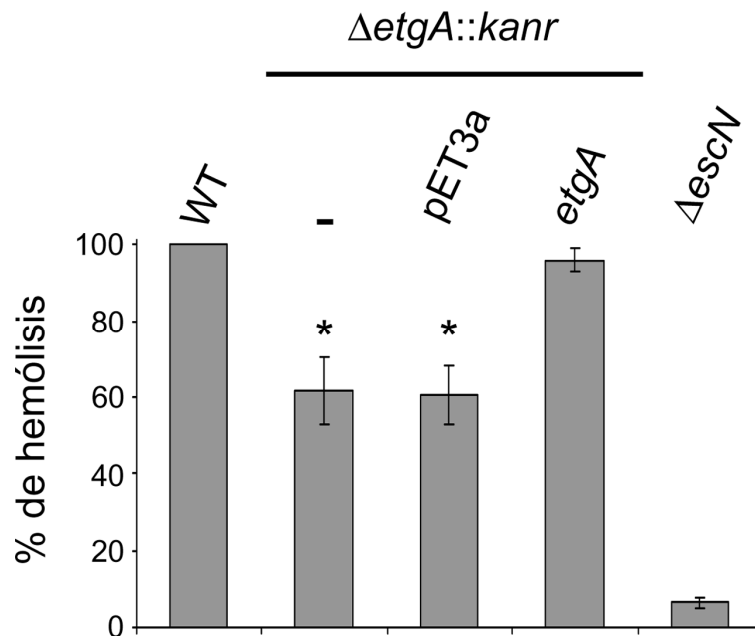


Figura 32. **Hemólisis producida por la mutante $\Delta etgA::kanr$.** Se analizó la capacidad de hemólisis de las cepas EPEC silvestre (considerada como 100%), $\Delta etgA::kanr$, $\Delta etgA::kanr$ conteniendo el vector pET3a y $\Delta etgA::kanr$ complementada con pEE3aetgA. La mutante $\Delta escN$ se utilizó como control negativo. Se analizó la hemoglobina liberada al medio a DO_{450} . Los ensayos se realizaron por triplicado. *, $p < 0.02$ en la prueba estadística t de Student, al comparar con la cepa silvestre.

Purificación de filamentos EspA de la mutante $\Delta etgA::kanr$

Los fenotipos reducidos de secreción de proteínas y de hemólisis de la mutante $\Delta etgA::kanr$ sugieren que los inyectisomas son capaces de atravesar la pared celular y ensamblarse de manera normal, aunque en un número reducido. Para verificar si existe un menor número de inyectisomas en esta mutante, se realizó la purificación del filamento

EspA de su superficie. Al analizar la cantidad de la proteína EspA purificada de la mutante $\Delta etgA::kanr$ en un gel de acrilamida-SDS, se observó que está disminuida respecto a la purificada de la cepa silvestre, lo que también se corroboró por inmunodetección. Como control negativo se utilizó la cepa $\Delta escN$, en la cual no se detectó EspA (Figura 33).

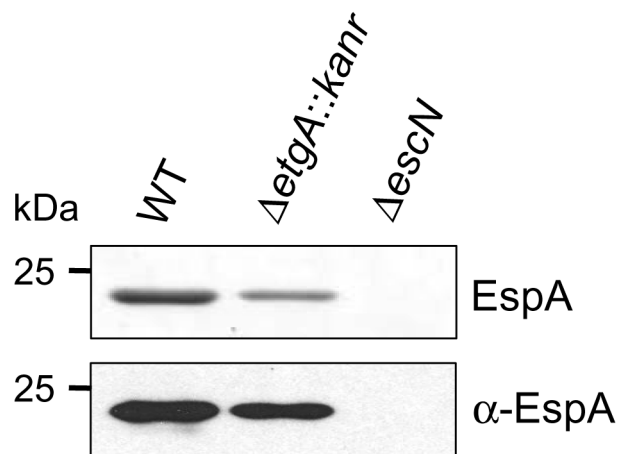


Figura 33. **Purificación de filamentos EspA de EPEC.** Se observa la cantidad de EspA ensamblada en EPEC WT, y las mutantes $\Delta etgA::kanr$ y $\Delta escN$. En el panel superior se muestra un gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie con la proteína purificada; en el panel inferior se muestra una inmunodetección con anticuerpos dirigidos contra EspA.

Este resultado indica que, tal como se esperaba, hay menos inyectisomas completamente ensamblados en la mutante $\Delta etgA$, aunque éstos son funcionales, pues son capaces de secretar proteínas y de inducir hemólisis.

Fenotipo de secreción de proteínas de la mutante $\Delta etgA::kanr$ EAF-

Para determinar si BfpH es capaz de sustituir a EtgA, se analizó el fenotipo de secreción de la mutante $\Delta etgA::kanr$ EAF- en agitación. En este caso también se observó sólo una reducción en la secreción de proteínas con respecto a la cepa silvestre, lo que se comprobó con la

inmunodetección de Tir y EspF. Además, es posible recuperar la secreción de proteínas por medio de complementación con la construcción pEE3aetgA (Figura 34).

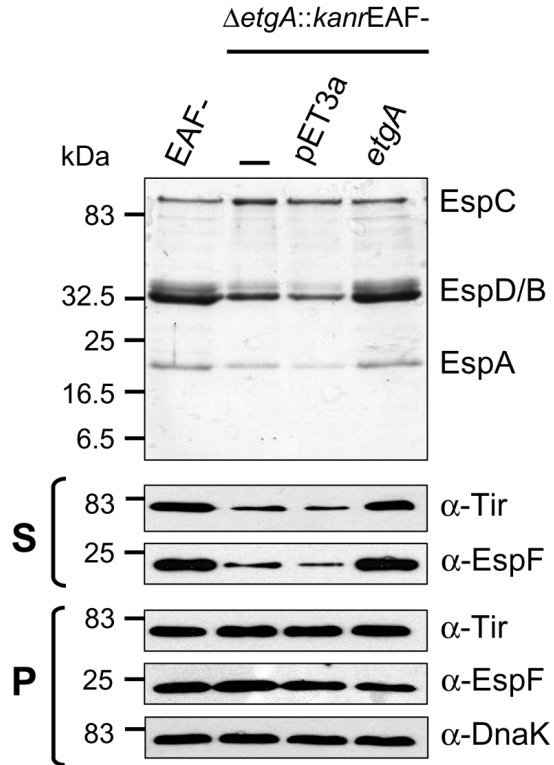


Figura 34. **Fenotipo de secreción de la mutante $\Delta etgA::kanrEAF-$.** Secreción de proteínas del SST3 por la cepa EPEC EAF-, la mutante $\Delta etgA::kanrEAF-$ (-), la mutante $\Delta etgA::kanrEAF-$ con el vector pET3a y complementada con pEE3aetgA. Se realizaron inmunodetecciones de Tir, EspF y DnaK. (S): sobrenadantes, (P): lisados completos.

Este resultado demuestra que BfpH no sustituye la función de EtgA en el SST3, por lo tanto el fenotipo observado en la mutante $\Delta etgA::kanr$ no se debe a redundancia funcional entre estas proteínas, sino que confirma que EtgA, como ya se mencionó, no es indispensable para la formación del SST3.

Complementación heteróloga de una mutante $\Delta etgA$ en *C. rodentium*

EtgA se encuentra altamente conservada entre los patógenos A/E, al compararla con EtgA (L0045) de EHEC se determinó que comparten 98% de identidad y 98.7% de similitud, mientras que con EtgA de *C. rodentium* comparte 87.6% de identidad y 92.8% de similitud. Al hacer un alineamiento con las tres proteínas se observa que los aminoácidos correspondientes a los motivos conservados entre las Tls son idénticos (Figura 35).

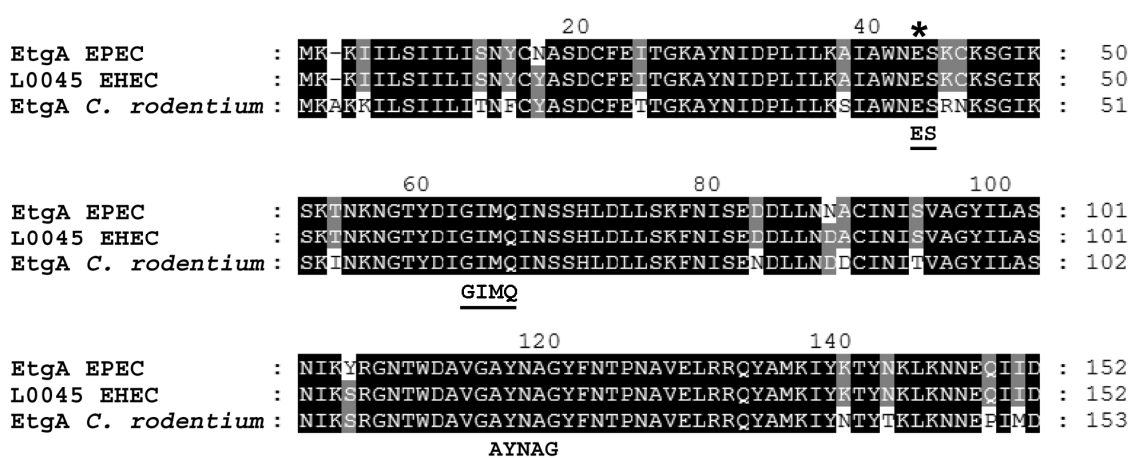


Figura 35. **Alineamiento de EtgA de patógenos A/E.** Se muestra un alineamiento entre EtgA de EPEC, L0045 de EHEC (Q7DB60) y EtgA de *C. rodentium* (Q93FL8) (ClustalW 2.0). Se muestran los residuos idénticos entre las tres proteínas en negro y los residuos conservados en gris. Se indican los motivos ES-GIMQ-AYNAG. El glutamato catalítico se señala con un asterisco.

Debido a los altos porcentajes de identidad y similitud que EtgA de EPEC comparte con EtgA de *C. rodentium* se realizó la complementación de la cepa $\Delta etgA$ de *C. rodentium* con *etgA* de EPEC (Figura 36).

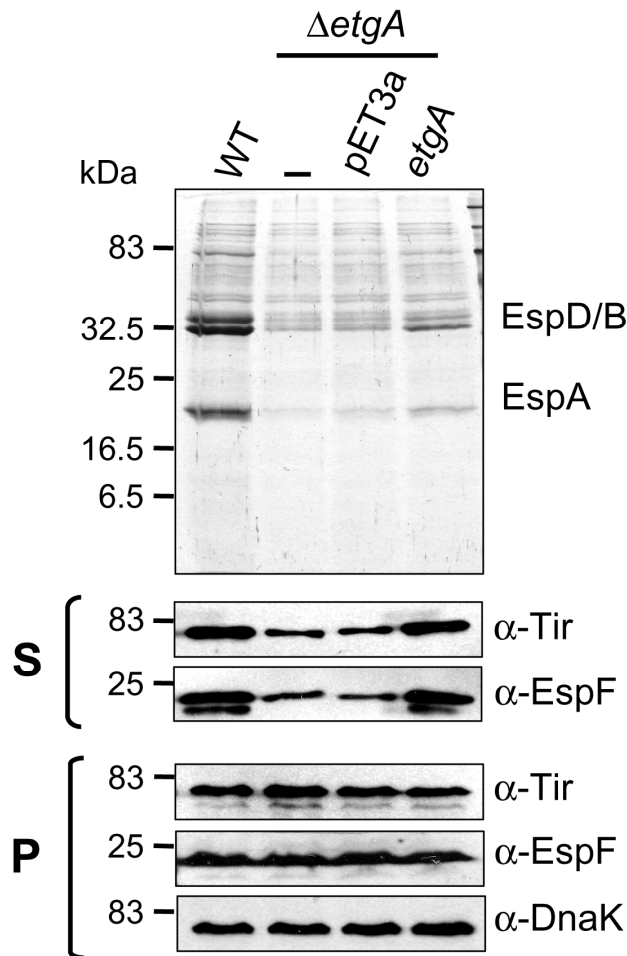


Figura 36. **Complementación de *C. rodentium* $\Delta etgA$ con *etgA* de EPEC.** Secreción de proteínas del SST3 por *C. rodentium* silvestre, la mutante $\Delta etgA$ (-), la mutante $\Delta etgA$ con el vector pET3a y complementada con *etgA* de EPEC en pET3a (pEE3aetgA). Se realizaron inmunodetecciones de Tir, EspF y DnaK. (S): sobrenadantes, (P): lisados completos.

En el perfil de secreción de *C. rodentium* se observan las proteínas translocadoras EspA, EspB y EspD, que se encuentran reducidas en los sobrenadantes de la mutante $\Delta etgA$ con respecto a la cepa silvestre (Deng et al. 2004). Al introducir la construcción pEE3aetgA se logra recuperar ligeramente la secreción de proteínas, lo que se confirmó con la inmunodetección de los efectores Tir y EspF. Aunque la secreción no se recupera a niveles silvestres este resultado muestra que EtgA de EPEC realiza la misma función que EtgA de *C. rodentium* en el SST3.

DISCUSIÓN

Las TLs son un grupo importante de enzimas bacterianas que actúan sobre la capa de peptidoglicano y que participan en una gran variedad de procesos, entre los que se encuentran la generación de espacios para la inserción de nuevas moléculas de muropéptidos en la pared celular durante el crecimiento bacteriano, y la degradación del tabique durante la división celular para permitir la separación de las células hijas (Scheurwater et al. 2008). Estas enzimas también contribuyen a la liberación de muropéptidos implicados en el proceso de infección de patógenos como *B. pertussis*, *N. gonorrhoeae*, *N. meningitidis*, *H. pylori* y *Haemophilus influenzae* (Cloud-Hansen et al. 2006). Asimismo, se ha demostrado la participación de TLs durante la formación de complejos macromoleculares, como pili, flagelo y sistemas de secreción, facilitando su inserción a través de la capa de peptidoglicano; las enzimas que participan en estos procesos se denominaron TLs especializadas, para distinguirlas de las que participan en el metabolismo del peptidoglicano (Koraimann 2003).

En este trabajo proponemos que EtgA es la TL asociada al SST3 de EPEC con base en su localización en el LEE y su similitud con TLs especializadas de diferentes sistemas de secreción, y teniendo como antecedente que en el laboratorio demostramos por primera vez la actividad enzimática *in vitro* de EtgA, se realizó una caracterización funcional para determinar su importancia en el ensamblaje del inyectisoma.

Para llevar a cabo la actividad de degradación de peptidoglicano, las TLs deben localizarse en el periplasma. Entre las TLs especializadas que se han estudiado a la fecha, existen dos formas de transporte a este compartimento celular: utilizando el sistema al que se encuentran asociadas, como por ejemplo la muramidasa FlgJ de *S. enterica* que es exportada a través del SST3 flagelar (Nambu et al. 1999) y las TLs HrpH y

HopP1 de *P. syringae* que son exportadas por el SST3 de virulencia (Oh et al. 2007); o bien, a través del reconocimiento de una secuencia señal por la translocasa Sec, mecanismo que utiliza la proteína VirB1 del SST4 de *A. tumefaciens* (Llosa et al. 2000; Zupan et al. 2007) y P19 del plásmido conjugativo R1 de *E. coli* (Bayer et al. 2000), entre otras. Para algunas muramidasa asociadas con el SST3 como IpgF de *S. flexneri* e IagB de *S. enterica* también se ha predicho una secuencia señal (Allaoui et al. 1993; Zahrl et al. 2005), aunque no se ha demostrado su procesamiento y su transporte al periplasma.

En el caso de EtgA, se predijo la presencia de una secuencia señal en su extremo amino por medio del programa bioinformático SignalP (Bendtsen et al. 2004), y mediante la observación del procesamiento de la proteína (Figura 13) y de su detección en la fracción periplásmica de EPEC (Figura 14), se confirmó experimentalmente su exportación al periplasma en una forma Sec-dependiente. Además, se determinó que el transporte al periplasma es independiente del SST3, observándose el procesamiento de EtgA en una mutante que sólo contiene los componentes del SST3 que se ensamblan vía Sec (Δ escN) (Gauthier et al. 2003; Chen y Frankel 2005; Galan y Wolf-Watz 2006; Zarivach et al. 2007), e incluso en una cepa que no produce SST3 (Δ ler). Esto contrasta con lo que se ha determinado para la secretina EscC, que depende de la presencia de otros componentes del inyectisoma, como EscN y EscV para localizarse correctamente en la membrana externa (Gauthier et al. 2003).

Respecto a las versiones de EtgA que demostramos que no se transportan al periplasma (Figuras 13 y 14), resultó interesante la observación de la inestabilidad de la proteína madura EtgAns en el citoplasma, en contraste con la misma proteína pero que resulta del procesamiento periplásmico, la cual se mantiene estable aún hasta las 24 horas de inducción (dato no mostrado). En este sentido, se ha

sugerido que las Tls tienden a estar mal plegadas y a ser inestables en el citoplasma bacteriano, por lo que son reconocidas por el complejo de chaperonas GroEL/S, a menos que sean exportadas al periplasma por la translocasa Sec (Zahrl et al. 2005). Por otro lado, lo que podría suceder con la versión recombinante His-EtgA es que la etiqueta de histidinas en el extremo amino impida que la translocasa Sec reconozca la secuencia señal. Esto concuerda con el análisis de His-EtgA con el programa SignalP (dato no mostrado), en el que no se predice dicho péptido líder. A su vez, se observó que la etiqueta de histidinas podría conferirle mayor estabilidad a la proteína, detectándose en los últimos tiempos del experimento a pesar de no transportarse al periplasma (Figura 13).

Una vez que se determinó el transporte periplásmico de EtgA, se decidió evaluar el efecto *in vivo* de la actividad muralítica de esta enzima. Se observó que al sobreproducir la proteína EtgA a partir del vector pTrc99AFF4 se inhibe el crecimiento del cultivo de EPEC (Figura 15). Aunque no es aparente que esta reducción se deba a lisis celular, pues la curva de crecimiento no decae completamente, sí hay una disminución considerable en la viabilidad de las bacterias, ya que sólo el 18% de las bacterias son viables en comparación al cultivo control con el vector pTrc99AFF4, lo que se determinó al cuantificar las UFC/ml. La inhibición en el crecimiento de cultivos bacterianos también se ha observado por ejemplo al sobreproducir la TL GP144 del fago ϕ KZ de *P. aeruginosa* (Oh et al. 2007), AtIA del SST4 de *N. gonorrhoeae* (Kohler et al. 2007), HrpH del SST3 de *P. syringae* (Oh et al. 2007) y Hpa2 del SST3 de *X. oryzae* (Zhang et al. 2008). En general con este tipo de enzimas no es evidente una lisis celular masiva en cultivos bacterianos, ya que se propone que actúan degradando la capa de peptidoglicano en una forma localizada. En otro reporte, con la sobreproducción de la proteína P19 se observó una lisis localizada a través de microscopía electrónica de barrido, con la formación de pequeñas lesiones en la

envoltura celular de *E. coli*, por las que se libera material intracelular (Bayer et al. 2001). Esta degradación localizada permitiría que la actividad de estas enzimas se lleve a cabo principalmente en el sitio de formación del sistema de secreción correspondiente, para así mantener la integridad de la pared celular (Scheurwater y Burrows 2011).

Al analizar los sobrenadantes de los cultivos de EPEC en los que se sobreprodujo EtgA se evidenció que la disminución en la viabilidad bacteriana se debe a lisis celular, por medio de la detección extracelular de las chaperonas DnaK, CesT y CesD2 (Figuras 16 y 17). Sin embargo, resultó inesperada la ausencia de proteínas secretadas por el SST3, como Tir y EspB. Lo anterior podría atribuirse a la degradación de los sustratos del SST3 por proteasas periplásmicas al producirse la lisis celular. En este caso las chaperonas podrían ser más estables, como se ha visto para las chaperonas YscG y YscE de la proteína de la aguja YscF en *Y. pseudotuberculosis*, que son resistentes a la degradación proteolítica, mientras que YscF se degrada rápidamente (Sun et al. 2008; Davis et al. 2010).

Para el ensamblaje correcto del SST3 de *S. enterica* se requiere de la interacción de las proteínas PrgK y PrgH (correspondientes a EscJ y EscD en el SST3 de EPEC, respectivamente) con la capa de peptidoglicano (Pucciarelli y Garcia-del Portillo 2003), que funciona como un soporte para el anclaje correcto del sistema a la envoltura celular (Scheurwater y Burrows 2011). Al inducir la alteración de la pared celular por la actividad de EtgA, se afectarían las interacciones de EscJ y EscD con el peptidoglicano y por lo tanto no se ensamblaría correctamente el inyector. De esta forma, al no haber un SST3 funcional los sustratos no serían secretados y podrían sufrir degradación proteolítica. Esta propuesta se apoya en la determinación de que el efector NleH de *C. rodentium* al no secretarse se degrada por la proteasa Lon (García-Angulo et al. 2008). Esto podría explicar porque Tir y EspB (Figura 16), e

incluso EspA y EspF (Figura 18) no se detectan en las pastillas celulares del pequeño porcentaje de bacterias no lisadas que permanece en el cultivo que expresa EtgA, aún cuando existe lisis de la mayoría de las células.

Otra manera de explicar el efecto inducido por la actividad lítica de EtgA en los sustratos del SST3, es por la inhibición en la expresión de los genes del LEE. Existe un sistema de dos componentes, denominado Cpx que se activa en respuesta a estrés en la envoltura celular bacteriana, lo que permite el mantenimiento de la integridad celular. En EPEC, la activación de esta vía induce la reducción de los niveles intracelulares de Tir, EspA y EspB, por medio de la inhibición de la expresión de los operones LEE4 y LEE5. Posiblemente esta inhibición evite el tráfico innecesario de proteínas a través de la envoltura celular hasta que la célula bacteriana logre recuperarse del daño y se adapte a las condiciones adversas (Macritchie et al. 2008).

