

TRANSGLICOSILASAS LÍTICAS ASOCIADAS A LOS SISTEMAS DE SECRECIÓN EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS*

Elizabeth García-Gómez y Bertha González-Pedrajo

Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México. Ap. Postal 70-243. Ciudad Universitaria, México D. F. 04510
Tel. (55) 56-22-59-65. egarcia@ifc.unam.mx, bpedrajo@ifc.unam.mx

RESUMEN

Las bacterias Gram negativas utilizan distintos sistemas de secreción de proteínas para numerosos aspectos de su ciclo de vida. El ensamblaje de estos sistemas de secreción se lleva a cabo a través de las membranas interna y externa, así como el espacio periplásmico y la pared celular o capa de peptidoglicano. Para atravesar la pared celular, dichos sistemas requieren de la actividad de enzimas especializadas, denominadas transglicosilasas líticas (TLs) de transporte. Se han identificado TLs asociadas con diversos sistemas de secreción y se ha propuesto que estas enzimas son capaces de hacer huecos en el peptidoglicano de una forma espacial y temporalmente controlada, permitiendo así la inserción de complejos multiproteicos en la envoltura celular.

ABSTRACT

Gram-negative bacteria use diverse protein secretion systems for numerous aspects of their life cycle. During the assembly process these systems need to span the inner and outer membranes, the periplasmic space and the cell wall or peptidoglycan meshwork. In order to traverse the cell wall, secretion systems require specialized enzymes named transport lytic transglycosylases (LTs). LTs have been identified associated to several secretion systems and are proposed to make gaps in the peptidoglycan layer in a temporally and spatially controlled fashion, allowing the insertion of multiprotein complexes in the cell envelope.

INTRODUCCIÓN

La secreción de proteínas es un proceso que participa en numerosos aspectos del ciclo de vida bacteriano, incluyendo la biogénesis de organelos, como el pilus y el flagelo, la adquisición de nutrientes y la expresión de factores de virulencia. En las bacterias Gram negativas la exportación de proteínas a la superficie bacteriana o al exterior celular involucra el transporte a través de la membrana interna (MI), el periplasma (en donde se localiza la pared celular) y la membrana externa (ME); tarea que desempeñan diferentes sistemas de secreción (1).

La pared celular es un biopolímero de carbohidratos y péptidos, esencial para mantener

la integridad bacteriana; sin embargo, también constituye una barrera física para el ensamblaje de los sistemas de secreción, ya que sólo permite el transporte de proteínas pequeñas (menores a 50 kDa). Debido a esto, se ha propuesto que existen enzimas especializadas que facilitan la apertura controlada de la pared celular. Estas enzimas asociadas a los sistemas de secreción se han denominado transglicosilasas líticas (TLs) de transporte para distinguirlas de aquellas que participan en los procesos de crecimiento y división celular. Las TLs necesitan actuar en el espacio y tiempo adecuados, lo cual se logra a través de su acoplamiento con el complejo de secreción correspondiente. En este sentido, se ha encontrado que existe una relación entre los reacomodos del peptidoglicano durante

PALABRAS

CLAVE:

Bacterias Gram negativas, transglicosilasa lítica, peptidoglicano, sistemas de secreción

KEY WORDS:

Gram negative bacteria, lytic transglycosylase, peptidoglycan, secretion systems

la biogénesis de los sistemas de transporte y la identificación de TLs asociadas a éstos (2).

PARED CELULAR

En las bacterias Gram negativas, la pared celular (también denominada capa de peptidoglicano o capa de mureína) está embebida en el espacio periplásmico ubicado entre la MI o membrana citoplásmica y la ME. La pared celular envuelve completamente a la membrana citoplásmica, determinando la forma celular y protegiendo a la bacteria del estrés mecánico y osmótico (3).

El peptidoglicano está formado por unidades repetidas del disacárido de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico, unidas por enlaces glicosídicos β -1,4 (Fig. 1A), dando lugar a cadenas que en promedio cuentan con 30 disacáridos. A las cadenas de disacáridos se unen covalentemente péptidos cortos, por medio del grupo lactilo del ácido N-acetilmurámico. La composición común de los péptidos en *Escherichia coli* es L-Ala/D-Glu/ácido meso-diaminopimélico (*m*-A₂pm)/D-Ala/D-Ala. Los péptidos a su vez se entrecruzan uniendo a las cadenas de disacáridos para formar la estructura de red o esponja característica del peptidoglicano. En *E. coli*, el residuo *m*-A₂pm, un aminoácido dibásico y dicarboxílico (intermediario de la vía de biosíntesis de lisina), permite la formación del enlace

peptídico entrecruzado. Este entrecruzamiento se produce entre el grupo carboxilo de un residuo de D-Ala (en el extremo carboxilo terminal de un péptido), y el grupo amino ϵ del *m*-A₂pm de un segundo péptido (3) (Fig. 1B). Las reacciones de entrecruzamiento son catalizadas por el dominio de transpeptidasa de las proteínas de unión a penicilina (PBPs) (4).

En *E. coli* la capa de peptidoglicano tiene un grosor de 2.5 nm en el 75%-80% de su superficie, mientras que en el 20-25% presenta hasta 7 nm de ancho. Entre algunas de las propiedades de la pared celular está su gran resistencia a la presión osmótica, lo que le permite expandirse hasta tres veces sin sufrir ruptura. Por otro lado, se ha calculado que el diámetro de los huecos en el peptidoglicano es de 2.06 nm, y que por lo tanto sólo proteínas de 20-24 kDa pueden penetrar esta capa, sin embargo se ha determinado que proteínas globulares de hasta 50 kDa pueden atravesar el peptidoglicano cuando éste está expandido (4). En cuanto a la orientación de las cadenas de disacáridos respecto a la célula bacteriana existen dos modelos; en el primero se postula que las cadenas están orientadas paralelamente a la superficie celular y en el segundo, se propone que las cadenas están orientadas perpendicularmente (modelo del andamio). Sin embargo, existe un mayor número de evidencias que favorecen el primer modelo, y

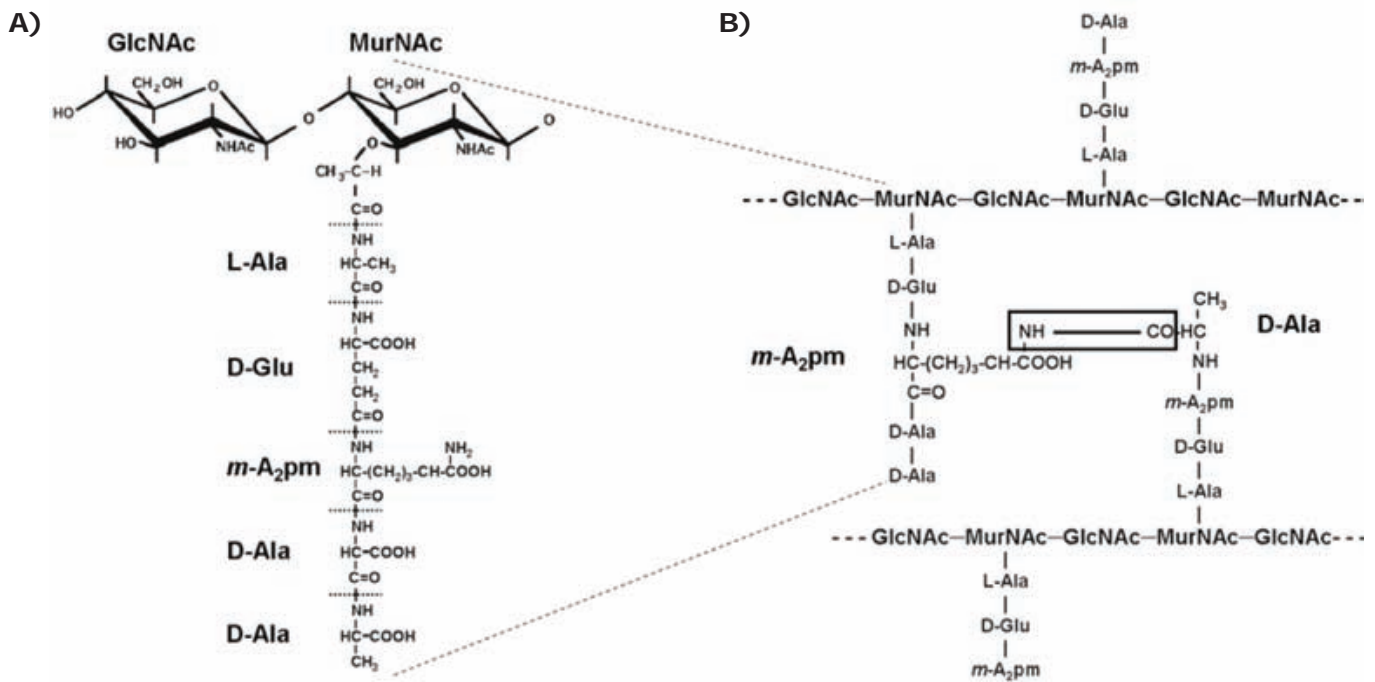
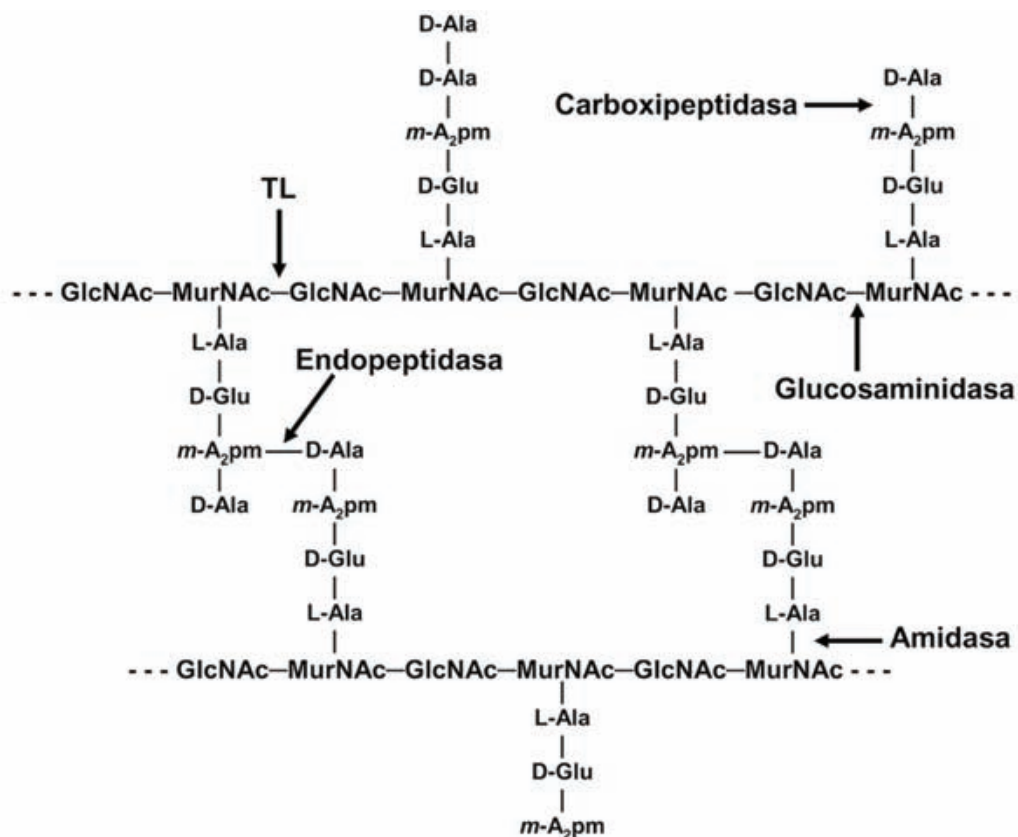


Figura 1. Peptidoglicano en *E. coli*. A) Composición química del peptidoglicano. Se indican los residuos de N-acetilglucosamina (GlcNAc) y ácido N-acetilmurámico (MurNAc), así como la composición de los péptidos asociados al MurNAc. B) Formación del entrecruzamiento entre los péptidos de dos cadenas de disacáridos. El entrecruzamiento se señala con un recuadro. Modificada de (3).

Figura 2. Enzimas líticas involucradas en el metabolismo del peptidoglicano. Se señalan con flechas los sitios de corte de cada tipo de enzima en la molécula de peptidoglicano. MurNAc: ácido N-acetilmurámico, GlcNAc: N-acetilglucosamina. Modificada de (5).



por otro lado, las cadenas de disacáridos son demasiado largas para acomodarse verticalmente, de acuerdo con el grosor que se ha determinado para la pared celular (4).

ENZIMAS LÍTICAS EN EL METABOLISMO DEL PEPTIDOGLICANO

A pesar de constituir una barrera, la capa de peptidoglicano no es una estructura rígida ni estática, ya que forma una red elástica capaz de expandirse y que está en continuo crecimiento, recambio y reciclaje; además, puede presentar variaciones en su composición en respuesta a las condiciones del medio ambiente. Durante el crecimiento y la división celular, la capa de mureína necesita alargarse y separarse para permitir la formación de dos células hijas, por lo que para que ocurran estos procesos se requieren enzimas que sinteticen y degraden el peptidoglicano de una forma coordinada para evitar la lisis de la bacteria (3, 4).