Aunque la actividad de EtgA pudiera constituir una señal de estrés capaz de inhibir la expresión del LEE a través de la activación de la vía Cpx o de otro sistema de respuesta a estrés en la envoltura celular, como σ^E , nuestros resultados apoyan el argumento de que algunos de los sustratos del SST3 sufren proteólisis, dado que la cantidad de las chaperonas analizadas no se afecta aún cuando se produce la lisis celular (Figura 17). Por otro lado, considerando que CesT y Tir están codificados en el mismo operón (LEE5), y que CesD2 y EspB también están codificados en el mismo operón (LEE4); es probable que de haber una inhibición en la transcripción se afectaría la expresión de los operones completos y no sólo de algunos genes. Alternativamente, podría ocurrir que en el momento justo de producirse la lisis celular se detenga la transcripción de los operones del LEE y que las chaperonas producidas hasta ese momento permanezcan estables durante más tiempo que las proteínas efectoras (Tir y EspF) y translocadoras (EspB y

EspA). Tampoco se puede descartar la posibilidad de que exista algún mecanismo post-transcripcional que afecte la estabilidad de una parte del ARN mensajero de un operón. En el caso del operón LEE4 en EHEC se ha determinado que ocurre un procesamiento post-transcripcional en el que el fragmento que contiene al gen *sepL* es rápidamente degradado, mientras que el fragmento restante permanece estable (Lodato y Kaper 2009).

Ya que las muramidasa se consideran autolisinas, se ha propuesto que una forma de control de la actividad de las Tls es la interacción con otras proteínas, por ejemplo, en el caso de las Tls que participan en el metabolismo del peptidoglicano se plantea que deben actuar en conjunto con las PBPs o enzimas de síntesis, para garantizar que la lisis esté acoplada con la actividad biosintética (Scheurwater et al. 2008). En el caso de FlgJ de *S. enterica* se ha determinado que su localización en el sitio de ensamblaje del flagelo está establecida por su secreción a través de la vía de exportación flagelar, y que en este proceso está involucrada la interacción del extremo amino de la proteína con el eje flagelar (Nambu et al. 1999; Hirano et al. 2001). Para VirB1 del SST4 de *B. suis* se ha demostrado que interactúa con algunos componentes periplásmicos del SST4 como VirB8, VirB9 y VirB11, y se ha sugerido que estas interacciones modulan la actividad de la enzima y la dirigen al sitio de ensamblaje del sistema, previniendo así una degradación deslocalizada de la pared celular y favoreciendo una mayor actividad enzimática en el sitio correcto (Hoppner et al. 2005; Zupan et al. 2007). Respecto a EtgA únicamente se ha reportado su interacción con la proteína Escl (rOrf8), un componente del SST3 que se propone podría formar el eje interno del sistema, localizado en el periplasma (Creasey et al. 2003; Pallen et al. 2005); esta interacción le permitiría a EtgA dirigirse al sistema en formación y degradar la capa de peptidoglicano en una forma localizada. También consideramos la posibilidad de que EtgA pudiera interactuar con otras proteínas del inyectisoma, como la

secretina EscC o las proteínas de membrana interna EscD y EscJ, que poseen dominios periplásmicos (Crepin et al. 2005; Ogino et al. 2006; Spreter et al. 2009). No obstante, la lisis celular producida por EtgA en las cepas ΔescN y Δler es comparable a la lisis que se produce en EPEC silvestre (Figura 18), lo que sugiere que pudiera no ser necesario algún componente del SST3 para que EtgA sea una enzima activa. Aún así, debe considerarse que en las condiciones experimentales probadas se induce la sobreproducción de la proteína, lo cual no podría equipararse a lo que ocurre *in vivo* y por lo tanto no se puede excluir que ocurran interacciones de EtgA con algunas de las proteínas mencionadas y que éstas modulen su actividad por medio de cambios conformacionales. Esto aseguraría que EtgA sea más activa en el sitio de formación de inyectisomas.

Para VirB1 también se propone que el control de su actividad ocurre a través de la degradación de su región de TL una vez que ha llevado a cabo su función (Llosa et al. 2000; Hoppner et al. 2005). En este sentido, se considera importante la participación de proteasas, que a través de la degradación de las muramidasa podrían mantener un balance entre su producción y su nivel de actividad (Vollmer et al. 2008). En cuanto a EtgA, es probable que se produzca en cantidades muy bajas y por esto no se puede inmunodetectar la forma endógena de la proteína (Figura 16).

Por otro lado, la actividad de las TLs podría estar controlada a nivel genético, ya que los genes que codifican TLs especializadas se expresan al mismo tiempo que los elementos que codifican los componentes del sistema al que están asociadas, lo que podría asegurar el control temporal de su actividad. Tal es el caso de PleA de *C. crescentus* que se produce sólo durante el momento en el que ocurre la biogénesis del pilus y del flagelo (Viollier y Shapiro 2003), y las TLs del SST3 de *P. syringae* HrpH, HopP1 y HopAJ1, cuya producción está corregulada con la

expresión de la isla de patogenicidad Hrp (Oh et al. 2007). En el caso de *etgA*, se determinó que su expresión es regulada por los mismos mecanismos que controlan la expresión del resto de los genes del LEE, ya que también se inhibe por H-NS y se activa de manera dependiente de Ler y GrlA (Ruíz-Díaz 2006). Lo anterior determinaría la producción de EtgA en el momento de formación del inyectisoma de EPEC.

Otra forma de control de la actividad de las muramidasa consiste en la modificación química del peptidoglicano, que además de mantener la pared celular protegida ante las autolisinas, evita el reconocimiento y eliminación de la bacteria por elementos del sistema inmune del hospedero. En particular, la O-acetilación del MurNAc es una alteración que inhibe la actividad de la lisozima y de las TLs (Vollmer 2008; Davis y Weiser 2011). Sin embargo, en *E. coli* y en otras bacterias como *P. aeruginosa*, en las que no se produce esta modificación, se han descubierto proteínas denominadas Ivy (*inhibitor vertebrate lysozymes*), capaces de inhibir la actividad estas muramidasa (Clarke et al. 2010). Al realizar una búsqueda en el genoma de EPEC se encontró el gen *ivy*, cuyo producto (número de acceso Swiss-Prot B7UJB3), es similar a las proteínas inhibitoras mencionadas, y también podría tener alguna participación en el control de la actividad de EtgA.

Como parte de los antecedentes experimentales demostramos que en EtgA la sustitución del glutamato catalítico por un residuo de alanina provoca la pérdida de su actividad de muramidasa *in vitro*. En el presente trabajo se determinó que el glutamato catalítico es indispensable para la actividad *in vivo* de EtgA, ya que su sustitución por alanina evita la inhibición en el crecimiento del cultivo y la lisis celular (Figuras 15 y 16). Esto a la vez confirma que los efectos observados al sobreproducir EtgA se deben a su actividad de muramidasa. En distintos ejemplos de TLs especializadas se ha determinado la importancia del glutamato catalítico, tal es el caso de P19, para la que el cambio del

este residuo por glutamina da lugar a una forma inactiva de la proteína (Bayer et al. 2001). De forma similar, el glutamato en la posición 42 de IpgF de *S. sonnei* se reemplazó por un residuo de glutamina, provocando la pérdida de su actividad de muramidasa *in vitro* (Zahrl et al. 2005). En AtIA del SST4 de *N. gonorrhoeae* al sustituir el glutamato 48 por un residuo de alanina, también se pierde la actividad de degradación de peptidoglicano tanto *in vitro* como *in vivo* (Kohler et al. 2007). Otro ejemplo es el de la proteína HrpH del SST3 de *P. syringae*, para la que se determinó que el glutamato catalítico es indispensable para la inhibición del crecimiento de cultivos bacterianos (Oh et al. 2007).

Respecto a otros residuos altamente conservados entre las TLs, observamos que al modificar el residuo Q65 del segundo motivo conservado (GLMQ) por un residuo de alanina hay una mayor inhibición del crecimiento bacteriano (Figura 20), aunque su capacidad de lisis aparentemente no difiere de la de EtgA silvestre (Figura 21). Este resultado sugiere la participación de este residuo en la regulación de la actividad de muramidasa de EtgA. Sin embargo, en el caso de MltF (YfdH) de *E. coli*, la región propuesta para modular la actividad de muramidasa se encuentra en el extremo amino, mientras que el dominio SLT (que incluye el motivo GLMQ) se localiza en el extremo carboxilo (Scheurwater y Clarke 2008). Con base en estudios cristalográficos de Slf70 se propone que el motivo GLMQ rodea al residuo catalítico y que es esencial para mantener la arquitectura del sitio activo de las TLs, ya que al contener residuos principalmente hidrofóbicos mantiene el ambiente apropiado para conservar protonado al glutamato catalítico durante la reacción (Dijkstra y Thunnissen 1994; van Asselt et al. 1999). Al intercambiarse el único residuo polar de este motivo (Q65) por un residuo hidrofóbico, como la alanina, posiblemente se esté favoreciendo la actividad del residuo catalítico, lo que resultaría en una mayor lisis y por lo tanto en un mayor efecto sobre el crecimiento

bacteriano. Para analizar mejor la importancia del residuo Q65 en la actividad de EtgA será necesario realizar otro tipo de modificación, como por un aminoácido polar con carga, por ejemplo un residuo glutamato. Por otra parte, la mutación Y116A reduce ligeramente la actividad de EtgA sobre cultivos celulares (Figura 20), lo que sugiere que aunque no es indispensable, este residuo es importante para la actividad de TL de EtgA, ya que puede estar involucrado en la unión de esta enzima al sustrato, como se ha determinado para el residuo Y552 en Slt70, (Thunnissen et al. 1995).

En general, la eliminación de TLs no produce un efecto aparente sobre la secreción de proteínas ni en la virulencia, por ejemplo, una mutación en *lpgF* de *S. flexneri* no afecta la patogenicidad de la bacteria, ya que presenta el mismo fenotipo invasivo que una cepa silvestre (Allaoui et al. 1993). Algo similar ocurre con una mutante en *iagB* de *S. enterica*, en la que no se afecta la formación del SST3 ni la secreción de proteínas de virulencia (Sukhan et al. 2001). Para evaluar la importancia de la actividad de muramidasa de EtgA para el SST3 de EPEC se generó una cepa con una eliminación de *etgA* ($\Delta etgA::kanr$), que presentó una reducción en el fenotipo de secreción de proteínas (Figuras 29 y 30) y en la capacidad de hemólisis (Figura 32) en comparación con EPEC silvestre. Existen ejemplos similares en los que las eliminaciones de genes de TLs resultan en la reducción de la secreción y de la virulencia, como en una mutante en *virB1* de *A. tumefaciens* que presenta una reducción en la capacidad de formación de tumores en plantas (Mushegian et al. 1996); de manera similar una eliminación en *hrpH* resulta en una disminución en la secreción y en la virulencia de *P. syringae* (Oh et al. 2007). También existen casos en los que el efecto es más drástico, como ocurre con una mutación en *hp0523* del SST4 de *H. pylori*, que afecta el ensamblaje del pilus y reduce significativamente la virulencia de la bacteria (Fischer et al. 2001; Rohde et al. 2003); otro caso es el de una mutación en *atIA* del SST4 de *N. gonorrhoeae*, que abate la secreción

de ADN al medio por este sistema (Kohler et al. 2007). En el caso de otros patógenos A/E, una mutante de *etgA* en *C. rodentium* provoca una reducción en la secreción de proteínas del SST3 (Deng et al. 2004) y de manera similar también se observó que al eliminar *etgA* de EHEC se presenta una reducción en la secreción de proteínas (Yu et al. 2010). Para EPEC aún no es posible determinar el efecto de la eliminación de *EtgA in vivo*, debido a que no se cuenta con un modelo animal adecuado, aunque posiblemente tenga un efecto similar al observado para la mutante de *etgA* en *C. rodentium*, que presenta una reducción en la formación de pedestales y en la virulencia en roedores (Deng et al. 2004).

La ausencia de fenotipo y los fenotipos débiles de mutantes con eliminaciones de genes de Tls se han atribuido a que otras enzimas pudieran llevar a cabo la misma función, lo que se conoce como redundancia funcional (Cloud y Dillard 2002; Heidrich et al. 2002; Koraimann 2003). De presentarse redundancia, la equivalencia entre las Tls permitiría la eliminación de una o más de ellas sin provocar un efecto drástico (Scheurwater et al. 2008). Esta hipótesis se apoya con los resultados de complementaciones heterólogas entre Tls especializadas, un ejemplo de ello es que *IpgF* del SST3 de *S. sonnei* puede complementar el defecto en la conjugación del plásmido R1-16 carente de *p19* (Zahrl et al. 2005), otro ejemplo es la complementación de una mutante de *virB1* en *A. tumefaciens* con *VirB1* de *B. suis* o con *TraL* del plásmido de conjugación pKM101, con la que se recupera la biogénesis del pilus T y la formación de tumores (Hoppner et al. 2004). Cabe mencionar que las complementaciones entre diferentes sistemas de secreción son posibles en los casos en los que los porcentajes de identidad y similitud son relativamente altos. Por ejemplo, entre *IpgF* y *P19* comparten 43% de identidad; mientras que para complementaciones entre sistemas homólogos la identidad puede ser menor, entre *VirB1* de *A. tumefaciens* y *VirB1* de *B. suis* la identidad es del

27%. En este trabajo realizamos la complementación de la mutante $\Delta etgA$ de *C. rodentium* con *etgA* de EPEC (Figura 36), en este caso las proteínas comparten 87.6% de identidad y 92.8% de similitud.

En general nuestros resultados indican que *EtgA* no se requiere totalmente para la biosíntesis del SST3 ya que en su ausencia el sistema es funcional, aunque de manera atenuada. La reducción en la secreción de proteínas y en la capacidad de hemólisis en la mutante $\Delta etgA::kanr$ sugirió que existía una reducción en el número de inyectisomas ensamblados por célula, lo que se comprobó al observar una menor cantidad de proteína *EspA* polimerizada en su superficie, en comparación con EPEC silvestre (Figura 33). Aún en un número reducido, los inyectisomas formados son funcionales ya que su capacidad hemolítica indica que pueden formar poro de translocación (Figura 32). Esto demuestra que el SST3 puede ensamblarse aún sin la asistencia de *EtgA*, y que eventualmente los inyectisomas son capaces de atravesar los huecos que se crean naturalmente en la pared celular durante su metabolismo. Es probable que esto pueda suceder ya que la pared celular se sintetiza y recicla constantemente a lo largo del crecimiento bacteriano (Holtje 1998; Vollmer y Bertsche 2008). Para los fenotipos observados con mutantes en *flgJ*, *sltF* y *hrpH* se ha propuesto algo similar, ya que éstos se han asociado con una capacidad residual del flagelo o del inyectisoma para penetrar la capa de peptidoglicano, de forma independiente de la actividad de TLs especializadas (Hirano et al. 2001; de la Mora et al. 2007; Oh et al. 2007).

Para determinar si la función de *EtgA* podía ser ejercida por otra TL, se realizó una búsqueda de TLs en el genoma de EPEC. Se determinó que de entre las TLs identificadas, *BfpH* tenía la mayor probabilidad de suplir la función de *EtgA*, dado que comparte con ésta los mayores porcentajes de identidad y similitud (30% y 49%, respectivamente, ver tabla 4), se predice que posee secuencia señal, es de masa molecular

pequeña (16.4 kDa) y se produce al mismo tiempo que los componentes del SST3, ya que los genes *bfp* se expresan en las mismas condiciones de expresión del LEE (Mellies et al. 2007). Además, como ya se mencionó, PerC, codificado en el plásmido EAF, activa la transcripción de *ler*, lo que resulta en la correulación del operón *bfp* con los genes del LEE (Mellies et al. 1999; Bustamante et al. 2001). Sin embargo, la ausencia simultánea de *bfpH* y *etgA* produjo el mismo fenotipo de reducción en la secreción que se observó en la mutante $\Delta etgA::kanr$ (Figura 34), por lo que se concluyó que BfpH no sustituye a EtgA en el inyectisoma. Esto indica, por un lado, que el efecto observado con la eliminación de *etgA* no se debe a redundancia entre Tls, y por otro, que EtgA no es indispensable para el ensamblaje del SST3. Además, la complementación de las mutantes $\Delta etgA::kanr$ (Figura 29) y $\Delta etgA::kanrEAF-$ (doble mutante *bfpH etgA*) (Figura 34) con la construcción pEE3aetgA indica que la atenuación en la secreción de proteínas se debe únicamente a la ausencia de EtgA. A su vez, la incapacidad del plásmido pEE3aetgAE42A para recuperar la secreción confirma la importancia de la actividad muralítica para una eficiente formación del SST3 (Figura 31). Sin embargo, aún no se puede descartar totalmente la posibilidad que otra TL pudiera llevar a cabo la función de EtgA.

A pesar de no ser indispensables, las Tls especializadas se han conservado en los elementos genéticos que codifican los distintos sistemas de secreción (Koraimann 2003). La conservación de algunas de éstas podría deberse a que han adquirido funciones adicionales a la de actividad de muramidasa, como en el caso de las Tls HopP1 y HrpH de *P. syringae* que se translocan por el SST3 a células vegetales, activan la respuesta inmune e inducen la muerte celular (Kvitko et al. 2007; Oh et al. 2007; Oh et al. 2010); o como VirB1, cuyo extremo carboxilo se secreta al medio y participa en el ensamblaje del pilus del SST4, posiblemente actuando como una chaperona (Llosa et al. 2000; Zupan

et al. 2007). En el caso del gen *etgA*, además de su función como TL, pudo haberse conservado en el LEE ya que su secuencia presenta un sitio de unión para el regulador Ler, que se ha determinado experimentalmente tanto para EPEC como para *C. rodentium*. A su vez, se determinó que este sitio es importante para la activación del operón *grlRA* en una forma dependiente de Ler (Barba et al. 2005; Ruíz-Díaz 2006). Sin embargo, aún no se ha determinado la secuencia exacta de este sitio de unión de Ler.

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo nos llevan a proponer un modelo de la participación de *EtgA* en la biogénesis del SST3 de EPEC (Figura 37), según el cual *EtgA* se transporta al periplasma por medio de la translocasa Sec, una vez en el periplasma su secuencia señal se procesa por peptidasas de secuencia señal. Posteriormente, por medio de interacciones con los componentes periplásmicos del SST3 (como *EsclI*) *EtgA* se dirige al inyectisoma en formación. Estas interacciones provocan un cambio conformacional en *EtgA* que induce su actividad enzimática. Entonces *EtgA* degrada en una forma localizada la pared celular, haciendo más eficiente el ensamblaje del sistema de secreción.

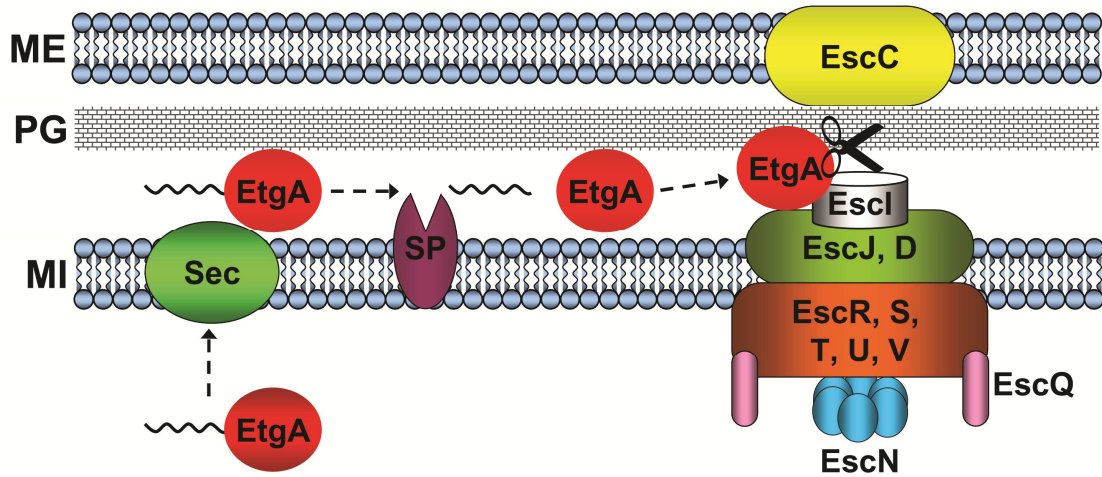


Figura 37. **Modelo de la participación de EtgA en el ensamblaje del SST3 de virulencia de EPEC.** EtgA se transporta al periplasma por la translocasa Sec, donde su péptido líder (línea ondulada) se procesa por peptidasas de secuencia señal (SP). Por medio de interacciones con componentes periplásmicos del SST3, EtgA degrada la capa de peptidoglicano de una forma localizada (evento que se representa con tijeras), permitiendo la formación de un espacio a través del cual puede pasar el eje (EscI) para que continúe el ensamblaje del resto del sistema. Se indican algunas de las proteínas que conforman el cuerpo basal y el aparato de exportación del inyectisoma. ME: membrana externa, MI: membrana interna.

CONCLUSIONES

Se comprobó el transporte de EtgA al periplasma de EPEC y que dicho transporte es dependiente de la secuencia señal N-terminal e independiente del SST3.

Se determinó que la actividad muralítica de EtgA tiene un efecto tóxico en cultivos de EPEC, produciendo una considerable reducción en la viabilidad bacteriana por medio de lisis celular. Esta actividad lítica es independiente del SST3. Para producir el efecto tóxico es esencial el glutamato catalítico. Los residuos altamente conservados Q65 y Y116 son importantes para la actividad de EtgA *in vivo*.

EtgA no es indispensable para la biogénesis del SST3 ya que el sistema puede formarse sin la asistencia de esta TL, lo que se apoya en que los inyectisomas formados en la mutante $\Delta etgA::kanr$ son funcionales. Sin embargo, en la mutante se ensambla un menor número de inyectisomas, por lo que la actividad de muramidasa de EtgA es importante para facilitar la penetración de la pared celular por el inyectisoma y permitir su biosíntesis, haciendo este proceso más eficiente.

BfpH no es capaz de sustituir funcionalmente a EtgA, lo que favorece la hipótesis de que algunos inyectisomas son capaces de penetrar la capa de peptidoglicano sin la participación de las TLs, a través de los huecos que se forman naturalmente en la pared celular. Por lo tanto, los datos de nuestro trabajo no apoyan la hipótesis de redundancia funcional.

PERSPECTIVAS

En el presente trabajo demostramos que EtgA tiene actividad de muramidasa y que dicha actividad es importante para hacer eficiente la biogénesis del SST3. Sin embargo, existen diferentes enzimas líticas capaces de degradar la pared celular, por lo que, a pesar de su alta similitud con TLs, será necesario demostrar que EtgA es una transglicosilasa lítica, identificando el producto de la reacción que cataliza (1,6-anhidroMurNAc) y utilizando inhibidores específicos de TLs como la bulgecina. En este sentido, se determinará si la proteína codificada por el gen *ivy* de EPEC es capaz de inhibir la actividad de muramidasa de EtgA. Esto resulta relevante ya que el uso de inhibidores de los componentes enzimáticos del inyectisoma puede ser la base para el desarrollo de compuestos antimicrobianos, que por sí solos o en combinación con antibióticos tradicionales, inactiven o reduzcan el funcionamiento de este sistema de secreción. Esto favorecería que la bacteria patógena resulte inocua y que pudiera ser eliminada por el sistema inmune del hospedero.