Las enzimas que degradan el peptidoglicano participan en una gran variedad de procesos fisiológicos. Además de su papel en el recambio del peptidoglicano durante el crecimiento celular y la separación de las células hijas en la división celular, participan en procesos de autólisis, esporulación, germinación de esporas, formación de biopelículas y

patogénesis (5, 6). Entre estas enzimas se encuentran endopeptidasas (que hidrolizan los entrecruzamientos peptídicos), carboxipeptidasas (cortan los enlaces peptídicos a partir del extremo C-terminal del péptido), glucosaminidasas (hidrolizan el enlace glicosídico entre la N-acetilglucosamina y el N-acetilmurámico), amidasas (hidrolizan el enlace amida entre el ácido N-acetilmurámico y L-Ala) y TLs (cortan el enlace glicosídico entre el N-acetilmurámico y la N-acetilglucosamina); es decir, existe una enzima para romper cada enlace covalente presente en el peptidoglicano (5, 7) (Fig. 2).

TRANGLUCOSILASAS LÍTICAS (TLs)

Las TLs son enzimas que, como la lisozima, degradan el peptidoglicano rompiendo el enlace glicosídico β , 1-4 entre los residuos N-acetilmurámico y N-acetilglucosamina. Sin embargo, a diferencia de la lisozima, las TLs rompen el sustrato sin hidrolizarlo en una reacción en la que se forma un anillo intramolecular entre el carbono 1 y el carbono 6 del ácido N-acetilmurámico, para dar lugar a un residuo 1,6 anhidromurámico (7) (Fig. 3). De esta forma, en *E. coli* y otras bacterias Gram negativas los extremos de las cadenas de disacáridos poseen residuos de 1,6-anhidromurámico, originados por la actividad de las TLs (3).

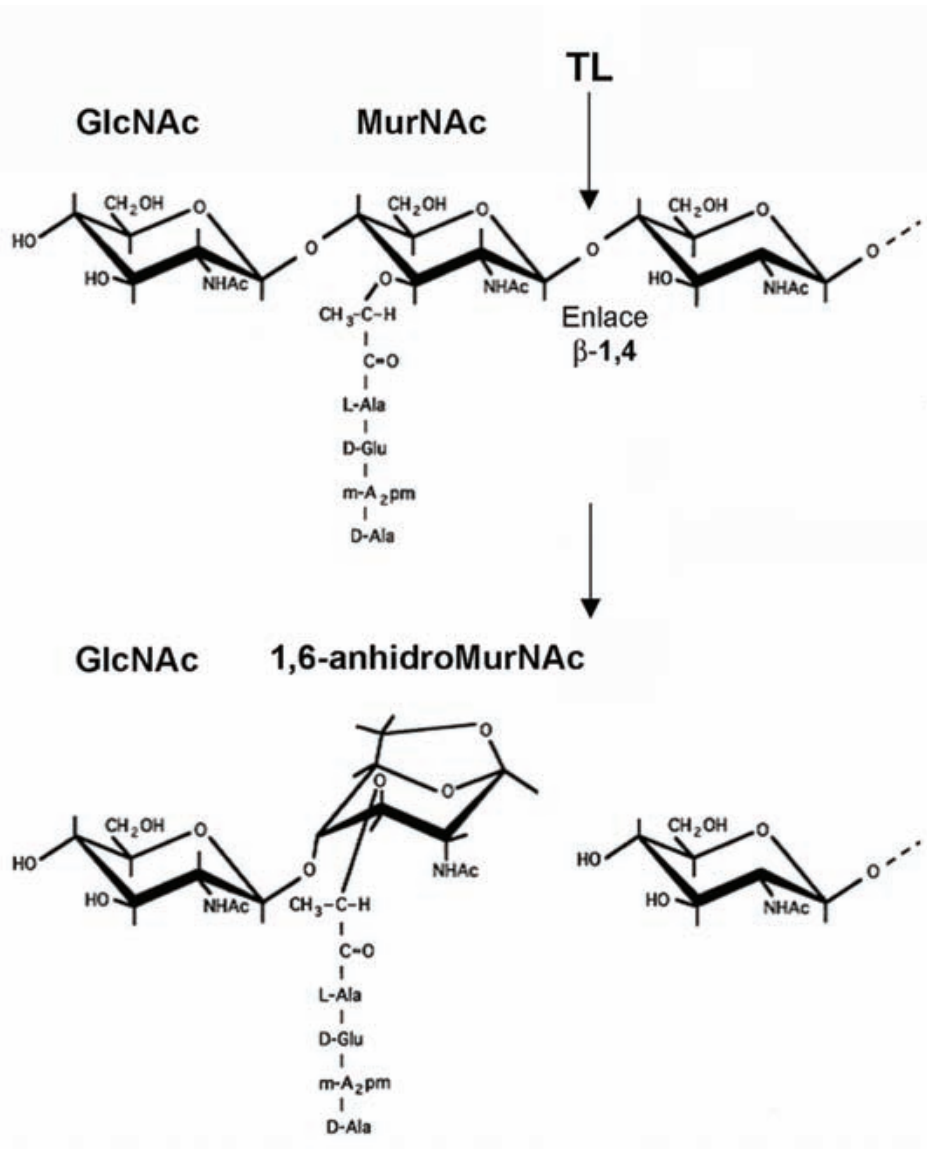


Figura 3. Sitio de corte de las TLs en la molécula de peptidoglicano (enlace β, 1-4, señalado con una flecha) y formación del residuo 1,6 anhidromurámico (1,6 anhidro-MurNAc).
MurNAc: ácido N-acetilmurámico,
GlcNAc: N-acetilglucosamina Modificada de (7).

El mecanismo de reacción propuesto para las TLs está basado en análisis mutacionales, estructurales y bioquímicos, que incluyen el uso de inhibidores como bulgecina A, hexa-N-acetilquitolhexosa y N-acetilglucosamin-tiazolina (NAG-tiazolina); los que han demostrado que un residuo de glutamato altamente conservado desempeña un papel central. Inicialmente el residuo glutamato catalítico actúa como un ácido, donando un protón al oxígeno del enlace glicosídico entre los residuos N-acilmurámico y N-acetilglucosamina. En el proceso de ruptura de dicho enlace, se forma un intermediario oxocarbanión que se estabiliza por medio del grupo N-acetilo del residuo murámico. Posteriormente, el residuo catalítico desprotonado actúa ahora como base, abstrayendo un protón del hidroxilo del carbono 6 del N-acilmurámico, promoviendo un ataque nucleofílico intramoleculal al carbono 1, que colapsa el producto intermediario y resulta

en la formación del residuo 1,6-anhidromurámico (6).