Por otro lado, ya que la sobreproducción de una versión activa de EtgA tiene un efecto negativo sobre la cantidad de algunos sustratos, se propone determinar si este fenómeno se debe a un efecto sobre la expresión de la isla LEE. En este sentido podría evaluarse si existen cambios en la cantidad del transcrito de algunos genes del LEE a distintos tiempos de inducir la sobreproducción de EtgA. De manera adicional, será importante determinar si la vía Cpx de respuesta a estrés se induce por la actividad de EtgA y si esta vía está relacionada con la inhibición de la expresión de la isla LEE en las condiciones de los experimentos realizados en el presente trabajo.

Por otra parte, se ha sugerido que la interacción de las TLs con otras proteínas del sistema de secreción al que se asocian es importante,

tanto para dirigir a la enzima al sitio de formación del complejo como para la regulación de la actividad. En el caso de EtgA sería interesante identificar las interacciones proteína-proteína que tiene con componentes periplásmicos del SST3, por medio de distintas técnicas (doble híbrido en levadura y en bacteria, ensayos de copurificación, coimmunoprecipitación etc.). También sería importante determinar la influencia de estas interacciones en la actividad de muramidasa de EtgA y si éstas determinan su colocalización con el SST3.

Para determinar el efecto *in vivo* de la eliminación de *etgA* no se cuenta con un modelo animal adecuado, por lo que deberán realizarse ensayos en cultivos celulares. En estos ensayos se evaluará la translocación de proteínas efectoras a células epiteliales y la capacidad de formación de pedestales. De esta forma, la cuantificación de los inyectisomas ensamblados por célula en la mutante $\Delta etgA::kanr$, por medio de microscopía de fluorescencia y microscopía electrónica permitiría determinar si hay una correlación entre el número de inyectisomas y la virulencia de esta mutante.

Finalmente, con los resultados generados en este trabajo se determinó que no existe redundancia funcional entre BfpH y EtgA. No obstante, no se descarta que pudiera existir alguna enzima capaz de sustituir la función de EtgA en la formación del inyectisoma. Una herramienta para determinarlo será la generación de mutantes múltiples de distintas TLs codificadas en el genoma de EPEC y el análisis de sus fenotipos.

REFERENCIAS

- Akeda, Y. y J. E. Galan (2005). "Chaperone release and unfolding of substrates in type III secretion." Nature 437(7060): 911-915.
- Allaoui, A., R. Menard, P. J. Sansonetti y C. Parsot (1993). "Characterization of the *Shigella flexneri* ipgD and ipgF genes, which are located in the proximal part of the mxi locus." Infect Immun 61(5): 1707-1714.
- Anantha, R. P., K. D. Stone y M. S. Sonnenberg (2000). "Effects of bfp mutations on biogenesis of functional enteropathogenic *Escherichia coli* type IV pili." J Bacteriol 182(9): 2498-2506.
- Andrade, A., J. P. Pardo, N. Espinosa, G. Perez-Hernandez y B. Gonzalez-Pedrajo (2007). "Enzymatic characterization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion ATPase EscN." Arch Biochem Biophys 468(1): 121-127.
- Arnold, R., A. Jehl y T. Rattei (2010). "Targeting effectors: the molecular recognition of Type III secreted proteins." Microbes Infect 12(5): 346-358.
- Barba, J., V. H. Bustamante, M. A. Flores-Valdez, W. Deng, B. B. Finlay y J. L. Puente (2005). "A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA." J Bacteriol 187(23): 7918-7930.
- Batchelor, M., J. Guignot, A. Patel, N. Cummings, J. Cleary, S. Knutton, D. W. Holden, I. Connerton y G. Frankel (2004). "Involvement of the intermediate filament protein cytokeratin-18 in actin pedestal formation during EPEC infection." EMBO Rep 5(1): 104-110.
- Bayer, M., K. Bischof, R. Noiges y G. Koraimann (2000). "Subcellular localization and processing of the lytic transglycosylase of the conjugative plasmid R1." FEBS Lett 466(2-3): 389-393.
- Bayer, M., R. Iberer, K. Bischof, E. Rassi, E. Stabentheiner, G. Zellnig y G. Koraimann (2001). "Functional and mutational analysis of p19, a DNA transfer protein with muramidase activity." J Bacteriol 183(10): 3176-3183.
- Beekman, D. S. y D. C. Vanrompay (2010). "Bacterial secretion systems with an emphasis on the chlamydial Type III secretion system." Curr Issues Mol Biol 12(1): 17-41.
- Bendtsen, J. D., H. Nielsen, G. von Heijne y S. Brunak (2004). "Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0." J Mol Biol 340(4): 783-795.
- Berdichevsky, T., D. Friedberg, C. Nadler, A. Rokney, A. Oppenheim y I. Rosenshine (2005). "Ler is a negative autoregulator of the LEE1 operon in enteropathogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol 187(1): 349-357.
- Berger, C. N., V. F. Crepin, M. A. Jepson, A. Arbeloa y G. Frankel (2009). "The mechanisms used by enteropathogenic *Escherichia coli* to control filopodia dynamics." Cell Microbiol 11(2): 309-322.
- Bernadsky, G., T. J. Beveridge y A. J. Clarke (1994). "Analysis of the sodium dodecyl sulfate-stable peptidoglycan autolysins of select gram-negative pathogens by using renaturing polyacrylamide gel electrophoresis." J Bacteriol 176(17): 5225-5232.
- Bhavsar, A. P., J. A. Guttman y B. B. Finlay (2007). "Manipulation of host-cell pathways by bacterial pathogens." Nature 449(7164): 827-834.
- Blackburn, N. T. y A. J. Clarke (2001). "Identification of four families of peptidoglycan lytic transglycosylases." J Mol Evol 52(1): 78-84.
- Bommarius, B., D. Maxwell, A. Swimm, S. Leung, A. Corbett, W. Bornmann y D. Kalman (2007). "Enteropathogenic *Escherichia coli* Tir is an SH2/3 ligand that recruits and activates tyrosine kinases required for pedestal formation." Mol Microbiol 63(6): 1748-1768.
- Botteaux, A., C. A. Kayath, A. L. Page, N. Jouihri, M. Sani, E. Boekema, L. Biskri, C. Parsot y A. Allaoui (2010). "The 33 carboxyl-terminal residues of Spa40 orchestrate the multi-step assembly process of the type III secretion needle complex in *Shigella flexneri*." Microbiology 156(Pt 9): 2807-2817.
- Bustamante, V. H., F. J. Santana, E. Calva y J. L. Puente (2001). "Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression." Mol Microbiol 39(3): 664-678.
- Bustamante, V. H., M. I. Villalba, V. García, A. Vázquez, L. Martínez, R. Jiménez y J. Puente (No publicado). "PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*."
- Buttner, D., L. Noel, J. Stuttmann y U. Bonas (2007). "Characterization of the nonconserved hpaB-hrpF region in the hrp pathogenicity island from *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria." Mol Plant Microbe Interact 20(9): 1063-1074.

- Campellone, K. G., S. Rankin, T. Pawson, M. W. Kirschner, D. J. Tipper y J. M. Leong (2004). "Clustering of Nck by a 12-residue Tir phosphopeptide is sufficient to trigger localized actin assembly." J Cell Biol 164(3): 407-416.
- Clarke, C. A., E. M. Scheurwater y A. J. Clarke (2010). "The vertebrate lysozyme inhibitor Ivy functions to inhibit the activity of lytic transglycosylase." J Biol Chem 285(20): 14843-14847.
- Cleary, J., L. C. Lai, R. K. Shaw, A. Straatman-Iwanowska, M. S. Donnenberg, G. Frankel y S. Knutton (2004). "Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin." Microbiology 150(Pt 3): 527-538.
- Cloud-Hansen, K. A., S. B. Peterson, E. V. Stabb, W. E. Goldman, M. J. McFall-Ngai y J. Handelsman (2006). "Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interactions." Nat Rev Microbiol 4(9): 710-716.
- Cloud, K. A. y J. P. Dillard (2002). "A lytic transglycosylase of *Neisseria gonorrhoeae* is involved in peptidoglycan-derived cytotoxin production." Infect Immun 70(6): 2752-2757.
- Cornelis, G. R. (2006). "The type III secretion injectisome." Nat Rev Microbiol 4(11): 811-825.
- Craig, L. y J. Li (2008). "Type IV pili: paradoxes in form and function." Curr Opin Struct Biol 18(2): 267-277.
- Creasey, E. A., R. M. Delahay, S. J. Daniell y G. Frankel (2003). "Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*." Microbiology 149(Pt 8): 2093-2106.
- Crepin, V. F., S. Prasanna, R. K. Shaw, R. K. Wilson, E. Creasey, C. M. Abe, S. Knutton, G. Frankel y S. Matthews (2005). "Structural and functional studies of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III needle complex protein EscJ." Mol Microbiol 55(6): 1658-1670.
- Croxen, M. A. y B. B. Finlay (2010). "Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity." Nat Rev Microbiol 8(1): 26-38.
- Chen, H. D. y G. Frankel (2005). "Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis." FEMS Microbiol Rev 29(1): 83-98.
- Chevance, F. F. y K. T. Hughes (2008). "Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine." Nat Rev Microbiol 6(6): 455-465.
- Daniell, S. J., E. Kocsis, E. Morris, S. Knutton, F. P. Booy y G. Frankel (2003). "3D structure of EspA filaments from enteropathogenic *Escherichia coli*." Mol Microbiol 49(2): 301-308.
- Daniell, S. J., N. Takahashi, R. Wilson, D. Friedberg, I. Rosenshine, F. P. Booy, R. K. Shaw, S. Knutton, G. Frankel y S. Aizawa (2001). "The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*." Cell Microbiol 3(12): 865-871.
- Datsenko, K. A. y B. L. Wanner (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products." Proc Natl Acad Sci U S A 97(12): 6640-6645.
- Davis, A. J., D. A. Díaz y J. Meccas (2010). "A dominant-negative needle mutant blocks type III secretion of early but not late substrates in *Yersinia*." Mol Microbiol 76(1): 236-259.
- Davis, K. M. y J. N. Weiser (2011). "Modifications to the peptidoglycan backbone help bacteria to establish infection." Infect Immun 79(2): 562-570.
- de Grado, M., A. Abe, A. Gauthier, O. Steele-Mortimer, R. DeVinney y B. B. Finlay (1999). "Identification of the intimin-binding domain of Tir of enteropathogenic *Escherichia coli*." Cell Microbiol 1(1): 7-17.
- de la Mora, J., T. Ballado, B. Gonzalez-Pedrajo, L. Camarena y G. Dreyfus (2007). "The flagellar muramidase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*." J Bacteriol 189(22): 7998-8004.
- Dean, P. y B. Kenny (2004). "Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein." Mol Microbiol 54(3): 665-675.
- Dean, P. y B. Kenny (2009). "The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell." Curr Opin Microbiol.
- Dean, P., M. Maresca, S. Schuller, A. D. Phillips y B. Kenny (2006). "Potent diarrheagenic mechanism mediated by the cooperative action of three enteropathogenic *Escherichia coli*-injected effector proteins." Proc Natl Acad Sci U S A 103(6): 1876-1881.
- Deane, J. E., P. Abrusci, S. Johnson y S. M. Lea (2010). "Timing is everything: the regulation of type III secretion." Cell Mol Life Sci 67(7): 1065-1075.
- Demchick, P. y A. L. Koch (1996). "The permeability of the wall fabric of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*." J Bacteriol 178(3): 768-773.
- Deng, W., J. L. Puente, S. Gruenheid, Y. Li, B. A. Vallance, A. Vazquez, J. Barba, J. A. Ibarra, P. O'Donnell, P. Metalnikov, K. Ashman, S. Lee, D. Goode, T. Pawson y B. B. Finlay (2004). "Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island." Proc Natl Acad Sci U S A 101(10): 3597-3602.

- Diepold, A., M. Amstutz, S. Abel, I. Sorg, U. Jenal y G. R. Cornelis (2010). "Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome." EMBO J 29(11): 1928-1940.
- Dijkstra, A. J. y W. Keck (1996). "Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport." J Bacteriol 178(19): 5555-5562.
- Dijkstra, B. W. y A. M. Thunnissen (1994). "'Holy' proteins. II: The soluble lytic transglycosylase." Curr Opin Struct Biol 4(6): 810-813.
- Donnenberg, M. S., J. A. Giron, J. P. Nataro y J. B. Kaper (1992). "A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence." Mol Microbiol 6(22): 3427-3437.
- Driessen, A. J. y N. Nouwen (2008). "Protein translocation across the bacterial cytoplasmic membrane." Annu Rev Biochem 77: 643-667.
- Elliott, S. J., V. Sperandio, J. A. Giron, S. Shin, J. L. Mellies, L. Wainwright, S. W. Hutcheson, T. K. McDaniel y J. B. Kaper (2000). "The 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(11): 6115-6126.
- Elliott, S. J., L. A. Wainwright, T. K. McDaniel, K. G. Jarvis, Y. K. Deng, L. C. Lai, B. P. McNamara, M. S. Donnenberg y J. B. Kaper (1998). "The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69." Mol Microbiol 28(1): 1-4.
- Erhardt, M., K. Namba y K. T. Hughes (2010). "Bacterial nanomachines: the flagellum and type III injectisome." Cold Spring Harb Perspect Biol 2(11): a000299.
- Fischer, W., J. Puls, R. Buhrdorf, B. Gebert, S. Odenbreit y R. Haas (2001). "Systematic mutagenesis of the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island: essential genes for CagA translocation in host cells and induction of interleukin-8." Mol Microbiol 42(5): 1337-1348.
- Friedberg, D., T. Umanski, Y. Fang y I. Rosenshine (1999). "Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*." Mol Microbiol 34(5): 941-952.
- Galan, J. E. y H. Wolf-Watz (2006). "Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines." Nature 444(7119): 567-573.
- García-Angulo, V. A., W. Deng, N. A. Thomas, B. B. Finlay y J. L. Puente (2008). "Regulation of expression and secretion of NleH, a new non-locus of enterocyte effacement-encoded effector in *Citrobacter rodentium*." J Bacteriol 190(7): 2388-2399.
- García-Gómez, E. (2007). "Estudio de una transglicosilasa lítica del sistema de secreción tipo III de *Escherichia coli* enteropatógena." Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D. F.
- García-Gomez, E., N. Espinosa, J. de la Mora, G. Dreyfus y B. Gonzalez-Pedrajo (2011). "The muramidase EtgA from enteropathogenic *Escherichia coli* is required for efficient type III secretion." Microbiology 157: 1145-1160.
- Garmendia, J., G. Frankel y V. F. Crepin (2005). "Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation." Infect Immun 73(5): 2573-2585.
- Gauthier, A. y B. B. Finlay (2003). "Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol 185(23): 6747-6755.
- Gauthier, A., J. L. Puente y B. B. Finlay (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(6): 3310-3319.
- Ghosh, P. (2004). "Process of protein transport by the type III secretion system." Microbiol Mol Biol Rev 68(4): 771-795.
- Gill, R. K., A. Borthakur, K. Hodges, J. R. Turner, D. R. Clayburgh, S. Saksena, A. Zaheer, K. Ramaswamy, G. Hecht y P. K. Dudeja (2007). "Mechanism underlying inhibition of intestinal apical Cl/OH exchange following infection with enteropathogenic *E. coli*." J Clin Invest 117(2): 428-437.
- Giron, J. A., A. S. Ho y G. K. Schoolnik (1991). "An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*." Science 254(5032): 710-713.
- Giron, J. A., F. Qadri, T. Azim, K. J. Jarvis, J. B. Kaper y M. J. Albert (1995). "Monoclonal antibodies specific for the bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*." Infect Immun 63(12): 4949-4952.
- Goosney, D. L., S. Gruenheid y B. B. Finlay (2000). "Gut feelings: enteropathogenic *E. coli* (EPEC) interactions with the host." Annu Rev Cell Dev Biol 16: 173-189.
- Gruenheid, S., R. DeVinney, F. Bladt, D. Goosney, S. Gelkop, G. D. Gish, T. Pawson y B. B. Finlay (2001). "Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells." Nat Cell Biol 3(9): 856-859.

- Guttman, J. A., F. N. Samji, Y. Li, W. Deng, A. Lin y B. B. Finlay (2007). "Aquaporins contribute to diarrhoea caused by attaching and effacing bacterial pathogens." *Cell Microbiol* 9(1): 131-141.
- Haack, K. R., C. L. Robinson, K. J. Miller, J. W. Fowlkes y J. L. Mellies (2003). "Interaction of Ler at the LEE5 (tir) operon of enteropathogenic *Escherichia coli*." *Infect Immun* 71(1): 384-392.
- Hamada, D., M. Hamaguchi, K. N. Suzuki, I. Sakata y I. Yanagihara (2010). "Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: a case for EspB as an intrinsically less-ordered effector." *FEBS J* 277(11): 2409-2415.
- Hartland, E. L., M. Batchelor, R. M. Delahay, C. Hale, S. Matthews, G. Dougan, S. Knutton, I. Connerton y G. Frankel (1999). "Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells." *Mol Microbiol* 32(1): 151-158.
- Hayes, C. S., S. K. Aoki y D. A. Low (2010). "Bacterial contact-dependent delivery systems." *Annu Rev Genet* 44: 71-90.
- Hayward, R. D., J. M. Leong, V. Koronakis y K. G. Campellone (2006). "Exploiting pathogenic *Escherichia coli* to model transmembrane receptor signalling." *Nat Rev Microbiol* 4(5): 358-370.
- He, S. Y., K. Nomura y T. S. Whittam (2004). "Type III protein secretion mechanism in mammalian and plant pathogens." *Biochim Biophys Acta* 1694(1-3): 181-206.
- Heidrich, C., A. Ursinus, J. Berger, H. Schwarz y J. V. Holtje (2002). "Effects of multiple deletions of murein hydrolases on viability, septum cleavage, and sensitivity to large toxic molecules in *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 184(22): 6093-6099.
- Hirano, T., T. Minamino y R. M. Macnab (2001). "The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase." *J Mol Biol* 312(2): 359-369.
- Hodges, K., N. M. Alto, K. Ramaswamy, P. K. Dudeja y G. Hecht (2008). "The enteropathogenic *Escherichia coli* effector protein EspF decreases sodium hydrogen exchanger 3 activity." *Cell Microbiol* 10(8): 1735-1745.
- Holtje, J. V. (1995). "From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*." *Arch Microbiol* 164(4): 243-254.
- Holtje, J. V. (1998). "Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*." *Microbiol Mol Biol Rev* 62(1): 181-203.
- Hoppner, C., A. Carle, D. Sivanesan, S. Hoepfner y C. Baron (2005). "The putative lytic transglycosylase VirB1 from *Brucella suis* interacts with the type IV secretion system core components VirB8, VirB9 and VirB11." *Microbiology* 151(Pt 11): 3469-3482.
- Hoppner, C., Z. Liu, N. Domke, A. N. Binns y C. Baron (2004). "VirB1 orthologs from *Brucella suis* and pKM101 complement defects of the lytic transglycosylase required for efficient type IV secretion from *Agrobacterium tumefaciens*." *J Bacteriol* 186(5): 1415-1422.
- Hueck, C. J. (1998). "Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants." *Microbiol Mol Biol Rev* 62(2): 379-433.
- Hylland, R. M., J. Sun, T. P. Griener, G. L. Mulvey, J. S. Klassen, M. S. Donnenberg y G. D. Armstrong (2008). "The bundlin pilin protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is an N-acetyllactosamine-specific lectin." *Cell Microbiol* 10(1): 177-187.
- Ide, T., S. Laarmann, L. Greune, H. Schillers, H. Oberleithner y M. A. Schmidt (2001). "Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*." *Cell Microbiol* 3(10): 669-679.
- Iguchi, A., N. R. Thomson, Y. Ogura, D. Saunders, T. Ooka, I. R. Henderson, D. Harris, M. Asadulghani, K. Kurokawa, P. Dean, B. Kenny, M. A. Quail, S. Thurston, G. Dougan, T. Hayashi, J. Parkhill y G. Frankel (2009). "Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69." *J Bacteriol* 191(1): 347-354.
- Jarvis, K. G., J. A. Giron, A. E. Jerse, T. K. McDaniel, M. S. Donnenberg y J. B. Kaper (1995). "Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(17): 7996-8000.
- Jiménez-Mejía, R. (2010). "Caracterización molecular de la proteína GrlA, un regulador positivo de factores de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena." Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Jimenez, R., S. B. Cruz-Migoni, A. Huerta-Saquero, V. H. Bustamante y J. L. Puente (2010). "Molecular characterization of GrlA, a specific positive regulator of ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*." *J Bacteriol* 192(18): 4627-4642.
- Jobichen, C., M. Li, G. Yerushalmi, Y. W. Tan, Y. K. Mok, I. Rosenshine, K. Y. Leung y J. Sivaraman (2007). "Structure of GrlR and the implication of its EDED motif in mediating the regulation of type III secretion system in EHEC." *PLoS Pathog* 3(5): e69.