Por otra parte, las TLs se han agrupado en cuatro familias de acuerdo a la comparación de sus secuencias. La familia 1 representa a las TLs solubles (Familia Slt: *soluble lytic transglycosylases*), que presentan tres motivos consenso altamente conservados y que incluyen al glutamato catalítico (ES-GLMQ-AYNAG). Las familias 2 y 3 agrupan a las TLs asociadas a membrana (Mlt: *membrane-bound transglycosylases*) y la familia 4 está integrada principalmente por enzimas de bacteriófagos (8). Se ha determinado la estructura tridimensional de algunas TLs, por ejemplo Slt70 y Slt35 de *E. coli* (familia 1), MltA de *E. coli* y de *Neisseria gonorrhoeae* (familia 2), MltB de *E. coli* y *Pseudomonas aeruginosa* (familia 3) y la TL del fago lambda (familia 4) (6); y se observa que presentan un plegamiento similar al de la lisozima GEWL.

SISTEMAS DE SECRECIÓN EN BACTERIAS GRAM NEGATIVAS

En general, los sistemas de secreción de proteínas en bacterias Gram negativas pueden dividirse en dos grupos principales: Sec-dependientes y Sec-independientes (Fig. 4). En los sistemas Sec-dependientes, las proteínas utilizan a la translocasa Sec para atravesar la MI, la cual reconoce una secuencia señal hidrofóbica o péptido líder en el extremo amino de la proteína a secretarse (de aproximadamente 30 aminoácidos). Una vez en el espacio periplásmico, el péptido líder es procesado por peptidasas periplásmicas asociadas a la MI, liberándose la proteína madura para su posterior transporte a través de la ME. Dentro de las vías Sec-dependientes se incluyen los sistemas de secreción tipo II (SST2) y los autotransportadores o sistema tipo V (SST5) (9).

El SST2 es un sistema ampliamente conservado en bacterias Gram negativas, tanto en patógenos de plantas (*Pseudomonas fluorescens*, *Erwinia* spp., *Xanthomonas* spp.) como de animales (*Aeromonas hydrophila*) y de humanos (*Klebsiella oxytoca*, *P. aeruginosa*, *Legionella pneumophila*). Este sistema está formado por una estructura tipo pilus en el periplasma que secreta toxinas y enzimas hidrolíticas, como celulasas, elastasas amilasas, proteasas, fosfatasas, nucleasas, lipasas, etc. (9).

El SST5 o autotransportador, es un sistema presente en una gran variedad de bacterias Gram negativas y es utilizado principalmente para la secreción de proteínas de virulencia, como enzimas extracelulares y toxinas (*Neisseria* spp., *Bordetella* spp., *Haemophilus influenzae*, *Yersinia* spp., *Moraxella catharralis*). Las proteínas transportadas por este sistema son capaces de insertar su región carboxilo en la ME formando un poro, a través

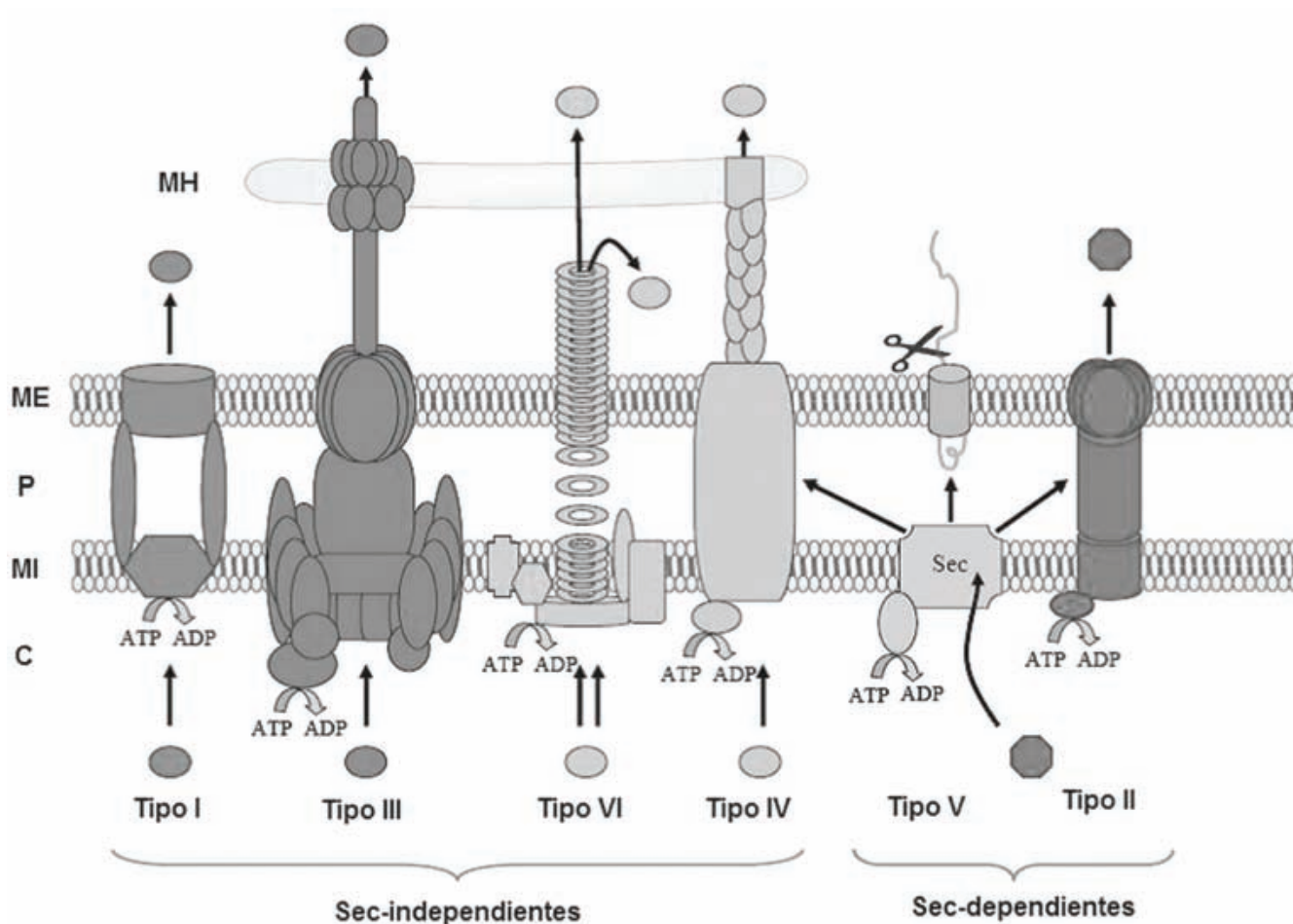


Figura 4. Representación de los sistemas de secreción de proteínas en bacterias Gram negativas. Se muestran los sistemas clasificados como Sec-independientes (Tipo I, III, VI y IV) y Sec-dependientes (Tipo V y II). La secreción de la toxina pertussis a través del sistema tipo IV ocurre de forma Sec-dependiente. MH: membrana de la célula hospedera, ME: membrana externa bacteriana, P: periplasma, MI: membrana interna o citoplásmica. C: citoplasma. Tomada de (9).

del cual puede secretarse el dominio pasajero o funcional de la proteína, el que puede a su vez permanecer en la superficie bacteriana, o liberarse al medio a través de un procesamiento adicional (9).

Por otro lado, en las vías Sec-independientes las proteínas a secretarse no presentan un péptido líder en el amino terminal y se transportan desde el citoplasma hasta el medio extracelular en un solo paso, sin que existan intermediarios periplásmicos (Fig. 4). En éstas se incluye a los sistemas de secreción tipo I (SST1), tipo III (SST3, de virulencia y flagelar), el SST4 en algunas especies bacterianas y el sistema de secreción tipo VI (SST6) (9).

El SST1, también conocido como transportador ABC (*ATP-binding cassette*) se utiliza para la secreción de diferentes tipos de moléculas al medio extracelular, desde iones hasta toxinas, proteasas, hemóforos, lipasas, β -glicanos y polisacáridos. Se encuentra por ejemplo en *E. coli*, *Pasteurella haemolytica*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *E. chrysanthemi* y *Serratia marcescens* (9).

El SST3 se utiliza para el ensamblaje de dos estructuras: el flagelo (organelo responsable de la movilidad) y el denominado inyectisoma que se encarga de secretar proteínas efectoras de virulencia. El inyectisoma es un complejo macromolecular de secreción que está compuesto por más de 25 proteínas diferentes. Entre éstas, existen 8 proteínas que están altamente conservadas entre los diferentes SST3 y que comparten similitud con los componentes del aparato de exportación flagelar. El inyectisoma se encuentra tanto en patógenos de animales y plantas como en algunas bacterias simbiotas (*E. coli* enteropatógena [EPEC por sus siglas en inglés], *P. aeruginosa*, *Shigella* spp., *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Xantomonas* spp., *Erwinia* spp., *Rhizobium* spp., entre otras) y se utiliza para la translocación de proteínas efectoras directamente al citoplasma del hospedero. Las proteínas translocadas interactúan con componentes de la célula hospedera alterando diferentes vías de señalización. Los genes que codifican los componentes estructurales del SST3 y las proteínas efectoras que se transportan a través de éste, están generalmente agrupados en islas de patogenicidad plasmídicas o cromosomales (10).

El SST4 está involucrado en la translocación de complejos nucleoprotéicos y ADN tumoral, tanto en bacterias Gram negativas como Gram positivas y en el dominio Archaea. Los sistemas de este tipo mejor estudiados son los de *Brucella suis*, *Agrobacterium tumefaciens* y *Helicobacter pylori*. Esta vía está relacionada con los sistemas de conjugación que facilitan la transferencia de ADN entre especies, y se utiliza para la adquisición y secreción de ácidos

nucléicos, así como de complejos nucleoprotéicos, y para la translocación de proteínas efectoras durante procesos infecciosos. En el caso de *A. tumefaciens* el SST4 está integrado por componentes que forman un canal de translocación y una estructura extracelular denominada pilus, la cual participa en el contacto con el hospedero y en la translocación de los sustratos. Aunque la secreción de la mayoría los sustratos a través de este sistema ocurre en una forma Sec-independiente, la excepción es la toxina pertussis (*Bordetella pertussis*), cuyas subunidades utilizan la translocasa Sec para transportarse al periplasma, en donde se ensamblan como holotoxina para después secretarse al medio extracelular vía SST4 (11).

El SST6, recientemente descubierto, secreta proteínas que están involucradas en la interacción con células eucariontes, aunque se desconoce si participan en virulencia o en simbiosis; sin embargo a las proteínas efectoras se les atribuyen las capacidades de adhesión e invasión a la célula hospedera, así como la inducción de crecimiento y la sobrevivencia intracelular en macrófagos. Este sistema se ha encontrado por ejemplo en *L. pneumophila*, *Vibrio cholerae*, *Rhizobium leguminosarum*, *Salmonella enterica* y *P. aeruginosa* (9).

TRANSGLICOSILASAS LÍTICAS ASOCIADAS A SISTEMAS DE SECRECIÓN

Las TLs especializadas de los sistemas de transporte son proteínas pequeñas, generalmente de 150 a 250 residuos, que son prescindibles para el crecimiento y la división celular, pero necesarias para el correcto ensamblaje de los sistemas de secreción macromoleculares. Su permanencia como parte de diferentes sistemas de secreción a lo largo de la evolución refuerza su importancia (2). En la siguiente sección se hace énfasis principalmente en las TLs especializadas acopladas tanto al SST3 (de virulencia y flagelar) como al SST4.

Transglicosilasas líticas asociadas al SST3 de virulencia

El ensamblaje del inyectisoma, cuyo diámetro es de aproximadamente 10 nm en su parte periplásmica, claramente requiere de una degradación localizada de la pared celular. Como ya se mencionó, esta lisis se lleva a cabo por TLs especializadas. De acuerdo con esto, las islas de patogenicidad que albergan a los genes del SST3 generalmente codifican una proteína que contiene el dominio de TL (2). Recientemente se determinó que la proteína IpgF codificada por el plásmido de virulencia pWR100 de *Shigella flexneri* presenta actividad de degra-

dación del peptidoglicano. Además se comprobó la importancia del glutamato catalítico para esta actividad, ya que una mutante en este aminoácido no presenta actividad enzimática. A su vez, se observó que la proteína IagB de la isla de patogenicidad SPI-1 de *S. enterica* presenta actividad lítica sobre peptidoglicano (12).

Otro ejemplo de una proteína con similitud a TLs asociada al SST3 es Hpa2 del fitopatógeno *X. oryzae*, que presenta actividad lítica *in vitro* sobre paredes celulares de distintas especies bacterianas. Una mutante en *hpa2* afecta la proliferación de la bacteria en el hospedero y reduce su patogenicidad, lo que sugiere que la proteína Hpa2 contribuye al ensamblaje del SST3 (13).

En *Pseudomonas syringae* se han identificado tres proteínas con dominio de TLs asociadas al SST3: HrpH, HopP1 y HopAJ1, de las cuales, las dos primeras son transportadas hacia el periplasma vía el SST3. La sobreproducción de HrpH en *E. coli* es capaz de inhibir el crecimiento, mientras que una mutante en el glutamato catalítico no tiene este efecto. Mutaciones simples o combinadas en los genes que codifican dichas proteínas provocan una reducción en la translocación de efectores y en la virulencia. Los resultados obtenidos indican que estas tres TLs contribuyen al funcionamiento del SST3 durante el proceso de infección, actuando de forma coordinada. Además de la actividad de TL, HrpH y HopP1 pueden tener funciones adicionales involucradas en patogénesis, ya que ambas son translocadas a las células vegetales y contienen dominios que son capaces de suprimir el sistema inmune del hospedero e inducir muerte celular (14).