- Kalman, D., O. D. Weiner, D. L. Goosney, J. W. Sedat, B. B. Finlay, A. Abo y J. M. Bishop (1999). "Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals." Nat Cell Biol 1(6): 389-391.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro y H. L. Mobley (2004). "Pathogenic *Escherichia coli*." Nat Rev Microbiol 2(2): 123-140.
- 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(4): 1229-1241.
- Kenny, B., A. Abe, M. Stein y B. B. Finlay (1997). "Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract." Infect Immun 65(7): 2606-2612.
- Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey y B. B. Finlay (1997). "Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells." Cell 91(4): 511-520.
- Kenny, B. y B. B. Finlay (1995). "Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A 92(17): 7991-7995.
- Kim, J., A. Thanabalasuriar, T. Chaworth-Musters, J. C. Fromme, E. A. Frey, P. I. Lario, P. Metalnikov, K. Rizg, N. A. Thomas, S. F. Lee, E. L. Hartland, P. R. Hardwidge, T. Pawson, N. C. Strynadka, B. B. Finlay, R. Schekman y S. Gruenheid (2007). "The bacterial virulence factor NleA inhibits cellular protein secretion by disrupting mammalian COPII function." Cell Host Microbe 2(3): 160-171.
- Knutton, S., I. Rosenshine, M. J. Pallen, I. Nisan, B. C. Neves, C. Bain, C. Wolff, G. Dougan y G. Frankel (1998). "A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells." EMBO J 17(8): 2166-2176.
- Kohler, P. L., H. L. Hamilton, K. Cloud-Hansen y J. P. Dillard (2007). "AtlA functions as a peptidoglycan lytic transglycosylase in the *Neisseria gonorrhoeae* type IV secretion system." J Bacteriol 189(15): 5421-5428.
- Koraimann, G. (2003). "Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria." Cell Mol Life Sci 60(11): 2371-2388.
- Kvitko, B. H., A. R. Ramos, J. E. Morello, H. S. Oh y A. Collmer (2007). "Identification of harpins in *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000, which are functionally similar to HrpK1 in promoting translocation of type III secretion system effectors." J Bacteriol 189(22): 8059-8072.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-685.
- Lehnerr, H., A. M. Hansen y T. Ilyina (1998). "Penetration of the bacterial cell wall: a family of lytic transglycosylases in bacteriophages and conjugative plasmids." Mol Microbiol 30(2): 454-457.
- Levine, M. M., E. J. Bergquist, D. R. Nalin, D. H. Waterman, R. B. Hornick, C. R. Young y S. Sotman (1978). "*Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive." Lancet 1(8074): 1119-1122.
- Lio, J. C. y W. J. Syu (2004). "Identification of a negative regulator for the pathogenicity island of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7." J Biomed Sci 11(6): 855-863.
- Lodato, P. B. y J. B. Kaper (2009). "Post-transcriptional processing of the LEE4 operon in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*." Mol Microbiol 71(2): 273-290.
- Luo, W. y M. S. Donnenberg (2011). "Interactions and Predicted Host Membrane Topology of Enteropathogenic *Escherichia coli* Translocator Protein EspB." J Bacteriol.
- Llosa, M., J. Zupan, C. Baron y P. Zambryski (2000). "The N- and C-terminal portions of the *Agrobacterium* VirB1 protein independently enhance tumorigenesis." J Bacteriol 182(12): 3437-3445.
- Ma, C., M. E. Wickham, J. A. Guttman, W. Deng, J. Walker, K. L. Madsen, K. Jacobson, W. A. Vogl, B. B. Finlay y B. A. Vallance (2006). "*Citrobacter rodentium* infection causes both mitochondrial dysfunction and intestinal epithelial barrier disruption in vivo: role of mitochondrial associated protein (Map)." Cell Microbiol 8(10): 1669-1686.
- Macritchie, D. M., J. D. Ward, A. Z. Nevesinjac y T. L. Raivio (2008). "Activation of the Cpx envelope stress response down-regulates expression of several locus of enterocyte effacement-encoded genes in enteropathogenic *Escherichia coli*." Infect Immun 76(4): 1465-1475.
- Marlovits, T. C., T. Kubori, M. Lara-Tejero, D. Thomas, V. M. Unger y J. E. Galan (2006). "Assembly of the inner rod determines needle length in the type III secretion injectisome." Nature 441(7093): 637-640.
- Matsuzawa, T., A. Kuwae, S. Yoshida, C. Sasakawa y A. Abe (2004). "Enteropathogenic *Escherichia coli* activates the RhoA signaling pathway via the stimulation of GEF-H1." EMBO J 23(17): 3570-3582.

- McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Donnenberg y J. B. Kaper (1995). "A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens." Proc Natl Acad Sci U S A 92(5): 1664-1668.
- McDaniel, T. K. y J. B. Kaper (1997). "A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12." Mol Microbiol 23(2): 399-407.
- McNamara, B. P., A. Koutsouris, C. B. O'Connell, J. P. Nougayrede, M. S. Donnenberg y G. Hecht (2001). "Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function." J Clin Invest 107(5): 621-629.
- Mellies, J. L., A. M. Barron y A. M. Carmona (2007). "Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation." Infect Immun 75(9): 4199-4210.
- Mellies, J. L., S. J. Elliott, V. Sperandio, M. S. Donnenberg y J. B. Kaper (1999). "The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli* : identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler)." Mol Microbiol 33(2): 296-306.
- Meroueh, S. O., K. Z. Bencze, D. Heseck, M. Lee, J. F. Fisher, T. L. Stemmler y S. Mobashery (2006). "Three-dimensional structure of the bacterial cell wall peptidoglycan." Proc Natl Acad Sci U S A 103(12): 4404-4409.
- Minamino, T., K. Imada y K. Namba (2008). "Molecular motors of the bacterial flagella." Curr Opin Struct Biol 18(6): 693-701.
- Moak, M. y I. J. Molineux (2000). "Role of the Gp16 lytic transglycosylase motif in bacteriophage T7 virions at the initiation of infection." Mol Microbiol 37(2): 345-355.
- Moon, H. W., S. C. Whipp, R. A. Argenzio, M. M. Levine y R. A. Giannella (1983). "Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines." Infect Immun 41(3): 1340-1351.
- Morita-Ishihara, T., M. Ogawa, H. Sagara, M. Yoshida, E. Katayama y C. Sasakawa (2006). "*Shigella* Spa33 is an essential C-ring component of type III secretion machinery." J Biol Chem 281(1): 599-607.
- Mota, L. J., I. Sorg y G. R. Cornelis (2005). "Type III secretion: the bacteria-eukaryotic cell express." FEMS Microbiol Lett 252(1): 1-10.
- Mueller, C. A., P. Broz y G. R. Cornelis (2008). "The type III secretion system tip complex and translocon." Mol Microbiol 68(5): 1085-1095.
- Mushegian, A. R., K. J. Fullner, E. V. Koonin y E. W. Nester (1996). "A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals." Proc Natl Acad Sci U S A 93(14): 7321-7326.
- Nagai, T., A. Abe y C. Sasakawa (2005). "Targeting of enteropathogenic *Escherichia coli* EspF to host mitochondria is essential for bacterial pathogenesis: critical role of the 16th leucine residue in EspF." J Biol Chem 280(4): 2998-3011.
- Nambu, T., T. Minamino, R. M. Macnab y K. Kutsukake (1999). "Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*." J Bacteriol 181(5): 1555-1561.
- Natale, P., T. Bruser y A. J. Driessen (2008). "Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms." Biochim Biophys Acta 1778(9): 1735-1756.
- Nataro, J. P. y J. B. Kaper (1998). "Diarrheagenic *Escherichia coli*." Clin Microbiol Rev 11(1): 142-201.
- Navarro-Garcia, F., M. Sonnested y K. Teter (2010). "Host-Toxin Interactions Involving EspC and Pet, Two Serine Protease Autotransporters of the Enterobacteriaceae." Toxins (Basel) 2(5): 1134-1147.
- Noel, L., F. Thieme, D. Nennstiel y U. Bonas (2002). "Two novel type III-secreted proteins of *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria are encoded within the hrp pathogenicity island." J Bacteriol 184(5): 1340-1348.
- Nougayrede, J. P. y M. S. Donnenberg (2004). "Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway." Cell Microbiol 6(11): 1097-1111.
- Ogino, T., R. Ohno, K. Sekiya, A. Kuwae, T. Matsuzawa, T. Nonaka, H. Fukuda, S. Imajoh-Ohmi y A. Abe (2006). "Assembly of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol 188(8): 2801-2811.
- Oh, H. S., B. H. Kvitko, J. E. Morello y A. Collmer (2007). "*Pseudomonas syringae* lytic transglycosylases coregulated with the type III secretion system contribute to the translocation of effector proteins into plant cells." J Bacteriol 189(22): 8277-8289.

- Oh, H. S., D. H. Park y A. Collmer (2010). "Components of the *Pseudomonas syringae* type III secretion system can suppress and may elicit plant innate immunity." Mol Plant Microbe Interact 23(6): 727-739.
- Ohnishi, K., F. Fan, G. J. Schoenhals, M. Kihara y R. M. Macnab (1997). "The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*: putative components for flagellar assembly." J Bacteriol 179(19): 6092-6099.
- Pallen, M. J., S. A. Beatson y C. M. Bailey (2005). "Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion." BMC Microbiol 5: 9.
- Papatheodorou, P., G. Domanska, M. Oxle, J. Mathieu, O. Selchow, B. Kenny y J. Rasso (2006). "The enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Map effector is imported into the mitochondrial matrix by the TOM/Hsp70 system and alters organelle morphology." Cell Microbiol 8(4): 677-689.
- Paradis-Bleau, C., I. Cloutier, L. Lemieux, F. Sanschagrin, J. Laroche, M. Auger, A. Garnier y R. C. Levesque (2007). "Peptidoglycan lytic activity of the *Pseudomonas aeruginosa* phage phiKZ gp144 lytic transglycosylase." FEMS Microbiol Lett 266(2): 201-209.
- Phillips, N., R. D. Hayward y V. Koronakis (2004). "Phosphorylation of the enteropathogenic *E. coli* receptor by the Src-family kinase c-Fyn triggers actin pedestal formation." Nat Cell Biol 6(7): 618-625.
- Pizarro-Cerda, J. y P. Cossart (2006). "Bacterial adhesion and entry into host cells." Cell 124(4): 715-727.
- Pucciarelli, M. G. y F. Garcia-del Portillo (2003). "Protein-peptidoglycan interactions modulate the assembly of the needle complex in the *Salmonella* invasion-associated type III secretion system." Mol Microbiol 48(2): 573-585.
- Puente, J. L., D. Bieber, S. W. Ramer, W. Murray y G. K. Schoolnik (1996). "The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals." Mol Microbiol 20(1): 87-100.
- Pugsley, A. P. (1993). "The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria." Microbiol Rev 57(1): 50-108.
- Reid, C. W., N. T. Blackburn, B. A. Legaree, F. I. Auzanneau y A. J. Clarke (2004). "Inhibition of membrane-bound lytic transglycosylase B by NAG-thiazoline." FEBS Lett 574(1-3): 73-79.
- Rohde, M., J. Puls, R. Buhrdorf, W. Fischer y R. Haas (2003). "A novel sheathed surface organelle of the *Helicobacter pylori* cag type IV secretion system." Mol Microbiol 49(1): 219-234.
- Rosenshine, I., S. Ruschkowski y B. B. Finlay (1996). "Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells." Infect Immun 64(3): 966-973.
- Rosenshine, I., S. Ruschkowski, M. Stein, D. J. Reinscheid, S. D. Mills y B. B. Finlay (1996). "A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation." EMBO J 15(11): 2613-2624.
- Rossmann, M. G., V. V. Mesyanzhinov, F. Arisaka y P. G. Leiman (2004). "The bacteriophage T4 DNA injection machine." Curr Opin Struct Biol 14(2): 171-180.
- Rottner, K., T. E. Stradal y J. Wehland (2005). "Bacteria-host-cell interactions at the plasma membrane: stories on actin cytoskeleton subversion." Dev Cell 9(1): 3-17.
- Ruiz-Díaz, U. A. (2006). "Análisis sobre la regulación del gen *rorf3* en *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). ." Tesis para obtener el título de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.
- Rydman, P. S. y D. H. Bamford (2000). "Bacteriophage PRD1 DNA entry uses a viral membrane-associated transglycosylase activity." Mol Microbiol 37(2): 356-363.
- Sakai, D. y T. Komano (2002). "Genes required for plasmid R64 thin-pilus biogenesis: identification and localization of products of the pilK, pilM, pilO, pilP, pilR, and pilT genes." J Bacteriol 184(2): 444-451.
- Sanchez-SanMartin, C., V. H. Bustamante, E. Calva y J. L. Puente (2001). "Transcriptional regulation of the orf19 gene and the tir-cesT-eae operon of enteropathogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol 183(9): 2823-2833.
- Savkovic, S. D., A. Koutsouris y G. Hecht (1997). "Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*." Am J Physiol 273(4 Pt 1): C1160-1167.
- Scaletsky, I. C., M. L. Silva y L. R. Trabulsi (1984). "Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells." Infect Immun 45(2): 534-536.
- Scheurwater, E., C. W. Reid y A. J. Clarke (2008). "Lytic transglycosylases: bacterial space-making autolysins." Int J Biochem Cell Biol 40(4): 586-591.
- Scheurwater, E. M. y L. L. Burrows (2011). "Maintaining network security: how macromolecular structures cross the peptidoglycan layer." FEMS Microbiol Lett.

- Scheurwater, E. M. y A. J. Clarke (2008). "The C-terminal domain of *Escherichia coli* YfhD functions as a lytic transglycosylase." J Biol Chem 283(13): 8363-8373.
- Schuller, S., Y. Chong, J. Lewin, B. Kenny, G. Frankel y A. D. Phillips (2007). "Tir phosphorylation and Nck/N-WASP recruitment by enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* during ex vivo colonization of human intestinal mucosa is different to cell culture models." Cell Microbiol 9(5): 1352-1364.
- Sekiya, K., M. Ohishi, T. Ogino, K. Tamano, C. Sasakawa y A. Abe (2001). "Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure." Proc Natl Acad Sci U S A 98(20): 11638-11643.
- Shaw, R. K., J. Cleary, M. S. Murphy, G. Frankel y S. Knutton (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(2): 1243-1251.
- Shaw, R. K., S. Daniell, G. Frankel y S. Knutton (2002). "Enteropathogenic *Escherichia coli* translocate Tir and form an intimin-Tir intimate attachment to red blood cell membranes." Microbiology 148(Pt 5): 1355-1365.
- Shaw, R. K., K. Smollett, J. Cleary, J. Garmendia, A. Straatman-Iwanowska, G. Frankel y S. Knutton (2005). "Enteropathogenic *Escherichia coli* type III effectors EspG and EspG2 disrupt the microtubule network of intestinal epithelial cells." Infect Immun 73(7): 4385-4390.
- Silhavy, T. J., D. Kahne y S. Walker (2010). "The bacterial cell envelope." Cold Spring Harb Perspect Biol 2(5): a000414.
- Sperandio, V., J. L. Mellies, R. M. Delahay, G. Frankel, J. A. Crawford, W. Nguyen y J. B. Kaper (2000). "Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler." Mol Microbiol 38(4): 781-793.
- Spreter, T., C. K. Yip, S. Sanowar, I. Andre, T. G. Kimbrough, M. Vuckovic, R. A. Pfuetzner, W. Deng, A. C. Yu, B. B. Finlay, D. Baker, S. I. Miller y N. C. Strynadka (2009). "A conserved structural motif mediates formation of the periplasmic rings in the type III secretion system." Nat Struct Mol Biol 16(5): 468-476.
- Stone, K. D., H. Z. Zhang, L. K. Carlson y M. S. Donnenberg (1996). "A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus." Mol Microbiol 20(2): 325-337.
- Sukhan, A., T. Kubori, J. Wilson y J. E. Galan (2001). "Genetic analysis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar Typhimurium type III secretion-associated needle complex." J Bacteriol 183(4): 1159-1167.
- Sun, P., J. E. Tropea, B. P. Austin, S. Cherry y D. S. Waugh (2008). "Structural characterization of the *Yersinia pestis* type III secretion system needle protein YscF in complex with its heterodimeric chaperone YscE/YscG." J Mol Biol 377(3): 819-830.
- Swimm, A., B. Bommarius, Y. Li, D. Cheng, P. Reeves, M. Sherman, D. Veach, W. Bornmann y D. Kalman (2004). "Enteropathogenic *Escherichia coli* use redundant tyrosine kinases to form actin pedestals." Mol Biol Cell 15(8): 3520-3529.
- Tampakaki, A. P., V. E. Fadoulglou, A. D. Gazi, N. J. Panopoulos y M. Kokkinidis (2004). "Conserved features of type III secretion." Cell Microbiol 6(9): 805-816.
- Thanabalasuriar, A., A. Koutsouris, A. Weflen, M. Mimee, G. Hecht y S. Gruenheid (2010). "The bacterial virulence factor NleA is required for the disruption of intestinal tight junctions by enteropathogenic *Escherichia coli*." Cell Microbiol 12(1): 31-41.
- Thomas, N. A., W. Deng, J. L. Puente, E. A. Frey, C. K. Yip, N. C. Strynadka y B. B. Finlay (2005). "CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*." Mol Microbiol 57(6): 1762-1779.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins y T. J. Gibson (1994). "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice." Nucleic Acids Res 22(22): 4673-4680.
- Thunnissen, A. M., A. J. Dijkstra, K. H. Kalk, H. J. Rozeboom, H. Engel, W. Keck y B. W. Dijkstra (1994). "Doughnut-shaped structure of a bacterial muramidase revealed by X-ray crystallography." Nature 367(6465): 750-753.
- Thunnissen, A. M., H. J. Rozeboom, K. H. Kalk y B. W. Dijkstra (1995). "Structure of the 70-kDa soluble lytic transglycosylase complexed with bulgecin A. Implications for the enzymatic mechanism." Biochemistry 34(39): 12729-12737.
- Tobe, T., G. K. Schoolnik, I. Sohel, V. H. Bustamante y J. L. Puente (1996). "Cloning and characterization of bfpTVW, genes required for the transcriptional activation of bfpA in enteropathogenic *Escherichia coli*." Mol Microbiol 21(5): 963-975.

- Torres, A. G., X. Zhou y J. B. Kaper (2005). "Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells." Infect Immun 73(1): 18-29.
- Touze, T., R. D. Hayward, J. Eswaran, J. M. Leong y V. Koronakis (2004). "Self-association of EPEC intimin mediated by the beta-barrel-containing anchor domain: a role in clustering of the Tir receptor." Mol Microbiol 51(1): 73-87.
- Tu, X., I. Nisan, C. Yona, E. Hanski y I. Rosenshine (2003). "EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*." Mol Microbiol 47(3): 595-606.
- van Asselt, E. J., A. M. Thunnissen y B. W. Dijkstra (1999). "High resolution crystal structures of the *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt70 and its complex with a peptidoglycan fragment." J Mol Biol 291(4): 877-898.
- Viollier, P. H. y L. Shapiro (2003). "A lytic transglycosylase homologue, PleA, is required for the assembly of pili and the flagellum at the *Caulobacter crescentus* cell pole." Mol Microbiol 49(2): 331-345.
- Viswanathan, V. K., K. Hodges y G. Hecht (2009). "Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea." Nat Rev Microbiol 7(2): 110-119.
- Viswanathan, V. K., S. Lukic, A. Koutsouris, R. Miao, M. M. Muza y G. Hecht (2004). "Cytokeratin 18 interacts with the enteropathogenic *Escherichia coli* secreted protein F (EspF) and is redistributed after infection." Cell Microbiol 6(10): 987-997.
- Vollmer, W. (2008). "Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan." FEMS Microbiol Rev 32(2): 287-306.
- Vollmer, W. y U. Bertsche (2008). "Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*." Biochim Biophys Acta 1778(9): 1714-1734.
- Vollmer, W., D. Blanot y M. A. de Pedro (2008). "Peptidoglycan structure and architecture." FEMS Microbiol Rev 32(2): 149-167.
- Vollmer, W. y J. V. Holtje (2004). "The architecture of the murein (peptidoglycan) in gram-negative bacteria: vertical scaffold or horizontal layer(s)?" J Bacteriol 186(18): 5978-5987.
- Vollmer, W., B. Joris, P. Charlier y S. Foster (2008). "Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases." FEMS Microbiol Rev 32(2): 259-286.
- Vollmer, W. y S. J. Seligman (2010). "Architecture of peptidoglycan: more data and more models." Trends Microbiol 18(2): 59-66.
- Wachter, C., C. Beinke, M. Mattes y M. A. Schmidt (1999). "Insertion of EspD into epithelial target cell membranes by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*." Mol Microbiol 31(6): 1695-1707.
- Wagner, S., L. Konigsmaier, M. Lara-Tejero, M. Lefebvre, T. C. Marlovits y J. E. Galan (2010). "Organization and coordinated assembly of the type III secretion export apparatus." Proc Natl Acad Sci U S A 107(41): 17745-17750.
- Wallden, K., A. Rivera-Calzada y G. Waksman (2010). "Type IV secretion systems: versatility and diversity in function." Cell Microbiol 12(9): 1203-1212.
- Wang, D., A. J. Roe, S. McAteer, M. J. Shipston y D. L. Gally (2008). "Hierarchical type III secretion of translocators and effectors from *Escherichia coli* O157:H7 requires the carboxy terminus of SepL that binds to Tir." Mol Microbiol 69(6): 1499-1512.
- Warawa, J., B. B. Finlay y B. Kenny (1999). "Type III secretion-dependent hemolytic activity of enteropathogenic *Escherichia coli*." Infect Immun 67(10): 5538-5540.
- Warawa, J. y B. Kenny (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(5): 1269-1280.
- Wilson, R. K., R. K. Shaw, S. Daniell, S. Knutton y G. Frankel (2001). "Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*." Cell Microbiol 3(11): 753-762.
- Worrall, L. J., M. Vuckovic y N. C. Strynadka (2010). "Crystal structure of the C-terminal domain of the *Salmonella* type III secretion system export apparatus protein InvA." Protein Sci 19(5): 1091-1096.
- Yip, C. K., T. G. Kimbrough, H. B. Felise, M. Vuckovic, N. A. Thomas, R. A. Pfuetzner, E. A. Frey, B. B. Finlay, S. I. Miller y N. C. Strynadka (2005). "Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly." Nature 435(7042): 702-707.
- Yoshida, T., S. R. Kim y T. Komano (1999). "Twelve pil genes are required for biogenesis of the R64 thin pilus." J Bacteriol 181(7): 2038-2043.
- Yu, Y. C., C. N. Lin, S. H. Wang, S. C. Ng, W. S. Hu y W. J. Syu (2010). "A putative lytic transglycosylase tightly regulated and critical for the EHEC type three secretion." J Biomed Sci 17: 52.