En el SST3 de EPEC (cepa E2348/69 O127:H6), que es una bacteria asociada con diarrea infantil en países en vías de desarrollo (15), encontramos que el gen *etgA*, localizado dentro de la isla de patogenicidad LEE (locus de esfacelamiento enterocítico), codifica una proteína que presenta similitud con transglicosilasas líticas. En nuestro grupo de trabajo hicimos la caracterización bioquímica de EtgA, determinando que tiene actividad de muramidasa y que el glutamato catalítico es esencial para dicha actividad enzimática. A su vez, demostramos que EtgA se transporta al periplasma de EPEC de forma Sec-dependiente y que su sobreproducción provoca inhibición del crecimiento bacteriano y lisis celular dependiente de la actividad de TL. Mediante la generación de una mutante nula en *etgA*, determinamos que esta enzima es necesaria para que se lleve a cabo un ensamblaje eficiente del inyectisoma de EPEC, aunque no es indispensable para que ocurra dicho proceso. Lo anterior nos ha llevado a proponer un modelo de la participación de EtgA durante la biogénesis del SST3, en el que

EtgA se transporta al periplasma por medio de la translocasa Sec, se dirige al sitio de formación del sistema por medio de su interacción con proteínas periplásmicas del SST3 y genera un hueco en la capa de peptidoglicano que facilita el ensamblaje del inyectisoma (Fig. 5) (16).

Transglicosilasas líticas asociadas al SST3 flagelar

El flagelo bacteriano es un organelo utilizado para la propulsión celular que le permite a la bacteria moverse en su ambiente. Está formado por tres componentes principales: cuerpo basal, gancho y filamento. El cuerpo basal consiste de un anillo de MI, un anillo asociado con la capa de PG, un anillo de ME, un eje periplásmico y un aparato de exportación formado por proteínas integrales de MI y asociadas a ésta (17). El eje es la primera estructura en atravesar la capa de peptidoglicano y ya que ésta constituye una barrera, se ha propuesto que la ruptura de la pared celular es un prerrequisito para la formación del eje (18).

Se ha demostrado que la muramidasa FlgJ juega un papel importante en la biosíntesis del sistema flagelar de *S. enterica*. Esta muramidasa se secreta a través del sistema tipo III de exportación flagelar y presenta su actividad enzimática en el extremo C-terminal. Este dominio es el responsable de formar un hueco en la capa de peptidoglicano, permitiendo de esta forma la penetración del eje a través del espacio periplásmico para que puedan posteriormente ensamblarse el gancho y el filamento en el espacio extracelular (18). Sin embargo, se ha observado que una mutante en *flgJ* es capaz de nadar después de tiempos de incubación prolongados, indicando que la actividad de muramidasa no es absolutamente requerida para la formación del flagelo. Se propone que esto pudiera deberse a que el eje flagelar es capaz de ensamblarse a través de los huecos que se forman normalmente durante la biogénesis y el recambio del peptidoglicano (19).

Otro ejemplo de muramidasa asociada al sistema flagelar es el de la muramidasa SlfF de la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides*, que a diferencia de FlgJ de *S. enterica* se transporta al periplasma por la vía de la translocasa Sec, y se demostró que es capaz de generar un hueco en la capa de peptidoglicano para la subsecuente penetración de la estructura flagelar en formación (20).

En el caso de la bacteria acuática *Caulobacter crescentus* se ha demostrado que PleA, una enzima homóloga a TLs, se requiere para la biogénesis flagelar, ya que una mutante puntual en el sitio activo de la enzima no forma flagelo. Además, PleA está

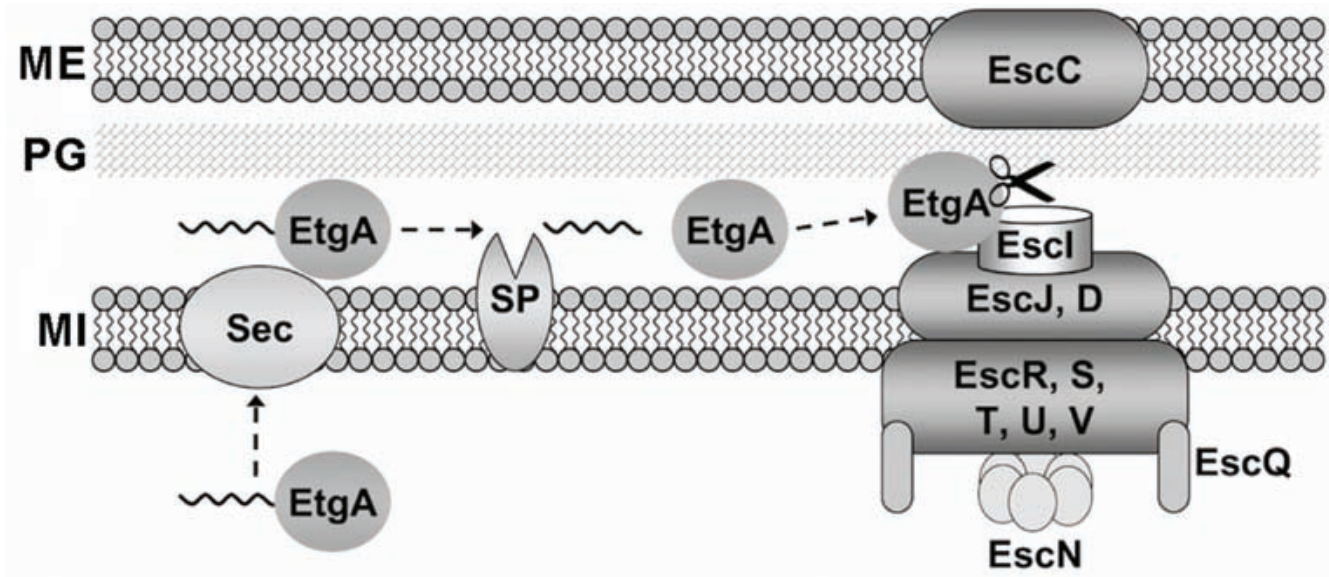


Figura 5. Modelo de la participación de EtgA en el ensamblaje del SST3 de virulencia de EPEC. EtgA se transporta al periplasma por la vía general de secreción (Sec), en donde se procesa su péptido líder (línea ondulada) por medio de peptidasas de la secuencia señal (SP) y se dirige hacia el SST3 en formación. Por medio de interacciones con componentes periplásmicos del SST3, EtgA degrada la capa de peptidoglicano de una forma localizada (evento representado con tijeras), permitiendo la formación de un hueco a través del cual puede ensamblarse el eje (EscI) para que continúe la biosíntesis del resto del sistema. Se indican algunas de las proteínas que conforman el cuerpo basal del inyectisoma. ME: membrana externa, PG: peptidoglicano, MI: membrana interna (16).

presente en la bacteria sólo durante un periodo de tiempo corto, que coincide con el ensamblaje flagelar, lo que indica su participación durante la formación del flagelo en una forma temporalmente controlada (21).