- Zahrl, D., M. Wagner, K. Bischof, M. Bayer, B. Zavec, A. Beranek, C. Ruckstuhl, G. E. Zarfel y G. Koraimann (2005). "Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems." Microbiology 151(Pt 11): 3455-3467.
- Zarivach, R., W. Deng, M. Vuckovic, H. B. Felise, H. V. Nguyen, S. I. Miller, B. B. Finlay y N. C. Strynadka (2008). "Structural analysis of the essential self-cleaving type III secretion proteins EscU and SpaS." Nature 453(7191): 124-127.
- Zarivach, R., M. Vuckovic, W. Deng, B. B. Finlay y N. C. Strynadka (2007). "Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system." Nat Struct Mol Biol 14(2): 131-137.
- Zhang, J., X. Wang, Y. Zhang, G. Zhang y J. Wang (2008). "A conserved Hpa2 protein has lytic activity against the bacterial cell wall in phytopathogenic *Xanthomonas oryzae*." Appl Microbiol Biotechnol 79(4): 605-616.
- Zhang, Q., Q. Li, C. Wang, X. Liu, N. Li y J. Li (2009). "Enteropathogenic *Escherichia coli* changes distribution of occludin and ZO-1 in tight junction membrane microdomains in vivo." Microb Pathog.
- Zupan, J., C. A. Hackworth, J. Aguilar, D. Ward y P. Zambryski (2007). "VirB1* promotes T-pilus formation in the vir-Type IV secretion system of *Agrobacterium tumefaciens*." J Bacteriol 189(18): 6551-6563.

ANEXO

"The muramidase EtgA from enteropathogenic *Escherichia coli* is required for efficient type III secretion"

Elizabeth García Gómez, Norma Espinosa, Javier de la Mora, Georges Dreyfus y Bertha González Pedrajo

Microbiology 157 : 1145-1160

The muramidase *EtgA* from enteropathogenic *Escherichia coli* is required for efficient type III secretion

Elizabeth García-Gómez, Norma Espinosa, Javier de la Mora, Georges Dreyfus and Bertha González-Pedrajo

Correspondence

Bertha González-Pedrajo
bpedrajo@ifc.unam.mx

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., 04510, Mexico

Received 21 September 2010
Revised 23 December 2010
Accepted 10 January 2011

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is an important cause of infectious diarrhoea. It colonizes human intestinal epithelial cells by delivering effector proteins into the host cell cytoplasm via a type III secretion system (T3SS) encoded within the chromosomal locus of enterocyte effacement (LEE). The LEE pathogenicity island also encodes a lytic transglycosylase (LT) homologue named *EtgA*. In the present work we investigated the significance of *EtgA* function in type III secretion (T3S). Purified recombinant *EtgA* was found to have peptidoglycan lytic activity *in vitro*. Consistent with this function, signal peptide processing and bacterial cell fractionation revealed that *EtgA* is a periplasmic protein. *EtgA* possesses the conserved glutamate characteristic of the LT family, and we show here that it is essential for enzymic activity. Overproduction of *EtgA* in EPEC inhibits bacterial growth and induces cell lysis unless the predicted catalytic glutamate is mutated. An *etgA* mutant is attenuated for T3S, red blood cell haemolysis and *EspA* filamentation. *BfpH*, a plasmid-encoded putative LT, was not able to functionally replace *EtgA*. Overall, our results indicate that the muramidase activity of *EtgA* is not critical but makes a significant contribution to the efficiency of the T3S process.

INTRODUCTION

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is a major cause of infantile diarrhoea in developing countries (Chen & Frankel, 2005; Nataro & Kaper, 1998). It colonizes the small intestine, producing a characteristic histopathology referred to as the attaching and effacing (A/E) lesion, which is defined by the localized effacement of host cell microvilli, intimate attachment of the bacterium to the enterocyte plasma membrane and the accumulation of polymerized actin, which leads to the formation of pedestal-like structures beneath adherent bacteria (Chen & Frankel, 2005; Knutton *et al.*, 1987; Moon *et al.*, 1983; Rosenshine *et al.*, 1996).

All the factors needed for the development of the A/E phenotype are encoded within a chromosomal pathogenicity

island called the locus of enterocyte effacement (LEE) (McDaniel *et al.*, 1995; McDaniel & Kaper, 1997). The locus contains 41 genes organized in five major polycistronic operons (LEE1–LEE5) and several smaller transcriptional units, which are positively regulated by *Ler*, encoded by the first gene of the LEE1 operon (Bustamante *et al.*, 2001; Mellies *et al.*, 2007).

The LEE also encodes a type III secretion system (T3SS) (Jarvis *et al.*, 1995), proteins essential for intimate adherence (Tir and intimin) (Kenny *et al.*, 1997b), translocated effectors that subvert host cellular processes, and chaperones (Clarke *et al.*, 2003; Chen & Frankel, 2005; Dean & Kenny, 2009). Other closely related bacteria that produce A/E lesions, including enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) and the mouse pathogen *Citrobacter rodentium*, also carry the LEE (Deng *et al.*, 2004; McDaniel *et al.*, 1995).

T3SSs are used by many Gram-negative pathogens to deliver effector proteins directly into eukaryotic cells (Cornelis, 2006; Hueck, 1998). The virulence-associated T3SS, also known as the ‘injectisome’, is a macromolecular structure that traverses the bacterial membranes and periplasmic space. More than 20 different proteins assemble into a syringe-like structure consisting of a needle complex and a translocon (Blocker *et al.*, 2001; Kubori

Abbreviations: A/E, attaching and effacing; BDP, *E. coli* BL21 DE3 pLysS; BFP, bundle-forming pilus; CBB, Coomassie brilliant blue; EAF, EPEC adherence factor; EHEC, enterohaemorrhagic *Escherichia coli*; EPEC, enteropathogenic *Escherichia coli*; LEE, locus of enterocyte effacement; LT, lytic transglycosylase; MBP, maltose binding protein; PG, peptidoglycan; RBC, red blood cell; T3S, type III secretion; T3SS, type III secretion system; T4SS, type IV secretion system.

Two supplementary figures, showing the PG-degrading activity of MBP-*EtgA*s on a zymogram gel and time-course analysis of the stability of T3SS proteins in an EPEC wild-type strain overexpressing *EtgA*, are available with the online version of this paper.

et al., 1998; Mueller *et al.*, 2005, 2008). The needle complex shares a structural resemblance with the flagellum basal body, and a high degree of sequence similarity exists between eight proteins of their secretion apparatuses (Blocker *et al.*, 2003; Cornelis, 2006).

The T3SS in EPEC is composed of proteins distributed among all cell envelope compartments (Sekiya *et al.*, 2001). The cylindrical basal structure consists of two sets of membrane ring complexes joined by a periplasmic central rod (Ogino *et al.*, 2006). EscC is associated with the outer membrane and is a member of the secretin pore-forming family of proteins (Gauthier *et al.*, 2003; Genin & Boucher, 1994), whereas the lipoprotein EscJ oligomerizes to form a ring predicted to be associated to the outer leaflet of the inner membrane (Yip *et al.*, 2005). The EscD protein is also predicted to form a ring-like structure in the inner membrane, and EscI is believed to form the inner rod (Pallen *et al.*, 2005). In addition, several integral and associated inner-membrane proteins are predicted to form the export apparatus essential for protein secretion (Cornelis, 2006; Trevor *et al.*, 2007). Among these, the highly conserved ATPase EscN serves to energize the secretion process and may provide a docking interface for chaperone-effector complexes (Andrade *et al.*, 2007; Gauthier & Finlay, 2003; Thomas *et al.*, 2005; Zarivach *et al.*, 2007).

The extracellular portion of this nanomachine is formed by a needle structure polymerized from EscF subunits (Sekiya *et al.*, 2001). Furthermore, the injectisome in EPEC and other A/E pathogens is unique in that it has a filamentous extension, called the EspA filament, which extends from the needle and provides a hollow conduit for protein translocation (Daniell *et al.*, 2001; Knutton *et al.*, 1998; Sekiya *et al.*, 2001). EspB and EspD are secreted by the T3SS and form a translocation pore in the host cell membrane (Ide *et al.*, 2001).

Injectisome assembly is a highly regulated process that occurs via both Sec-dependent and Sec-independent pathways (Galán & Wolf-Watz, 2006; Hueck, 1998). During its biosynthesis, the T3SS has to traverse the physical barrier imposed by the peptidoglycan (PG). To accomplish this task, PG-lytic enzymes are employed (Dijkstra & Keck, 1996; Koraimann, 2003). Among these, specialized lytic transglycosylases (LTs) that specifically cleave the β -1,4 glycosidic bond between *N*-acetylmuramic acid and *N*-acetylglucosamine residues of PG with concomitant formation of 1,6-anhydromuramic acid residues have been implicated in facilitating the assembly of pili, flagella and secretion systems (Bayer *et al.*, 2001; de la Mora *et al.*, 2007; Kohler *et al.*, 2007; Koraimann, 2003; Nambu *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2007; Viollier & Shapiro, 2003; Zahrl *et al.*, 2005; Zupan *et al.*, 2007).

As a result of a bioinformatics analysis of the LEE, the product of the *rorf3* gene was predicted to be an LT and was renamed as EtgA for *E. coli* transglycosylase (Pallen *et al.*, 2005). In this work we hypothesized that EtgA could

be required for local rearrangements in the PG, enlarging gaps to allow the assembly of the envelope-spanning T3SS. We show that EtgA is a PG-degrading enzyme required for efficient type III protein secretion in EPEC.

METHODS

Bacterial strains, plasmids, oligonucleotides and growth conditions. The bacterial strains, plasmids and oligonucleotides used in this study are shown in Table 1. Bacteria were grown in either Luria-Bertani (LB) broth (Sambrook & Russell, 2001) or Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Gibco). EPEC strains were grown under static conditions in prewarmed DMEM supplemented with 1% LB at 37 °C in a 5% (v/v) CO₂ atmosphere, unless stated otherwise. When required, the medium was supplemented with 100 µg ampicillin ml⁻¹, 25 µg chloramphenicol ml⁻¹, 50 µg kanamycin ml⁻¹, 25 µg streptomycin ml⁻¹ or 25 µg tetracycline ml⁻¹.

DNA manipulations. Recombinant DNA techniques were performed according to standard methods (Sambrook & Russell, 2001). Restriction enzymes and T4 DNA ligase were from New England Biolabs. Synthetic primers were purchased from Sigma. PCR was carried out using either *Taq* DNA polymerase (Qiagen) or *PfuTurbo* DNA polymerase (Stratagene). DNA sequencing was performed by the sequencing facility of the authors' institute [Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)].

Plasmid construction and site-directed mutagenesis. The *etgA* gene was PCR-amplified from chromosomal DNA of wild-type EPEC strain E2348/69, using primers *etgAFw* and *etgARv*. The PCR product was double-digested with *NdeI* and *BamHI* and cloned into the pET19b expression vector, which allows production of an N-terminally polyhistidine-tagged protein, to generate plasmid pEEetgA. A truncated version of *etgA* lacking its signal sequence (*etgAns*) was constructed in the same manner with the primer pair *etgAnsFw* and *etgARv*, to yield plasmid pEEetgAns. Constructs in pET19b were used for gene subcloning into *NdeI*- and *BamHI*-digested pTrc99AFF4, to generate plasmids pNTetgA and pNTetgAns, and into *NcoI*- and *BamHI*-digested pTrc99A, to generate plasmid pETHetgA. For complementation assays, *etgA* was subcloned as an *NdeI/BamHI* fragment into vector pET3a to yield pEE3aetgA. To produce an N-terminally maltose binding protein (MBP)-tagged EtgA, *etgA* was PCR-amplified with primers *etgABFw* and *etgAHRv* and cloned into pMALc2Xa as a *BamHI/HindIII* fragment, generating plasmid pNLetgAnsB.

Site-directed mutagenesis was done using the QuikChange protocol (Stratagene) with the mutagenic oligonucleotides *etgAGluAFw* and *etgAGluARv*. The desired point mutation was confirmed by DNA sequencing of plasmids pEEetgAE42A and pEEetgAnsE42A. Plasmid pNTetgAE42A was generated by subcloning from pEEetgAE42A into *NdeI/BamHI*-digested pTrc99AFF4.

Construction of *etgA* null mutants. An in-frame deletion of *etgA* was generated using the λ Red recombinase one-step inactivation system (Datsenko & Wanner, 2000). Plasmid pKD13 was used as the kanamycin-resistance cassette DNA template for PCR amplification with oligonucleotides *deletgA13Fw* and *deletgA13Rv*, which generated a non-polar deletion of *etgA* codons 41–131. The PCR product containing the kanamycin-resistance cassette was introduced by electroporation into EPEC E2348/69 or JPEP30 strains harbouring plasmid pKD46. Mutant strains Δ *etgA* and Δ *etgA*EEAF– were selected on LB agar plates supplemented with kanamycin. The allelic replacement of *etgA* was verified by PCR using different combinations

Table 1. Strains, plasmids and oligonucleotides used in this study

Strain, plasmid or oligonucleotide	Description or sequence (5'–3')*	Source or reference
EPEC strains		
E2348/69	Wild-type EPEC O127:H6, Sm ^R	Levine <i>et al.</i> (1978)
JPEP30	E2348/69 EAF plasmid-cured, Sm ^R	V. H. Bustamante and others, unpublished results
JPEP24	E2348/69 carrying an in-frame deletion of <i>ler</i> , Km ^R	V. H. Bustamante and others, unpublished results
Δ <i>escN</i>	E2348/69 carrying an in-frame deletion of <i>escN</i>	Gauthier <i>et al.</i> (2003)
Δ <i>etgA</i>	E2348/69 carrying an in-frame deletion of <i>etgA</i> , Km ^R	This study
Δ <i>etgA</i> EAF–	JPEP30 carrying an in-frame deletion of <i>etgA</i> , Km ^R	This study
Other <i>E. coli</i> strains		
Top10	F [–] <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 nupG recA1 araD139 Δ(<i>ara-leu</i>)7697 <i>galE15 galK16 rpsL</i> (Str^R) <i>endA1</i> λ[–]; cloning host</i>	Invitrogen
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^q Z</i> Δ M15 Tn10 (Tc ^R)]	Stratagene
BL21 DE3 pLysS	F [–] <i>ompT gal dcm lon hsdS_B</i> (r _B [–] m _B [–]) λ BL21(DE3) [pLysS Cm ^R]; expression strain	Novagen
Plasmids		
pET3a	Expression vector, T7 promoter, Ap ^R	Novagen
pET19b	Expression vector, T7 <i>lac</i> promoter, Ap ^R , production of recombinant proteins with an N-terminal 10-His tag	Novagen
pMALc2Xa	Expression vector, <i>tac</i> promoter, Ap ^R , production of recombinant proteins with an N-terminal MBP tag	New England Biolabs
pTrc99A	Expression vector, <i>trc</i> promoter, Ap ^R	Amersham-Pharmacia
pTrc99AFF4	Modified pTrc99A expression vector, <i>trc</i> promoter, Ap ^R	Ohnishi <i>et al.</i> (1997)
pKD13	Template plasmid for kanamycin-resistance cassette, Ap ^R Km ^R	Datsenko & Wanner (2000)
pKD46	Red recombinase system plasmid, P _{BAD} promoter, Ap ^R	Datsenko & Wanner (2000)
pEEetgA	<i>etgA</i> cloned into pET19b	This study
pEEetgAns	<i>etgA</i> lacking its signal sequence cloned into pET19b	This study
pEEetgAE42A	<i>etgA</i> carrying an E42A mutation cloned into pET19b	This study
pEEetgAnsE42A	<i>etgAns</i> carrying an E42A mutation cloned into pET19b	This study
pEE3aetgA	<i>etgA</i> cloned into pET3a	This study
pNLetgAnsB	<i>etgAns</i> cloned into pMALc2X	This study
pNTetgA	<i>etgA</i> cloned into pTrc99AFF4	This study
pNTetgAns	<i>etgAns</i> cloned into pTrc99AFF4	This study
pNTetgAE42A	<i>etgA</i> carrying an E42A mutation cloned into pTrc99AFF4	This study
pETHetgA	His-tagged <i>etgA</i> cloned into pTrc99A	This study
Oligonucleotides		
etgAFw	GAGTAACAACGTACATATGAAAAA	This study
etgARv	CGATAGACCTGGATCCTTAATCGA	This study
etgAnsFw	ACTGTAATCATATGGATTGTTTTG	This study
etgAGluAFw	CAATTGCATGGAATGCATCAAAAATGCAAAAAGC	This study
etgAGluARv	GCTTTTGCATTTTGTATGCATTCATGCAATTG	This study
etgABFw	ACTGTAATGGATCCGATTGTTTTG	This study
etgAHRv	CGATAGACCAAGCTTATTAATGCA	This study
deletgA13Fw	TCATTATTCTTAAATTTATATATGTTTTATATATTTTCATTGCGTATTG-GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	This study
deletgA13Rv	CAGGAAAAGCATATAACATAGATCCACTAATATTAAGCAATTGCATG-GATTCCGGGGATCCGTCCACC	This study
escUFw	TAAACTGGCTGAACTCTATG	This study
grlRRv	TATCCATAAGCAATATCAAG	This study

Table 1. cont.

Strain, plasmid or oligonucleotide	Description or sequence (5'-3')*	Source or reference
K1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	Datsenko & Wanner (2000)
K2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	Datsenko & Wanner (2000)
KT	CGGCCACAGTCGATGAATCC	Datsenko & Wanner (2000)

*Abbreviations: Ap^R, ampicillin resistance; Cm^R, chloramphenicol resistance; Km^R, kanamycin resistance; Sm^R, streptomycin resistance; Tc^R, tetracycline resistance.

of the oligonucleotides K1, K2, KT, escUFw and grlRRv, and by sequencing.

Purification of recombinant variants of EtgA. *E. coli* BL21 DE3 pLysS (BDP) cells carrying plasmid pEEtgAns (or pEEtgAnsE42A) were grown in 500 ml LB containing ampicillin and incubated at 30 °C with shaking until the cell density reached OD₆₀₀ 0.6. IPTG was added to a final concentration of 0.1 mM and incubation was continued for 2 h. Bacterial cells were collected by centrifugation (8000 g, 10 min) and stored at -20 °C. The cells were thawed, suspended in binding buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 M NaCl) with 1 mM PMSF, and lysed by sonication. Cell lysates were centrifuged (27 000 g, 20 min) to pellet undisturbed cells and cellular debris. Cleared lysates were obtained after further centrifugation (145 000 g, 1 h), and loaded onto a nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) agarose column pre-equilibrated with binding buffer. After extensive washing with binding buffer containing 60 and 80 mM imidazole, the protein was eluted with increasing concentrations of imidazole (200, 300 and 600 mM). Purified recombinant protein was dialysed against TNED buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.5 M NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.2 mM DTT) containing 20% (v/v) glycerol. Purification of MBP-EtgAns was carried out using the same protocol with the following modifications. BDP cells harbouring plasmid pNLetgAnsB were grown in LB medium containing 0.2% (w/v) glucose and expression was induced with 1 mM IPTG. Cleared lysates were loaded onto an amylose resin column, washed with binding buffer containing 0.5 mM maltose and eluted with 10 mM maltose. Purified MBP-EtgAns was dialysed against TNED buffer. Protein concentration was determined by using the Bio-Rad protein assay dye-binding reagent.

Immunoblotting and generation of polyclonal anti-EtgA. Proteins were resolved by 15% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes (Whatman). The blots were blocked overnight at 4 °C with Tris-buffered saline (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl) containing 0.1% (v/v) Tween 20 and 5% (w/v) nonfat dry milk. Immunoblotting was carried out with polyclonal anti-CesT, anti-CesD2, anti-EspA, anti-EspB, anti-EspF, anti-Tir, anti-EtgA, anti-SepL, anti-MBP [horseradish peroxidase (HRP) conjugated, New England Biolabs], and monoclonal anti-His (India-His-Probe-HRP, Pierce) and anti-DnaK (Assay Designs) primary antibodies. Secondary antibodies were HRP-conjugated goat anti-rabbit or goat anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology). Detection was performed with a SuperSignal West Pico chemiluminescence detection kit (Pierce) according to the manufacturer's instructions. A polyclonal antibody against EtgA was raised by subcutaneous immunization of rabbits with His-EtgAns. Antiserum was obtained from whole blood and antibodies were precipitated with saturated ammonium sulfate (Harlow & Lane, 1988).

Zymogram analysis. Zymogram gels for the determination of PG-degrading activity were performed as described elsewhere, with minor modifications (Bernadsky *et al.*, 1994; Zahrl *et al.*, 2005). Lyophilized *Micrococcus lysodeikticus* cells (Sigma) were incorporated to a final concentration of 0.2% (w/v) into 15% (w/v) polyacrylamide gels containing 0.02% (w/v) SDS. Following electrophoresis, proteins were allowed to renature by incubating the gels with 25 mM potassium phosphate buffer, pH 5.2, containing 0.1% (v/v) Triton X-100 for 48 h at 4 °C with several buffer changes. PG cleavage was visualized after staining of gels with 0.1% (w/v) methylene blue/0.01% (w/v) KOH for 60 min and destaining with distilled water.

Detection of EtgA in EPEC. To detect the different EtgA variants in cell lysates of EPEC wild-type, Δ escN and JPEP24 (Δ ler) strains, overnight cultures in LB carrying the corresponding plasmids were subcultured 1:50 in 50 ml DMEM and grown until the cell density reached OD₆₀₀ 0.6. Cells were induced with 1 mM IPTG and 1.5 ml samples were collected at different time points after induction. Bacterial cells were centrifuged at 16 100 g for 5 min and EtgA was detected in whole-cell lysates by immunoblotting using anti-EtgA antibodies.

Isolation of EPEC periplasmic fraction. Bacterial cell fractionation was performed according to a published procedure, with slight modifications (Gauthier *et al.*, 2003). Briefly, overnight cultures of EPEC carrying plasmid pNTetgAns or pNTetgAE42A were subcultured 1:50 in 100 ml DMEM and grown to OD₆₀₀ 0.6. Cells were induced with 0.1 mM IPTG and growth was continued for 1 h, at which time a 1.5 ml aliquot was taken for whole-cell lysate analysis. The cultures were harvested, washed in PBS and resuspended in 1 ml of an osmotic shock solution consisting of 50 mM Tris-HCl, pH 7.0, 20% (w/v) sucrose and 1 mM PMSF, followed by incubation with 2 mM EDTA for 10 min at room temperature. The periplasmic fraction was obtained in the supernatant after centrifugation at 8000 g for 10 min at 4 °C. Periplasmic proteins were analysed by Western blotting with anti-EtgA and anti-MBP antibodies. The isolated fraction was analysed with anti-DnaK, anti-CesT and anti-SepL antibodies as purity indicators.

EtgA overproduction in EPEC. To evaluate the effect of EtgA overexpression on bacterial growth, EPEC E2348/69 harbouring wild-type and mutated versions of *etgA* expressed from pTrc99A-based vectors was subcultured 1:50 in 30 ml DMEM and grown to OD₆₀₀ 0.2. At this point, 1 mM IPTG was added and growth was continued for 6 h. Aliquots of the culture were taken every hour to determine OD₆₀₀ and c.f.u. ml⁻¹. Furthermore, to analyse proteins released to the supernatant, EPEC containing different *etgA* variants was grown in 8 ml DMEM until the cell density reached OD₆₀₀ 0.2. Following induction with 1 mM IPTG, growth was continued for 4 h. Cells were

centrifuged and the supernatant was analysed as described below for the type III protein secretion assay.

Type III protein secretion assay. EPEC protein secretion assays were performed as described by Kenny *et al.* (1997a), with modifications. A 160 μ l volume of an overnight EPEC culture (grown in LB with shaking) was inoculated into 8 ml DMEM. Growth was continued as a standing culture (or with orbital shaking at 37 °C for strain JPEP30) to OD₆₀₀ 0.6. The culture was harvested by centrifugation at 16 100 g for 5 min and the resulting pellet was resuspended in 200 μ l 1 \times SDS-PAGE sample buffer. The supernatant proteins were precipitated by the addition of TCA (10%, v/v), incubated at 4 °C for 12 h and centrifuged at 16 100 g for 30 min. The pellet was air-dried and resuspended in 40 μ l 2 \times SDS-PAGE sample buffer containing 10% (v/v) saturated Tris base. The protein concentration of the different cultures was normalized to the OD₆₀₀ value. Secreted proteins were analysed by SDS-PAGE and immunoblotting.

Haemolysis assay. Red blood cells (RBCs) were obtained from EDTA-treated human blood and washed three times in 0.9% (w/v) NaCl. The quantification of haemolysis was performed as described elsewhere, with some modifications (Ide *et al.*, 2001; Warawa *et al.*, 1999). EPEC strains were grown in DMEM until the cell density reached OD₆₀₀ 0.4, and 0.5 ml culture was added to 0.5 ml of a 4% (v/v) RBC/DMEM solution and centrifuged at 2500 g for 1 min. After 4 h of incubation the bacteria/RBC suspension was gently resuspended. Cells were centrifuged at 12 000 g for 1 min, and the release of haemoglobin into the supernatant was monitored by measuring the A₄₅₀. Uninfected and Δ escN-infected RBCs were used as controls for basal haemolysis. The lysis obtained with wild-type EPEC was regarded as complete haemolysis. Assays were performed in triplicate.

EspA filament isolation. Total extracellular EspA protein was prepared from EPEC strains by methods similar to those described by Daniell *et al.* (2003). Overnight cultures of EPEC wild-type, Δ etgA and Δ escN strains were subcultured 1:50 in 150 ml DMEM and grown at 37 °C with gentle agitation to OD₆₀₀ 0.7. Bacteria were harvested by centrifugation (7600 g for 5 min) and resuspended in 20 ml of 20 mM Tris-HCl, pH 7.5. The filaments were sheared by vigorous vortexing for 3 min. Bacterial cells were pelleted by two centrifugation steps at 38 000 g for 20 min, and the supernatant was further centrifuged at 160 000 g for 60 min. The resulting pellet was resuspended in 50 μ l of 20 mM Tris-HCl, pH 7.5. The protein concentration of the different cultures was normalized to the OD₆₀₀ value, and analysed by SDS-PAGE and immunoblotting with anti-EspA antibodies.

RESULTS

EtgA is an LT homologue

The *etgA* gene (previously *rorf3*) is encoded in the LEE pathogenicity island as a single transcriptional unit between the LEE1 and *grlRA* operons (Fig. 1a) (Mellies *et al.*, 1999). *etgA* encodes a 152 aa protein with a deduced molecular mass of 17.1 kDa. Amino acid sequence alignment showed that EtgA is highly similar to the well-characterized soluble LT domain of Slt70 of *E. coli*, as well as to PG LTs associated with different transport systems (Fig. 1b). Highly conserved residues are included within the Pfam SLT domain (PF01464), which also contains a catalytic and invariant glutamate residue (E42 in EtgA) that is believed to be important for the architecture of the LT

active site and the reaction mechanism (Scheurwater *et al.*, 2008; Thunnissen *et al.*, 1994; van Asselt *et al.*, 2000). According to the PG LT classification, EtgA belongs to superfamily 1, based on the presence of three conserved sequence motifs: ES-GLMQ-AYNAG (Fig. 1b) (Blackburn & Clarke, 2001; Koraimann, 2003). Alignment of all members of the SLT family (<http://pfam.sanger.ac.uk>) showed the glutamate, glutamine and tyrosine to be the most conserved residues among these consensus motifs (data not shown). EtgA orthologues are encoded in the LEE pathogenicity island of other members of the A/E family of bacterial pathogens, such as EHEC and *C. rodentium*; however, in no case has their enzymic function been demonstrated. Here we pursued the functional characterization of EtgA from EPEC.

PG-degrading activity of EtgA

Sequence analysis of EtgA predicts an N-terminal signal sequence with a potential cleavage site between residues 17 and 18 (SignalP version 3.0) (Bendtsen *et al.*, 2004), suggesting that its transport to the periplasm is Sec-dependent. For protein purification, the genes encoding full-length EtgA and a truncated version without its signal sequence (EtgAns) were cloned into pET19b for expression of recombinant proteins with an N-terminal decahistidine tag. Full-length His-EtgA formed inclusion bodies and remained in the insoluble fraction (Fig. 2a). However, some of the His-EtgAns produced could be recovered in the soluble fraction of the cell lysate and was further used for affinity purification (Fig. 2a). His-EtgAns was purified to homogeneity under native conditions on a nickel-affinity column, yielding 600–900 μ g pure protein from 500 ml culture (Fig. 2b). The purified protein with a predicted molecular mass of 17.8 kDa was used for polyclonal antibody production.

In order to assess the enzymic activity of His-EtgAns we performed zymogram analysis (Bernadsky *et al.*, 1994; Zahrl *et al.*, 2005). The recombinant His-EtgAns protein produced a band of clearing at the expected position, indicating PG-degrading activity (Fig. 2c). Unrelated proteins such as flagellin (FliC) and BSA were used as negative controls. In addition, the His-tagged T3SS proteins EspB and EscN were used as negative controls, and no gel clearing was detected (data not shown). A purified MBP-EtgA version was also found to have muramidase activity (Supplementary Fig. S1).

EtgA is localized in the periplasm

Proteins secreted via the Sec-dependent general secretory pathway have their signal peptides removed by peptidases during translocation across the cytoplasmic membrane (Pugsley, 1993). To investigate whether the predicted transport of EtgA to the periplasm yielded a processed form of the protein, different *etgA* versions were over-expressed in an EPEC wild-type strain, and cell lysates were

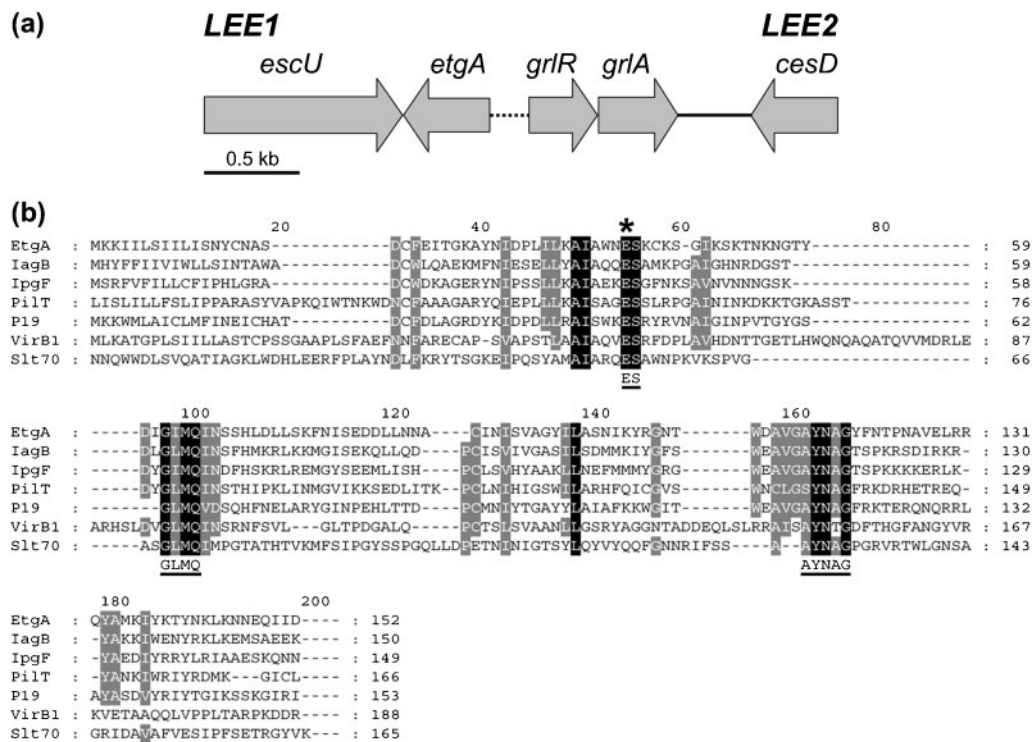


Fig. 1. EtgA genomic context and LT homologues. (a) Schematic representation of the region containing *etgA* within the LEE. *etgA* is a single transcriptional unit localized between the *LEE1* and *grlRA* operons. Genes are represented to scale by arrows. Bar, 0.5 kb. (b) Multiple sequence alignment of EtgA from EPEC E2348/69 (Q9AJ25) and SLT domains of different LTs associated with secretion systems, and of the cell growth and division LT SlT70 of *E. coli* K-12 (POAGC3) (CLUSTAL W 2.0). Other proteins used for the alignment are lagB (T3SS of *S. enterica* serovar Typhi; P43018), lpgF (T3SS of *Shigella flexneri*; Q07568), PilT (type IV pilus of *E. coli*; O07378), P19 (conjugative F-like plasmid R1-16 of *E. coli*; P17738) and VirB1 (T4SS of *Agrobacterium tumefaciens*; P17791). Identical residues are shown with a black background and conserved residues with a grey background. The consensus motifs (ES-GLMQ-AYNAG) are underlined. The catalytic glutamate is indicated with an asterisk.

analysed using anti-EtgA antibodies. Overproduction of full-length EtgA generated two forms of the protein, the unprocessed EtgA protein (17.1 kDa) and the cleaved version lacking the signal sequence EtgAns (15.2 kDa) (Fig. 3a). This result suggests that EtgA is directed to the Sec machinery and processed during its translocation across the cytoplasmic membrane. On the other hand, as expected for a protein that is unable to be transported to the periplasm, EtgAns was not processed and appeared to be unstable in the cytoplasm, since it could not be detected after 6 h (Fig. 3a). Notably, the same form of the protein remained stable at 6 h and for up to 24 h when processed in the periplasm (Fig. 3a, upper panel and data not shown). Similarly, production of His-EtgA gave rise only to the unprocessed form (19.6 kDa), suggesting that the recombinant version is not recognized by the Sec translocase and that it is not transported to the periplasm (Fig. 3a). In agreement with this, analysis of His-EtgA using SignalP does not predict a signal peptide. Next, to further study EtgA transport, we used EPEC mutants that were unable to secrete or produce T3S proteins, i.e. a Δ *escN* strain

deficient in the ATPase and a Δ *ler* strain lacking the key regulator for expression of the LEE. As seen in the lower panels of Fig. 3(a), the processing of EtgA was not altered in *escN* and *ler* mutants. These results further demonstrate that transport and periplasmic processing of EtgA are independent of the T3SS.

In addition, to directly determine the periplasmic localization of EtgA, we carried out cell fractionation. An EtgA derivative with an alanine replacing the catalytic glutamate E42 was used for this experiment in order to avoid cell lysis (see below). Periplasmic extracts were prepared from an EPEC wild-type strain producing EtgAE42A, and EtgAns without the signal peptide. The results showed that EtgAE42A fractionates with the periplasm, while the version lacking the signal sequence does not (Fig. 3b). DnaK and MBP served as cytoplasmic and periplasmic markers, respectively (Gauthier *et al.*, 2003). As additional controls we used the type III proteins CesT and SepL, which have been shown to be associated with the bacterial inner membrane (Thomas *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008).

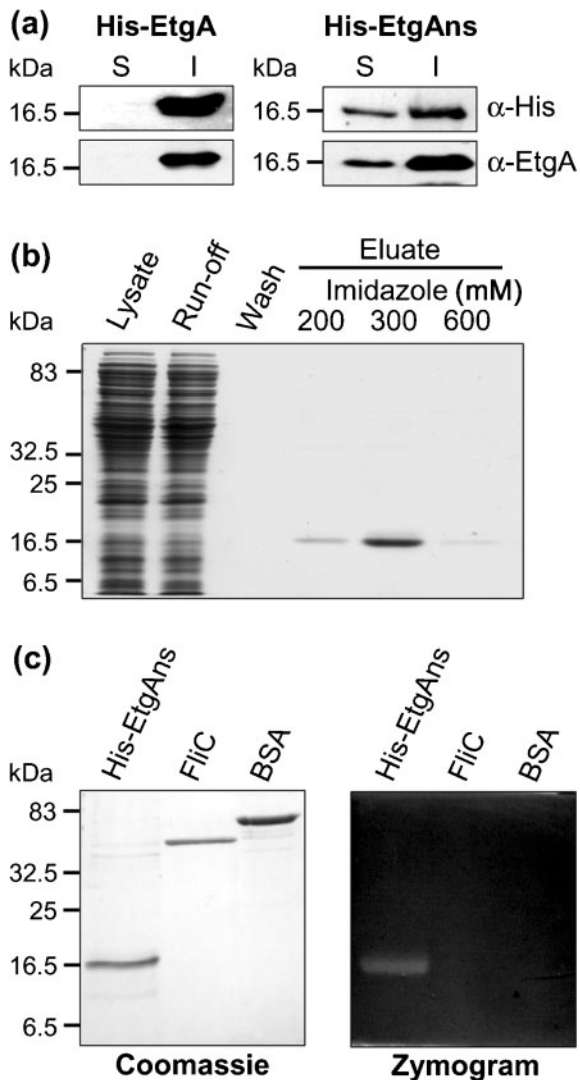


Fig. 2. Immunodetection, purification and PG-degrading activity of His-EtgAns. (a) Analysis of soluble (S) and insoluble (I) fractions of cell lysates of *E. coli* BDP induced cultures containing plasmids pEEtgA or pEEtgAns. His-EtgA and His-EtgAns recombinant proteins were detected with anti-His and anti-EtgA antibodies. (b) Purification of His-EtgAns by nickel affinity chromatography. Purified protein was obtained after elution with 300 mM imidazole. Protein samples were resolved by 15% (w/v) SDS-PAGE and stained with Coomassie brilliant blue (CBB). (c) Muramidase activity of His-EtgAns on a zymogram gel. The purified proteins were separated in an SDS-polyacrylamide gel containing *M. lysodeikticus* cells that was treated as described in Methods. Flagellin (FlhC) and BSA were used as negative controls. Coomassie, SDS-PAGE stained with CBB; Zymogram, PG-substrate gel stained with methylene blue; non-stained zones indicate PG degradation. Molecular mass markers are shown to the left.

The predicted catalytic glutamate 42 is required for EtgA muramidase activity, growth inhibition and cell lysis

The invariant glutamate residue of the LT family is thought to function as the catalytic acid/base needed to cleave the glycosidic bond (Thunnissen *et al.*, 1994). In order to further examine the function of EtgA as a putative PG transglycosylase, a point mutation was made, changing glutamic acid 42 to alanine (EtgAE42A). A cleared zone in a zymogram gel was detected for purified His-EtgAns but not for His-EtgAnsE42A (Fig. 4a), indicating that the glutamate at position 42 is essential for PG-degrading activity.

To investigate whether overproduction of EtgA affects cell growth, EPEC cells transformed with different variant *etgA* alleles were analysed for growth in liquid culture. All constructs were found to produce stable protein, although EtgAns was only stable for 3 h after IPTG induction (data not shown; Fig. 3a). Growth in liquid cultures was monitored by following the OD₆₀₀ and bacterial viability was estimated by determining c.f.u. ml⁻¹. In agreement with our previous results, protein not transported to the periplasm or unable to degrade PG had no effect on EPEC growth, whereas overproduction of native EtgA inhibited growth (Fig. 4b). This suggests that expression of EtgA causes periplasmic stress and bacterial cell death. In this regard, the EPEC wild-type strain harbouring pTrc99A reached 4.4×10^9 c.f.u. ml⁻¹, while the viable counts for the strain expressing plasmid pNTetgA dropped to 7.8×10^8 c.f.u. ml⁻¹. These results show a loss of cell viability of 10-fold after 6 h of induction. Even though we did not observe extensive lysis, as would be indicated by a decline in optical density, when aliquots of the cell cultures were analysed for secreted proteins, cell lysis was apparent, since multiple proteins were released to the supernatant of the culture that expressed EtgA (data not shown; see below). In contrast to EtgA, no such detrimental effect on cell growth was observed in the case of EtgAE42A, which had a growth rate identical to that of the EPEC strain harbouring the empty vector control (Fig. 4b). This result further indicates that the E42 is essential for the toxicity of EtgA when expressed in EPEC.

Additionally, we evaluated type III protein secretion in a wild-type EPEC strain expressing the pTrc99A-based *etgA* variants. Type III secretion (T3S) was determined by the presence of the translocator proteins EspA, EspB and EspD and the effector Tir in culture supernatants (Fig. 4c, upper panels). Likewise, protein expression was visualized by Western blotting of whole-cell extracts (Fig. 4c, lower panel). Consistent with our earlier observations, a secretion profile identical to that of the wild-type strain was obtained with the empty vector, EtgAns (unable to get to the periplasm) and EtgAE42A (an inactive enzyme). However, expression of EtgA induced a specific lysis phenotype, as confirmed by the immunodetection of the cytoplasmic proteins DnaK and CesT in the culture supernatant (Fig.

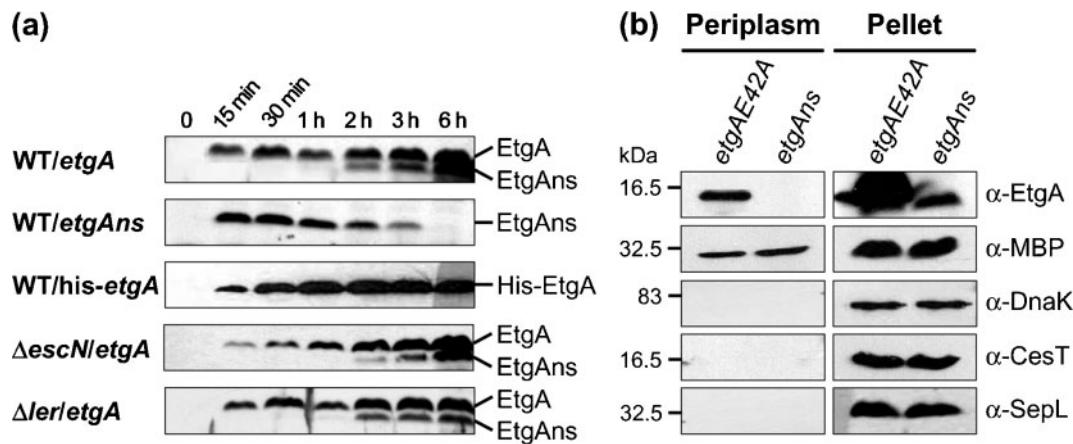


Fig. 3. Expression, N-terminal processing and localization of different EtgA variants. (a) Periplasmic processing of EtgA in EPEC determined by immunodetection of whole-cell extracts of wild-type (WT), $\Delta escN$ and Δler strains induced for overproduction of EtgA, EtgAns or His-EtgA. The predicted molecular mass of the preprotein (EtgA) is 17.1 kDa, while that for the mature product (EtgAns) is 15.2 kDa. Neither EtgAns nor His-EtgA (19.6 kDa) is processed. Immunoblotting of whole-cell lysates was performed with the anti-EtgA antibody. (b) Detection of EtgAE42A in the isolated periplasmic fraction (Periplasm) of wild-type EPEC expressing pNTetgAE42A or pNTetgAns. Immunodetection of purified periplasm and whole-cell lysates (Pellet) was performed with anti-EtgA, anti-MBP, anti-DnaK, anti-CesT and anti-SepL antibodies.

4c, centre panel). Intriguingly, the secreted proteins Tir and EspB were not detected in the supernatant or in whole cells of the culture expressing EtgA. This could be due to either proteolysis or inhibition of gene expression (see Discussion). In this regard, the stability of Tir and EspB and the chaperones CesT and CesD2 was evaluated at different time points after the expression of EtgA (Supplementary Fig. S2). The results showed that Tir and EspB are produced and stable until the cells are lysed, whereas the chaperones remain stable even upon cell lysis (Supplementary Fig. S2). Some lysis could also be seen when expressing EtgAE42A, as evidenced by the identification of a small amount of the abundant protein DnaK in the supernatant (Fig. 4c, centre panel). Nevertheless, the results clearly show that the main lysis activity is due to the peptidoglycanase activity of a functional EtgA. Cell lysis was also observed when EtgA was expressed in EPEC $\Delta escN$ and Δler mutant strains (data not shown), indicating that the disruption of bacterial cell integrity by EtgA is independent of the T3SS. Overproduced EtgA was detected with anti-EtgA antibodies, except for EtgAns, which was no longer stable after 4 h of induction. The native EtgA protein in wild-type EPEC was not detected by our anti-EtgA antibody, which could be due to a low quantity of EtgA in EPEC (Fig. 4c, lower panel).

EtgA is required for efficient T3S

To study the requirement of the PG lytic activity of EtgA for protein secretion through the T3SS we constructed a non-polar deletion of *etgA*, creating mutant strain $\Delta etgA$ (Table 1). The wild-type, $\Delta etgA$ and $\Delta escN$ strains were grown in liquid culture, and showed nearly identical

growth curves (data not shown). Proteins secreted to the supernatant were recovered and analysed by SDS-PAGE and immunoblotting. As shown in Fig. 5(a), wild-type EPEC generated a typical type III-dependent secretion profile of the translocator proteins EspA, EspB and EspD, and the effectors Tir and EspF, while the $\Delta escN$ mutant strain completely lost secretion competence (EspC is an autotransporter protein). Mutational inactivation of *etgA* resulted in a twofold decrease in protein secretion compared with the wild-type strain, as also determined by densitometric analysis (Fig. 5b). Expression of LEE-encoded proteins was not affected in the $\Delta etgA$ strain, as revealed by immunoblotting of whole-cell extracts (Fig. 5a, lower panel). DnaK was used as a loading control. For complementation experiments of the $\Delta etgA$ mutant strain, *etgA* was cloned into vector pET3a, which has low expression in the absence of T7 polymerase, to overcome the problem of cell lysis when *etgA* is overexpressed from the pTrc99A vector even in the absence of IPTG (Fig. 4c; data not shown). The mutant strain recovered its full secretion capacity when plasmid pEE3aetgA was introduced (Fig. 5a, b). These results indicate that EtgA is not essential for T3S but makes the process more efficient.