Transglicosilasas líticas en el SST4

El SST4 es utilizado por el patógeno de plantas *A. tumefaciens* para el transporte de complejos de nucleoproteínas que contienen ADN tumoral (T-ADN) (11). El operón *virB* en el plásmido Ti de este microorganismo codifica la proteína VirB1, la que se ha identificado como una TL relacionada con la capacidad de formación de tumores (22). VirB1 es una proteína con dos dominios: el de transglicosilasa lítica (TL) en el extremo amino y el dominio VirB1* en la región carboxilo, y ambos participan en la biogénesis del SST4 y en la virulencia (11). La actividad muralítica de la proteína VirB1 se ha demostrado tanto para la proteína de *A. tumefaciens* como para la del patógeno de animales *B. suis* (12) y se propone que facilita el ensamblaje del SST4, lisando en una forma localizada la pared celular para permitir su inserción. A su vez, el dominio VirB1* promueve dicho ensamblaje a través de interacciones proteína-proteína con algunos de los componentes periplásmicos del aparato secretor y con las subunidades del pilus T (23).

Por otro lado, en el SST4 de *N. gonorrhoeae* que secreta ADN para la transformación natural de gonococos, se identificó a la proteína AtIA como TL, y se determinó que la actividad de esta enzima es importante para la secreción de ADN, ya que se requiere para el ensamblaje del aparato secretor realizando una apertura controlada del peptidoglicano (24).

Otro ejemplo de TL relacionada con el SST4 es el de *H. pylori*, sistema para el que se ha demostrado la liberación de muropéptidos. Estos muropéptidos son translocados hacia células epiteliales a través del SST4, donde inducen la activación de la respuesta inmune vía la estimulación del receptor NOD1, contribuyendo de esta forma a la patogénesis. Los muropéptidos son generados por la actividad de la TL Slt (HP0645) sobre la pared celular durante el crecimiento bacteriano. Una mutante en *slt* presenta una reducción en la liberación de muropéptidos y en la activación de la respuesta inmune con respecto a la cepa silvestre (25).

Hipótesis que explican el fenotipo parcial de mutantes en transglicosilasas líticas

A pesar de la importancia biológica de las TLs, se han encontrado evidencias que sugieren que no son totalmente esenciales para los procesos en que participan. Por ejemplo, en mutantes de *E.*

coli carentes de algunas TLs no se afecta significativamente el proceso de crecimiento o división celular. Incluso, en una mutante de *E. coli* a la que se le eliminaron 6 TLs, sólo se afectó el proceso de separación celular, ya que se formaban cadenas cortas de bacterias unidas entre sí (26).

Adicionalmente, se ha observado que los sistemas de secreción pueden ensamblarse sin la asistencia de su correspondiente TL especializada, por lo que se ha propuesto que pudieran existir proteínas redundantes que sustituyan su función. Para el SST4, por ejemplo, se ha descrito que VirB1 no es completamente esencial para la transferencia del T-ADN, ya que la delección del gen *virB1* resulta sólo en una atenuación de la virulencia y de la formación de tumores, lo que podría indicar que existen otras enzimas que cumplen su función. Esto se ha sugerido también para la TL *lagB* del SST3 de *S. enterica*, ya que se reportó que una mutante en *lagB* no tiene ningún efecto sobre la secreción de proteínas ni sobre la formación del complejo aguja. Algo similar sucede con una mutante en *ipgF*, en la que no se encontró un efecto sobre la patogenicidad de *S. flexneri*. Asimismo, en el caso de la TL codificada por el gen *bfpH*, presente en el plásmido EAF de EPEC, se observó que una mutante nula *bfpH* no afecta la biogénesis del pilus tipo IV ni la adherencia, aunque se observó que dicha mutante presenta una reducción en su capacidad de autoagregación. Para este caso se propuso que la proteína EtgA de EPEC podría estar sustituyendo la función de BfpH (2).

En acuerdo con la hipótesis de redundancia funcional, se han reportado casos de complementación heteróloga entre TLs de distintos sistemas, como sucede con *IpgF* de *S. flexneri* y *TrbN* del SST4 del plásmido conjugativo RP4 que complementan una mutante en la TL P19 del plásmido conjugativo R1-16 (12). Algo similar sucede con *LtgB* de *N. gonorrhoeae*, que puede reemplazar funcionalmente a la TL del sistema de lisis del fago lambda (26), lo que sugiere que algunas TLs pueden funcionar para diferentes sistemas de secreción (2).

Una segunda hipótesis para explicar la carencia de fenotipos o los fenotipos débiles que presentan las mutantes en genes de TLs, sugiere que la actividad lítica de estas enzimas no es esencial para la biogénesis de los sistemas de secreción. En este sentido, se ha sugerido que los sistemas de secreción pudieran ensamblarse fortuitamente a través de los huecos que se forman naturalmente en la pared celular debido al continuo recambio que ocurre durante el metabolismo del PG. Esta hipótesis se ha sugerido para explicar el fenotipo de mutantes en *flgJ* (19) y *hrpH* (14). Adicionalmente, en nuestro grupo demostramos que la TL

BfpH, codificada en el plásmido de virulencia EAF de EPEC, a pesar de tener un alto porcentaje de similitud con EtgA y de expresarse en las mismas condiciones, no es capaz de sustituir su función (16). Estos datos contradicen la hipótesis de redundancia funcional, y apoyan la posibilidad de que los sistemas de secreción pueden llegar a ensamblarse sin la participación de las TLs, aunque la actividad de muramidasa de estas enzimas sí contribuye a la eficiencia de dicho proceso.

TRANSGLICOSILASAS LÍTICAS COMO BLANCOS TERAPÉUTICOS PARA NUEVOS ANTIMICROBIANOS


Durante mucho tiempo el ser humano ha utilizado los antibióticos para tratar las enfermedades provocadas por bacterias patógenas, tanto en el ámbito clínico como en el agrícola. Sin embargo, el surgimiento de bacterias resistentes a múltiples antibióticos hace que estos fármacos sean cada vez menos efectivos, lo que constituye un riesgo importante para la salud pública. Otra desventaja de los antibióticos es que no sólo atacan y eliminan a la bacteria causante de la infección, sino a las bacterias de la microbiota normal, lo que provoca un desbalance que favorece el crecimiento de cepas patógenas. Lo anterior hace necesario el desarrollo de nuevos agentes antibacterianos con modos de acción diferentes a los de los antibióticos tradicionales (27-29).