An EPEC $\Delta etgA$ mutant strain displays reduced T3S-dependent haemolytic activity

It has been reported that EPEC is capable of inducing T3S-dependent haemolysis in erythrocytes (Ide *et al.*, 2001; Warawa *et al.*, 1999). To evaluate the contribution of EtgA to the EPEC-induced haemolysis, we incubated wild-type EPEC and the mutant strains $\Delta etgA$ and $\Delta escN$ with RBCs. The $\Delta etgA$ mutant strain retained only 60% of the

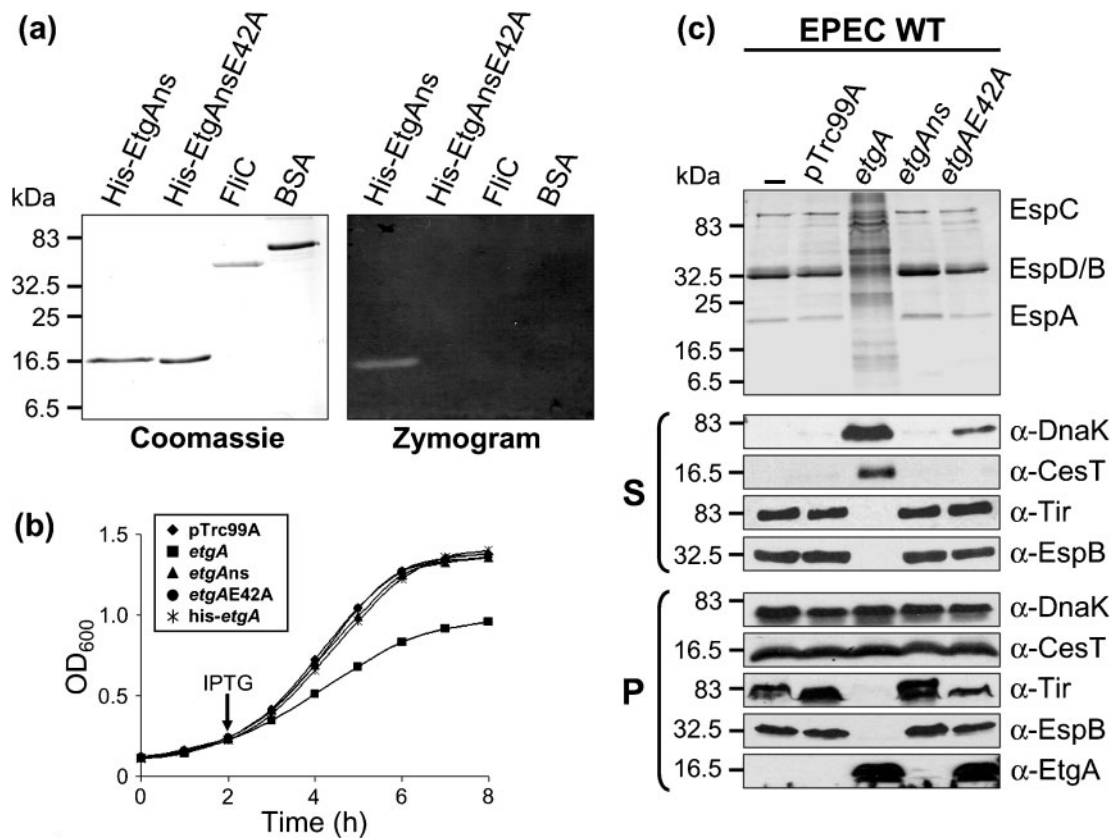


Fig. 4. The predicted catalytic glutamate E42 is required for EtgA activity. (a) Zymogram gel analysis. The purified proteins were separated in an SDS-polyacrylamide gel containing *M. lysodeikticus* cells that was treated as described in Methods. His-EtgAnsE42A does not show PG lytic activity. His-EtgAns was used as a positive control, while FliC and BSA were used as negative controls. Coomassie, SDS-PAGE stained with CBB; Zymogram, PG-substrate gel stained with methylene blue; non-stained zones indicate PG degradation. (b) Effect of overproduction of EtgA (■), EtgAE42A (●), EtgAns (▲) and His-EtgA (*) on wild-type EPEC growth. EPEC containing empty pTrc99AFF4 was used as a control (◆). EPEC cells harbouring different *etgA* variants were induced with 1 mM IPTG and growth was allowed to proceed for a further 6 h. OD₆₀₀ was measured every hour during incubation, and aliquots were taken and plated to determine c.f.u. at different times. (c) Analysis of proteins precipitated from supernatants of wild-type EPEC cultures overproducing EtgA, EtgAE42A and EtgAns. Secreted proteins were analysed by CBB-stained SDS-PAGE (upper panel) and immunoblotting (lower panels). EtgA-mediated lysis of EPEC requires the signal sequence and a functional enzyme. Immunodetection of secreted proteins (S) was performed with anti-DnaK, anti-CesT, anti-Tir and anti-EspB antibodies, and of whole-cell extracts (P) with anti-DnaK, anti-CesT, anti-Tir, anti-EspB and anti-EtgA antibodies. Molecular mass markers are shown to the left.

haemolytic activity of wild-type EPEC, whereas no significant haemolysis was observed with the secretion-deficient strain Δ *escN* when compared with RBCs alone (Fig. 6a; data not shown). Haemolysis was restored to wild-type levels when plasmid pEE3aetgA was introduced (Fig. 6a). These results show that assembled injectisomes are functional, allowing T3S, bacterial attachment via EspA filaments and formation of the translocation pore, and suggest that a lower number of injectisomes is expressed in the Δ *etgA* strain. To gain further insight into EspA filamentation we performed mechanical shearing of EPEC wild-type and Δ *etgA* injectisomes. The results showed a consistent and reproducible decrease in the amount of recovered EspA filaments in the Δ *etgA* mutant (Fig. 6b).

The Δ *escN* mutant was used as a negative control. Assuming that in the Δ *etgA* strain, once a nascent injectisome is able to penetrate the cell wall barrier its assembly proceeds as in the wild-type strain, this result suggests the existence of fewer fully assembled injectisomes in the Δ *etgA* mutant.

BfpH, a type IV pilus putative LT, does not replace EtgA function

Because functional redundancy among LTs has been observed before, as well as cross-complementation of LTs from different secretion systems (Höppner *et al.*, 2004; Oh *et al.*, 2007; Zahrl *et al.*, 2005), we searched for a related

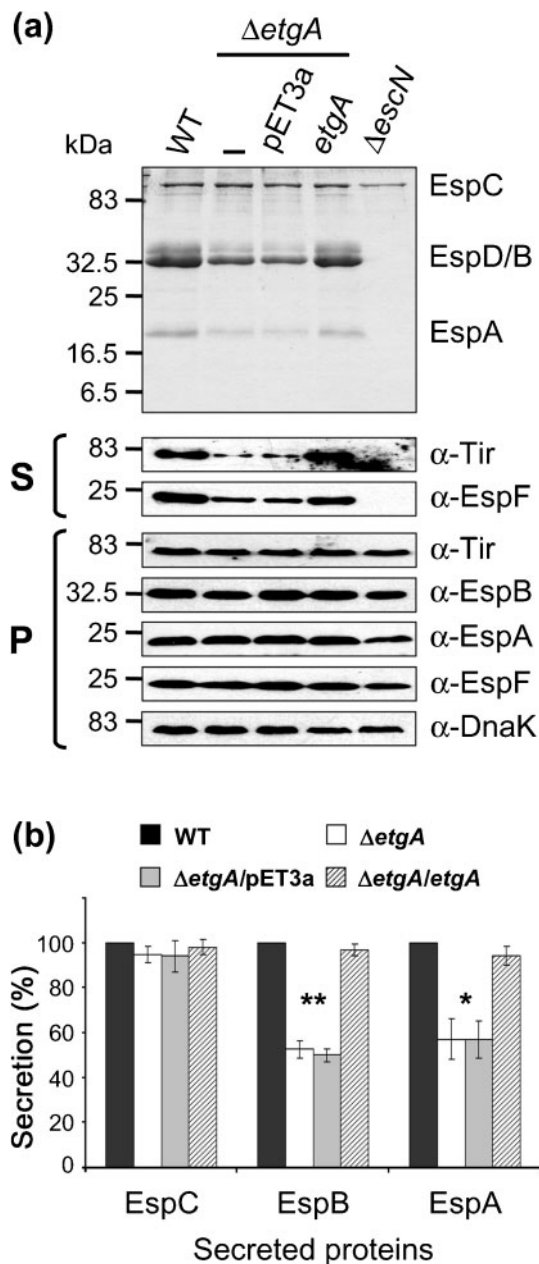


Fig. 5. An EPEC $\Delta etgA$ mutant strain shows reduced T3S. (a) Secreted protein profile of wild-type EPEC (WT), $\Delta etgA$ (-), $\Delta etgA$ with empty vector (pET3a), $\Delta etgA$ with pEE3aetgA (*etgA*) and $\Delta escN$ strains visualized by CBB-stained SDS-PAGE. The $\Delta etgA$ strain was complemented by a plasmid producing *EtgA* to almost wild-type levels. Immunodetection of secreted proteins (S) was performed with anti-Tir and anti-EspF antibodies, and of whole-cell lysates (P) with anti-Tir, anti-EspB, anti-EspA, anti-EspF and anti-DnaK antibodies. (b) Densitometric analysis of the secreted proteins in (a). The amount of secreted EspC, EspB and EspA was analysed by SDS-PAGE using the Alpha DigiDoc RT system and software (Alpha Innotech). The EspC protein is not secreted through the T3SS. The results are the mean of three independent experiments; error bars, SD. Significant differences compared with the wild-type strain are marked with asterisks. **, $P < 0.002$; *, $P < 0.02$, as determined by Student's *t* test.

protein that could be responsible for the observed $\Delta etgA$ phenotype.

BfpH is an LT homologue encoded in the EPEC adherence factor (EAF) plasmid, which contains genes involved in the initial adherence of cells via a type IV pilus named the bundle-forming pilus (BFP) (Girón *et al.*, 1991), as well as the LEE transcriptional regulator PerC, which links the expression of BFP with the expression of the LEE (Bustamante *et al.*, 2001; Gómez-Duarte & Kaper, 1995; Porter *et al.*, 2004). BfpH is a 16.4 kDa protein that has 30% identity and 49% similarity to *EtgA*, including the highly conserved amino acid residues within the consensus motifs (Fig. 7a). It also has a predicted signal sequence for transport to the periplasm. However, it has been reported that BfpH is not required for BFP biogenesis and that a *bfpH* mutant strain is able to adhere to HEp-2 cells in the same manner as wild-type EPEC, although there is a significant reduction in the ability of the *bfpH* mutant to autoaggregate (Anantha *et al.*, 2000). Hence, it has been suggested that the LEE-encoded LT could functionally replace BfpH (Anantha *et al.*, 2000; Koraimann, 2003).

To investigate the possibility that BfpH was substituting for *EtgA*, we constructed an *etgA* non-polar deletion in the JPEP30 plasmid-cured strain background, generating mutant strain $\Delta etgA$ EAF- (Table 1). EPEC strain JPEP30 and its derivative $\Delta etgA$ EAF- were grown in liquid cultures under shaking conditions, given that the EAF plasmid-cured strain is unable to secrete LEE-encoded proteins under static growth conditions (Kenny & Finlay, 1995). Analysis of the profile of secreted proteins in these strains revealed that the *etgA* disruption produced the same phenotype in the EAF plasmid-minus strain as in wild-type EPEC, i.e. $\Delta etgA$ EAF- only showed a reduction in its secretion capability (Fig. 7b). The secretion defect could be complemented by introducing plasmid pEE3aetgA into the $\Delta etgA$ EAF- mutant strain (Fig. 7b). Expression of LEE-encoded proteins was not affected in strain $\Delta etgA$ EAF-, as seen by immunodetection of whole-cell extracts. These findings indicate that BfpH does not rescue the *EtgA* defect.

DISCUSSION

In the present study, we show for what is believed to be the first time for any member of the A/E family of enteropathogens that *EtgA* is indeed capable of degrading PG *in vitro*. To better understand the role of the muramidase activity during T3S in EPEC we characterized this enzyme, its catalytically inactive variant and its deletion phenotype.

The bacterial cell wall constitutes a barrier to the assembly of transenvelope structures. Accordingly, the so-called specialized LTs are associated with diverse secretion systems, the flagellum, different types of pili and bacteriophages (Dijkstra & Keck, 1996; Koraimann, 2003). To exert their functions, specialized LTs must be

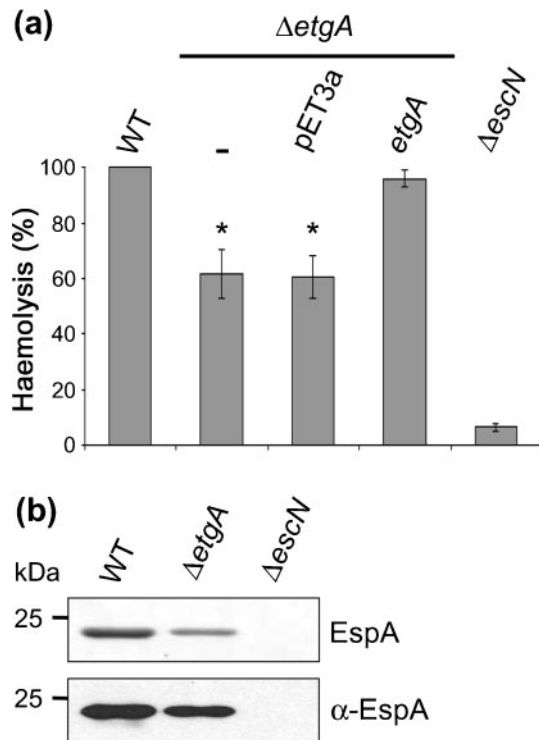


Fig. 6. An EPEC $\Delta etgA$ mutant strain shows reduced haemolytic activity and EspA filament expression. (a) Haemolytic capacity of wild-type EPEC (WT), $\Delta etgA$ (-), $\Delta etgA$ with empty vector (pET3a), $\Delta etgA$ with pEE3aetgA (*etgA*) and $\Delta escN$ strains. Haemoglobin released to the supernatant was measured at 450 nm after incubation of bacteria with human RBCs. Wild-type EPEC was used as a control for complete haemolysis and $\Delta escN$ was used as a negative control. Haemolytic activity recovered to wild-type levels in the complemented $\Delta etgA$ strain. The results are the mean of three independent experiments; error bars, SD. Significant differences compared with the wild-type strain are marked with asterisks. *, $P < 0.02$, as determined by Student's *t* test. (b) Shearing of EspA filaments from EPEC wild-type, $\Delta etgA$ and $\Delta escN$ strains. EspA protein was visualized by CBB-stained SDS-PAGE (upper panel) and by Western blotting with anti-EspA antibodies (lower panel).

in contact with the murein layer. There are two different export mechanisms used by LTs associated with type III flagellar and virulence systems. The *Salmonella enterica* flagellar muramidase FlgJ and the HrpH LT from the plant pathogen *Pseudomonas syringae* are T3SS substrates (Nambu *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2007), whereas the LTs IpgF of *Shigella sonnei* and IagB of *S. enterica* have a putative cleavable signal peptide for recognition by the general secretion pathway (SignalP 3.0) (Zahrl *et al.*, 2005). EtgA possesses a signal sequence that we experimentally determined to be processed so that the protein has a periplasmic localization. It has been reported that the correct localization of the EPEC secretin EscC in the outer membrane depends not only on the Sec

pathway but also on components of the T3S apparatus (Gauthier *et al.*, 2003). Here we demonstrate that the localization of EtgA does not depend on any T3SS protein, since its periplasmic processing happens both in the presence of the T3SS Sec-dependent components alone (in the $\Delta escN$ mutant strain) and in the absence of the whole injectisome (in the Δler mutant strain) (Fig. 3). Moreover, we found that EtgAns, which is unable to reach the periplasm, is not stable in the cytoplasm. This is in accordance with an earlier suggestion that LTs are unstable or misfolded in the cytoplasm unless they are transported to the periplasm by the Sec machinery (Zahrl *et al.*, 2005). It is of interest, however, that the His-tag fused with the signal sequence conferred greater stability, so that His-EtgA could be detected in the cytoplasm even after 24 h. This could be due to a reduced protease sensitivity of this EtgA variant, as has been suggested for P19-His (Bayer *et al.*, 2001).

Earlier bioinformatics analysis and our observations (Fig. 1) suggested that EtgA might be a specialized LT associated with the T3SS in EPEC (Koraimann, 2003; Pallen *et al.*, 2005). Despite this, there was no prior experimental evidence to confirm this prediction. We used zymogram analysis to demonstrate that soluble purified His-EtgAns has peptidoglycanase activity *in vitro* (Fig. 2). This method has been extensively used in the past for the detection of PG degradation (Bernadsky *et al.*, 1994; Nambu *et al.*, 1999; Zahrl *et al.*, 2005). Furthermore, we showed that the predicted catalytic glutamate is essential for EtgA PG-lytic activity *in vitro* and *in vivo* (Fig. 4). In agreement with our results, mutations changing this active site residue in various LTs, such as the E44 in P19 (Bayer *et al.*, 2001), E42 in IpgF (Zahrl *et al.*, 2005) and E48 in AtIA (Kohler *et al.*, 2007), result in a complete loss of activity.

LTs are considered to be autolysins, since they can cause complete cellular lysis if their activity is uncontrolled (Scheurwater *et al.*, 2008). Indeed, overproduction of EtgA in EPEC caused cell lysis accompanied by a considerable loss of bacterial viability: only 18% of the cells remained viable, while none of the EtgA variants (the inactive protein or the ones unable to get to the periplasm) had this effect. When analysing bacterial growth curves, EtgA appeared to inhibit growth without causing extensive lysis (Fig. 4). However, when proteins were precipitated from the supernatant, bacterial extrusion of intracellular material was evident. Similar results of growth inhibition without obvious massive lysis have been obtained with expression of the primary specialized LT HrpH from *P. syringae* (Oh *et al.*, 2007) and the LT gp144 from the *Pseudomonas aeruginosa* phage ϕ KZ (Paradis-Bleau *et al.*, 2007). In the case of the P19 LT, it has been noticed that the lysis seems to be quite distinct from other severe large disruption phenotypes and that only small lesions are generated, indicating a localized opening in the PG layer (Bayer *et al.*, 2001). During our T3S assays, the lytic activity of EtgA was revealed by the presence of DnaK and CesT in the supernatant (Fig. 4). When EPEC lysis occurred, Tir and

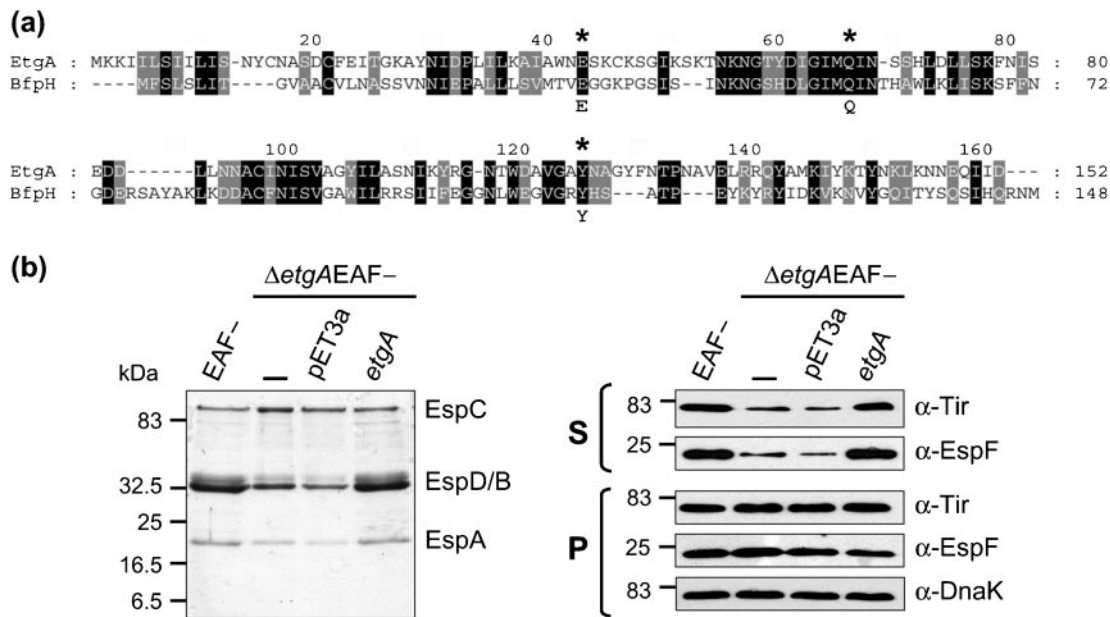


Fig. 7. The plasmid-encoded putative LT BfpH does not replace EtgA function. (a) Sequence alignment of EtgA and BfpH (accession number B7UT0). Identical residues are shown with a black background and conserved residues with a grey background. Highly conserved residues within the consensus motifs are denoted by asterisks. (b) Secreted protein profile of EPEC plasmid-cured strain JPEP30 (EAF-) and its derivatives: $\Delta etgA$ EAF- (-), containing an empty vector (pET3a) or containing plasmid pEE3aetgA (*etgA*). Secreted proteins were visualized by CBB-stained SDS-PAGE (left panel). Immunodetection of secreted proteins (S) was performed with anti-Tir and anti-EspF antibodies, and that of whole-cell lysates (P) with anti-Tir, anti-EspF and anti-DnaK antibodies (right panel).

EspB could not be detected in whole-cell extracts or in the supernatant (Fig. 4c and Supplementary Fig. S2). This could be due to proteolysis of these effectors when they enter into contact with periplasmic proteases, whereas the chaperones CesT and CesD2 would have reduced sensitivity to proteases, as has been reported for the needle protein chaperones in *Yersinia* (Davis *et al.*, 2010). Additionally, in the remaining proportion of non-lysed cells, it is likely that an active muramidase in the periplasm will be generating substantial stress as well as affecting T3SS assembly, particularly of proteins predicted to have periplasmic domains, such as EscJ, EscD and EscC, and therefore of the entire injectisome. This is supported by the finding that orthologous protein-PG interactions are critical for correct assembly of the T3SS in *Salmonella* (Pucciarelli & García-del Portillo, 2003). It has been reported that if the *C. rodentium* effector NleH is not actively secreted by the T3SS, it is degraded by the Lon protease (García-Angulo *et al.*, 2008). Thus, a similar post-translational regulatory mechanism could be responsible for the proteolysis of EspB and Tir when PG integrity is affected by expression of EtgA in EPEC. Alternatively, gene expression could be inhibited. It has been demonstrated that cell envelope stress in EPEC activates the Cpx two-component system response, which inhibits the cellular levels of Tir and the translocators EspA, EspB and EspD by causing a decrease in the transcription of the LEE4 and LEE5 operons (MacRitchie *et al.*, 2008). It

is thus possible that overexpression of an active EtgA could be a stress-inducing cue to activate the Cpx pathway. However, we believe that EtgA expression has a low impact on the transcriptional activity of these operons before lysis becomes evident, since the chaperones CesT and CesD2, which remain stable even upon cell lysis (Fig. 4c and Supplementary Fig. S2), are encoded within the same operons as Tir and EspB, respectively.

Maintaining an intact cell wall is essential for bacterial viability. Hence, it is important to regulate LT action. Different mechanisms have been proposed to control the activity of specialized LTs, such as protein interactions with the cognate secretion system (Clarke *et al.*, 2010; Höppner *et al.*, 2005; Scheurwater *et al.*, 2008). In the case of the LT VirB1 associated with the type IV secretion system (T4SS) of *Brucella suis*, protein interactions with core components of the secretion system have been identified and a modelling approach has been used to postulate that the enzyme activity is modulated by binding of VirB8, VirB9 or VirB11 close to VirB1 active site residues (Höppner *et al.*, 2005). Regarding EtgA, only a weak interaction has been reported with EscI (rOrf8) (Creasey *et al.*, 2003), the protein thought to form the inner rod (Pallen *et al.*, 2005). Unexpectedly, expression of EtgA generated the same lysis phenotype as that of wild-type EPEC when using the $\Delta escN$ and Δler mutant strains, indicating that the T3SS does not regulate EtgA activity.

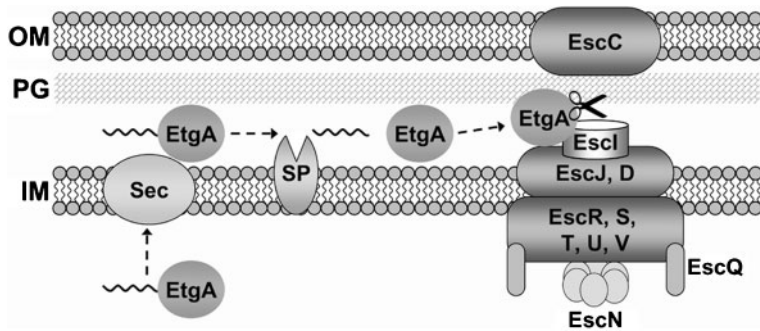


Fig. 8. Model showing the probable role of EtgA during T3SS biogenesis. A schematic representation of the EPEC injectisome basal components is depicted. Illustration not to scale. During T3SS assembly, EtgA is translocated by the Sec pathway (Sec) to the periplasm, where its signal sequence (wavy line) is processed by a signal peptidase (SP). EtgA is directed to the site of nascent injectisome formation through interactions with T3SS components (e.g. EscJ, the constituent of the inner rod), where it degrades the cell wall as a result of its muramidase activity (represented by scissors). In this way, EtgA facilitates a temporally and spatially controlled opening of the PG layer, making the injectisome assembly process more efficient. IM, inner membrane; PG, peptidoglycan cell wall; OM, outer membrane.

Nevertheless, it should be considered that under our experimental conditions EtgA is strongly overexpressed, and therefore the possibility of a regulatory mechanism involving physical association with periplasmic injectisome components cannot be excluded.

To evaluate the significance of the PG-lytic activity on T3S, an allelic replacement mutation in *etgA* was generated. The secretion protein profile of the $\Delta etgA$ deletion strain showed an ~50% reduction in the amount of both effector and translocator type III secreted proteins (Fig. 5). This indicates that EtgA is not absolutely required for T3SS assembly and secretion. The residual T3SS activity of the mutant may be explained by a limited capacity of the injectisome to penetrate the PG fortuitously even in the complete absence of EtgA, as has been suggested previously for the flagellar muramidases FlgJ and SltF (de la Mora *et al.*, 2007; Hirano *et al.*, 2001). This can be achieved as the cell wall PG is continuously being turned over and recycled (Park & Uehara, 2008), so that occasionally gaps can be generated during PG biogenesis and coincide with injectisome assembly, allowing the structure to penetrate the PG barrier. It is then likely that fewer injectisomes per cell are able to be fully assembled, as suggested by the results of shearing EspA filaments (Fig. 6b). Nevertheless, as shown by our haemolysis results (Fig. 6a), the injectisomes that are able to traverse the PG layer are functional and completely formed all the way through the EspA filament and translocation pore, since they can lyse RBCs at an extent that is 60% of the wild-type. Further absent or weak effects of disruptions of specialized LTs in different secretion systems have been observed. A mutant strain with a loss-of-function mutation in *iagB* exhibits normal needle complexes (Kubori *et al.*, 1998), whereas a mutation in *ipgF* has no effect on invasion or pathogenicity (Allaoui *et al.*, 1993). The same is true for a mutant lacking *hrpH*, which is reduced in effector translocation and virulence (Oh *et al.*, 2007), and for the *virB1* mutant in the T4SS and

the P19 protein participating in DNA transfer during conjugation (Koraimann, 2003). Given that an adequate animal model does not exist to assess EPEC infections, it is difficult to determine the significance in disease of an LEE gene disruption. However, in an earlier study in *C. rodentium* in which all the LEE genes were mutagenized, it was shown that an *rorf3* (*etgA*) mutant has attenuated T3S, pedestal formation and virulence in mice (Deng *et al.*, 2004), indicating that the enzyme is relevant to pathogenicity. In addition, only very recently has it been found that an *rorf3* mutant in EHEC also presents a reduced protein secretion phenotype (Yu *et al.*, 2010). Intriguingly, in spite of the generally moderate effects observed with mutations of LT genes in different secretion systems, these enzymes have been retained during evolution within pathogenicity islands, and are widely distributed among animal and plant bacterial pathogens.

Another possible explanation for the attenuated phenotypes is the observed redundancy of LTs in bacteria (Koraimann, 2003; Zahrl *et al.*, 2005). In this work we analysed the possibility that a functionally redundant protein could be compensating for the *etgA* deletion phenotype. A BLAST search of the EPEC genome (FM180568) using the EtgA amino acid sequence revealed the existence of seven chromosomal genes encoding LTs, both membrane-bound and soluble, in accordance with what is known for *E. coli* (Blackburn & Clarke, 2001). We also considered the EAF plasmid-encoded EtgA homologue BfpH. Of all these proteins, BfpH showed the highest similarity to EtgA (49% compared with 32% for the most similar chromosomal LT), being a small protein with a predicted signal sequence. Moreover, the EPEC localized adherence phenotype that requires the BFP is influenced by environmental conditions similar to those required for A/E lesion formation, and the expression of *bfp* genes is co-regulated with that of LEE genes (Mellies *et al.*, 2007), suggesting that BfpH and EtgA are produced in a

coordinated manner. For these reasons we constructed a *bfpH etgA* double mutant and analysed its secretion phenotype. The secretion profile was shown to be the same as that of the single *etgA* mutant strain (Fig. 7), indicating that BfpH does not replace the function of EtgA. Therefore, our results support the hypothesis that the T3SS can assemble without the assistance of EtgA, rather than relying on the existence of a redundant protein. Nevertheless, although less probable, the possibility that there is another functionally redundant protein among other LT homologues in EPEC cannot be excluded.

Based on our findings and previous observations, a model for EtgA function can be suggested, as represented in Fig. 8. EtgA is recognized by the Sec translocase and transported to the periplasm, where it interacts with components of the T3SS for a localized and controlled opening of the murein sacculus, allowing an efficient assembly of the injectisome. The knowledge of how EtgA acts at the molecular level will contribute to the understanding of the role of specialized LTs in transenvelope transport systems.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Teresa Ballado and Juan Barbosa for excellent technical assistance. We are grateful to Jonathan McMurry for critical reading of the manuscript and to May Kihara Macnab for continuous support. We acknowledge José Luis Puente, Instituto de Biotecnología, UNAM, for kindly providing EPEC strains, plasmids and advice. We also thank B. G.-P. laboratory members for their help and useful suggestions. This work was supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (IN224708), and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (81847) to B. G.-P. Partial support was obtained from Fundación Miguel Alemán, A.C. E. G.-G. was supported by a fellowship from CONACyT (170088).

REFERENCES

- Allaoui, A., Ménard, R., Sansonetti, P. J. & Parsot, C. (1993). Characterization of the *Shigella flexneri* *ipgD* and *ipgF* genes, which are located in the proximal part of the *mxi* locus. *Infect Immun* **61**, 1707–1714.
- Anantha, R. P., Stone, K. D. & Donnenberg, M. S. (2000). Effects of *bfp* mutations on biogenesis of functional enteropathogenic *Escherichia coli* type IV pili. *J Bacteriol* **182**, 2498–2506.
- Andrade, A., Pardo, J. P., Espinosa, N., Pérez-Hernández, G. & González-Pedrajo, B. (2007). Enzymatic characterization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion ATPase EscN. *Arch Biochem Biophys* **468**, 121–127.
- Bayer, M., Iberer, R., Bischof, K., Rassi, E., Stabentheiner, E., Zellnig, G. & Koraimann, G. (2001). Functional and mutational analysis of p19, a DNA transfer protein with muramidase activity. *J Bacteriol* **183**, 3176–3183.
- Bendtsen, J. D., Nielsen, H., von Heijne, G. & Brunak, S. (2004). Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* **340**, 783–795.
- Bernadsky, G., Beveridge, T. J. & Clarke, A. J. (1994). Analysis of the sodium dodecyl sulfate-stable peptidoglycan autolysins of select Gram-negative pathogens by using renaturing polyacrylamide gel electrophoresis. *J Bacteriol* **176**, 5225–5232.
- Blackburn, N. T. & Clarke, A. J. (2001). Identification of four families of peptidoglycan lytic transglycosylases. *J Mol Evol* **52**, 78–84.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P. & Allaoui, A. (2001). Structure and composition of the *Shigella flexneri* “needle complex”, a part of its type III secretion. *Mol Microbiol* **39**, 652–663.
- Blocker, A., Komoriya, K. & Aizawa, S. (2003). Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3027–3030.
- Bustamante, V. H., Santana, F. J., Calva, E. & Puente, J. L. (2001). Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* **39**, 664–678.
- Chen, H. D. & Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* **29**, 83–98.
- Clarke, S. C., Haigh, R. D., Freestone, P. P. & Williams, P. H. (2003). Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* **16**, 365–378.
- Clarke, C. A., Scheurwater, E. M. & Clarke, A. J. (2010). The vertebrate lysozyme inhibitor Ivy functions to inhibit the activity of lytic transglycosylase. *J Biol Chem* **285**, 14843–14847.
- Cornelis, G. R. (2006). The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**, 811–825.
- Creasey, E. A., Delahay, R. M., Daniell, S. J. & Frankel, G. (2003). Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**, 2093–2106.
- Daniell, S. J., Takahashi, N., Wilson, R., Friedberg, D., Rosenshine, I., Booy, F. P., Shaw, R. K., Knutton, S., Frankel, G. & Aizawa, S. (2001). The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**, 865–871.
- Daniell, S. J., Kocsis, E., Morris, E., Knutton, S., Booy, F. P. & Frankel, G. (2003). 3D structure of EspA filaments from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **49**, 301–308.
- Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640–6645.
- Davis, A. J., De Jesús Díaz, D. A. & Mecsas, J. (2010). A dominant-negative needle mutant blocks type III secretion of early but not late substrates in *Yersinia*. *Mol Microbiol* **76**, 236–259.
- Dean, P. & Kenny, B. (2009). The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr Opin Microbiol* **12**, 101–109.
- de la Mora, J., Ballado, T., González-Pedrajo, B., Camarena, L. & Dreyfus, G. (2007). The flagellar muramidase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* **189**, 7998–8004.
- Deng, W., Puente, J. L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B. A., Vázquez, A., Barba, J., Ibarra, J. A., O'Donnell, P. & other authors (2004). Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3597–3602.
- Dijkstra, A. J. & Keck, W. (1996). Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. *J Bacteriol* **178**, 5555–5562.
- Galán, J. E. & Wolf-Watz, H. (2006). Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**, 567–573.
- García-Angulo, V. A., Deng, W., Thomas, N. A., Finlay, B. B. & Puente, J. L. (2008). Regulation of expression and secretion of NleH, a new non-locus of enterocyte effacement-encoded effector in *Citrobacter rodentium*. *J Bacteriol* **190**, 2388–2399.

- Gauthier, A. & Finlay, B. B. (2003).** Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**, 6747–6755.
- Gauthier, A., Puente, J. L. & 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.
- Genin, S. & Boucher, C. A. (1994).** A superfamily of proteins involved in different secretion pathways in Gram-negative bacteria: modular structure and specificity of the N-terminal domain. *Mol Gen Genet* **243**, 112–118.
- Girón, J. A., Ho, A. S. & Schoolnik, G. K. (1991).** An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**, 710–713.
- Gómez-Duarte, O. G. & Kaper, J. B. (1995).** A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**, 1767–1776.
- Harlow, E. & Lane, D. (1988).** *Antibodies: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hirano, T., Minamino, T. & Macnab, R. M. (2001).** The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella* FlgJ, a flagellum-specific muramidase. *J Mol Biol* **312**, 359–369.
- Höppner, C., Liu, Z., Domke, N., Binns, A. N. & Baron, C. (2004).** VirB1 orthologs from *Brucella suis* and pKM101 complement defects of the lytic transglycosylase required for efficient type IV secretion from *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* **186**, 1415–1422.
- Höppner, C., Carle, A., Sivanesan, D., Hoepfner, S. & Baron, C. (2005).** The putative lytic transglycosylase VirB1 from *Brucella suis* interacts with the type IV secretion system core components VirB8, VirB9 and VirB11. *Microbiology* **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.
- Ide, T., Laarmann, S., Greune, L., Schillers, H., Oberleithner, H. & Schmidt, M. A. (2001).** Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**, 669–679.
- Jarvis, K. G., Girón, J. A., Jerse, A. E., McDaniel, T. K., Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. (1995).** Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7996–8000.
- Kenny, B. & Finlay, B. B. (1995).** Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7991–7995.
- Kenny, B., Abe, A., Stein, M. & Finlay, B. B. (1997a).** Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* **65**, 2606–2612.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D. J., Frey, E. A. & Finlay, B. B. (1997b).** Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**, 511–520.
- Knutton, S., Lloyd, D. R. & 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., Wolff, C., Dougan, G. & Frankel, G. (1998).** A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* **17**, 2166–2176.
- Kohler, P. L., Hamilton, H. L., Cloud-Hansen, K. & Dillard, J. P. (2007).** AtlA functions as a peptidoglycan lytic transglycosylase in the *Neisseria gonorrhoeae* type IV secretion system. *J Bacteriol* **189**, 5421–5428.
- Koraimann, G. (2003).** Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell Mol Life Sci* **60**, 2371–2388.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galán, J. E. & Aizawa, S. I. (1998).** Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**, 602–605.
- Levine, M. M., Bergquist, E. J., Nalin, D. R., Waterman, D. H., Hornick, R. B., Young, C. R. & Sotman, S. (1978).** *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* **311**, 1119–1122.
- MacRitchie, D. M., Ward, J. D., Nevesinjac, A. Z. & Raivio, T. L. (2008).** Activation of the Cpx envelope stress response down-regulates expression of several locus of enterocyte effacement-encoded genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **76**, 1465–1475.
- McDaniel, T. K. & Kaper, J. B. (1997).** A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* **23**, 399–407.
- McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. (1995).** A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1664–1668.
- Mellies, J. L., Elliott, S. J., Sperandio, V., Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. (1999).** The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* **33**, 296–306.
- Mellies, J. L., Barron, A. M. & Carmona, A. M. (2007).** Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infect Immun* **75**, 4199–4210.
- Moon, H. W., Whipp, S. C., Argenzio, R. A., Levine, M. M. & Giannella, R. A. (1983).** Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* **41**, 1340–1351.
- Mueller, C. A., Broz, P., Müller, S. A., Ringler, P., Erne-Brand, F., Sorg, I., Kuhn, M., Engel, A. & Cornelis, G. R. (2005).** The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectosome needles. *Science* **310**, 674–676.
- Mueller, C. A., Broz, P. & Cornelis, G. R. (2008).** The type III secretion system tip complex and translocon. *Mol Microbiol* **68**, 1085–1095.
- Nambu, T., Minamino, T., Macnab, R. M. & Kutsukake, K. (1999).** Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the FlgJ protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **181**, 1555–1561.
- Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (1998).** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**, 142–201.
- Ogino, T., Ohno, R., Sekiya, K., Kuwae, A., Matsuzawa, T., Nonaka, T., Fukuda, H., Imajoh-Ohmi, S. & Abe, A. (2006).** Assembly of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**, 2801–2811.
- Oh, H. S., Kvitko, B. H., Morello, J. E. & Collmer, A. (2007).** *Pseudomonas syringae* lytic transglycosylases coregulated with the type III secretion system contribute to the translocation of effector proteins into plant cells. *J Bacteriol* **189**, 8277–8289.
- Ohnishi, K., Fan, F., Schoenhals, G. J., Kihara, M. & Macnab, R. M. (1997).** The FliO, FliP, FliQ, and FliR proteins of *Salmonella typhimurium*: putative components for flagellar assembly. *J Bacteriol* **179**, 6092–6099.

- Pallen, M. J., Beatson, S. A. & Bailey, C. M. (2005). Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. *BMC Microbiol* 5, 9.
- Paradis-Bleau, C., Cloutier, I., Lemieux, L., Sanschagrin, F., Laroche, J., Auger, M., Garnier, A. & Levesque, R. C. (2007). Peptidoglycan lytic activity of the *Pseudomonas aeruginosa* phage phiKZ gp144 lytic transglycosylase. *FEMS Microbiol Lett* 266, 201–209.
- Park, J. T. & Uehara, T. (2008). How bacteria consume their own exoskeletons (turnover and recycling of cell wall peptidoglycan). *Microbiol Mol Biol Rev* 72, 211–227.
- Porter, M. E., Mitchell, P., Roe, A. J., Free, A., Smith, D. G. & Gally, D. L. (2004). Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, PerA from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 54, 1117–1133.
- Pucciarelli, M. G. & García-del Portillo, F. (2003). Protein-peptidoglycan interactions modulate the assembly of the needle complex in the *Salmonella* invasion-associated type III secretion system. *Mol Microbiol* 48, 573–585.
- Pugsley, A. P. (1993). The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* 57, 50–108.
- Rosenshine, I., Ruschkowski, S., Stein, M., Reinscheid, D. J., Mills, S. D. & 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.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Scheurwater, E., Reid, C. W. & Clarke, A. J. (2008). Lytic transglycosylases: bacterial space-making autolysins. *Int J Biochem Cell Biol* 40, 586–591.
- Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C. & Abe, A. (2001). Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11638–11643.
- Thomas, N. A., Deng, W., Puente, J. L., Frey, E. A., Yip, C. K., Strynadka, N. C. & Finlay, B. B. (2005). CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 57, 1762–1779.
- Thunnissen, A.-M. W. H., Dijkstra, A. J., Kalk, K. H., Rozeboom, H. J., Engel, H., Keck, W. & Dijkstra, B. W. (1994). Doughnut-shaped structure of a bacterial muramidase revealed by X-ray crystallography. *Nature* 367, 750–753.
- Trevor, F. M., Spreter, T. & Strynadka, N. C. (2007). Piecing together the type III injectisome of bacterial pathogens. *Curr Opin Struct Biol* 18, 1–9.
- van Asselt, E. J., Kalk, K. H. & Dijkstra, B. W. (2000). Crystallographic studies of the interactions of *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt35 with peptidoglycan. *Biochemistry* 39, 1924–1934.
- Viollier, P. H. & Shapiro, L. (2003). A lytic transglycosylase homologue, PleA, is required for the assembly of pili and the flagellum at the *Caulobacter crescentus* cell pole. *Mol Microbiol* 49, 331–345.
- Wang, D., Roe, A. J., McAteer, S., Shipston, M. J. & Gally, D. L. (2008). Hierarchical type III secretion of translocators and effectors from *Escherichia coli* O157:H7 requires the carboxy terminus of SepL that binds to Tir. *Mol Microbiol* 69, 1499–1512.
- Warawa, J., Finlay, B. B. & Kenny, B. (1999). Type III secretion-dependent hemolytic activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 67, 5538–5540.
- 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. & Strynadka, N. C. (2005). Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature* 435, 702–707.
- Yu, Y. C., Lin, C. N., Wang, S. H., Ng, S. C., Hu, W. S. & Syu, W. J. (2010). A putative lytic transglycosylase tightly regulated and critical for the EHEC type three secretion. *J Biomed Sci* 17, 52.
- Zahrl, D., Wagner, M., Bischof, K., Bayer, M., Zavec, B., Beranek, A., Ruckenstein, C., Zarfel, G. E. & Koraimann, G. (2005). Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology* 151, 3455–3467.
- Zarivach, R., Vuckovic, M., Deng, W., Finlay, B. B. & Strynadka, N. C. (2007). Structural analysis of a prototypical ATPase from the type III secretion system. *Nat Struct Mol Biol* 14, 131–137.
- Zupan, J., Hackworth, C. A., Aguilar, J., Ward, D. & Zambryski, P. (2007). VirB1* promotes T-pilus formation in the vir-type IV secretion system of *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 189, 6551–6563.

Edited by: D. L. Gally