El conocimiento de los factores de virulencia y de la forma en que los patógenos manipulan los procesos celulares del hospedero se ha incrementado ampliamente en los últimos años, constituyendo una información que puede ser utilizada para la producción de compuestos antimicrobianos. La inactivación de los sistemas de secreción involucrados en virulencia es una alternativa distinta a la de inducción de la muerte bacteriana, lo que a su vez conduciría a la atenuación específica del patógeno, sin afectar a la microbiota natural. Las proteínas conservadas entre los diferentes sistemas de secreción ofrecen diversos blancos para el diseño de fármacos antimicrobianos; algunas de estas proteínas al presentar actividad enzimática pueden ser objeto de inhibición química. Esta inhibición no tendría un impacto en las funciones vitales de la bacteria por lo que la presión de selección sería baja, y por consecuencia el desarrollo de resistencia sería un proceso lento. En este caso, de producirse resistencia a los agentes que bloquean la virulencia, posiblemente ésta conduciría a la formación de sistemas de secreción no funcionales y por lo tanto de bacterias no virulentas. (28-30).

Dado que las TLs especializadas tienen un mecanismo de reacción único entre las enzimas muralíticas, actúan sobre una estructura esencial en las bacterias como es la pared celular y no tienen equivalentes en el metabolismo humano, se han considerado como blancos potenciales para la producción de nuevos fármacos. Lo anterior se ve apoyado con el hallazgo de inhibidores específicos de algunas TLs. Uno de estos inhibidores, la NAG-tiazolina es un análogo del intermediario oxocarbanión que se forma durante la actividad de estas enzimas (6, 30). En consecuencia, la inhibición de las TLs especializadas podría bloquear o retrasar el ensamblaje de los sistemas de secreción a través de la envoltura celular, favoreciendo el "desarme" de las bacterias patógenas. A su vez, el uso de compuestos inhibidores podría aportar mayores beneficios si se combina con la aplicación de nuevos antibióticos (30).

CONCLUSIÓN

El ensamblaje de complejos macromoleculares como fimbrias, flagelos y sistemas de secreción

a través del periplasma requiere de la apertura localizada de huecos en la pared celular, tarea que es llevada a cabo por enzimas muralíticas especializadas o TLs que se han encontrado asociadas a dichos complejos. La presencia de genes que codifican TLs especializadas en plásmidos y en islas de patogenicidad relacionados con diversos sistemas de secreción, sugiere que son importantes para el ensamblaje y funcionamiento eficiente de estos sistemas de transporte. Aunque las evidencias experimentales sugieren que si bien la actividad de algunas TLs no es esencial para el ensamblaje de los sistemas de secreción, sí hace que dicho proceso sea mucho más eficiente, teniendo así un papel importante en la patogénesis bacteriana. Adicionalmente, su conservación a lo largo de la evolución puede ser el resultado de la adquisición de funciones adicionales que pueden ser importantes para la patogénesis. Lo anterior las hace candidatas ideales para blancos de nuevos antibacterianos, contribuyendo a la inactivación y eliminación del patógeno sin favorecer la aparición de cepas resistentes. 

REFERENCIAS

1. Thanassi DG, Hultgren SJ (2000) Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr Opin Cell Biol* 12: 420-30.
2. Koraimann G (2003) Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell Mol Life Sci* 60: 2371-88.
3. Holtje JV (1998) Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 181-203.
4. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA (2008) Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* 32: 149-67.
5. Vollmer W, Joris B, Charlier P, Foster S (2008) Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* 32: 259-86.
6. Scheurwater E, Reid CW, Clarke AJ (2008) Lytic transglycosylases: bacterial space-making autolysins. *Int J Biochem Cell Biol* 40: 586-91.
7. Holtje JV (1995) From growth to autolysis: the murein hydrolases in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* 164: 243-54.
8. Blackburn NT, Clarke AJ (2001) Identification of four families of peptidoglycan lytic transglycosylases. *J Mol Evol* 52: 78-84.
9. Beeckman DS, Vanrompay DC (2009) Bacterial Secretion Systems with an Emphasis on the Chlamydial Type III Secretion System. *Curr Issues Mol Biol* 12: 17-42.
10. Hueck CJ (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 379-433.
11. Wallden K, Rivera-Calzada A, Waksman G (2010) Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cell Microbiol* 12: 1203-12.
12. Zahrl D, Wagner M, Bischof K, Bayer M, Zavec B, Beranek A, Ruckenstein C, Zarfel GE, Koraimann G (2005) Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology* 151: 3455-67.
13. Zhang J, Wang X, Zhang Y, Zhang G, Wang J (2008) A conserved Hpa2 protein has lytic activity against the bacterial cell wall in phytopathogenic *Xanthomonas oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol* 79: 605-16.
14. Oh HS, Kvitko BH, Morello JE, 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: 8277-89.

15. Chen HD, Frankel G (2005) Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* 29: 83-98.
16. Garcia-Gomez E, Espinosa N, de la Mora J, Dreyfus G, Gonzalez-Pedrajo B (2011) The muramidase *EtgA* from enteropathogenic *Escherichia coli* is required for efficient type III secretion. *Microbiology* 157: 1145-1160.
17. Chevance FF, Hughes KT (2008) Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine. *Nat Rev Microbiol* 6: 455-65.
18. Nambu T, Minamino T, Macnab RM, Kutsukake K (1999) Peptidoglycan-hydrolyzing activity of the *FlgJ* protein, essential for flagellar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 181: 1555-61.
19. Hirano T, Minamino T, Macnab RM (2001) The role in flagellar rod assembly of the N-terminal domain of *Salmonella FlgJ*, a flagellum-specific muramidase. *J Mol Biol* 312: 359-69.
20. de la Mora J, Ballado T, Gonzalez-Pedrajo B, Camarena L, Dreyfus G (2007) The flagellar muramidase from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *J Bacteriol* 189: 7998-8004.
21. Viollier PH, 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: 331-45.
22. Mushegian AR, Fullner KJ, Koonin EV, Nester EW (1996) A family of lysozyme-like virulence factors in bacterial pathogens of plants and animals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7321-6.
23. Zupan J, Hackworth CA, 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: 6551-63.
24. Kohler PL, Hamilton HL, Cloud-Hansen K, Dillard JP (2007) *AtIA* functions as a peptidoglycan lytic transglycosylase in the *Neisseria gonorrhoeae* type IV secretion system. *J Bacteriol* 189: 5421-8.
25. Viala J, Chaput C, Boneca IG, Cardona A, Girardin SE, Moran AP, Athman R, Memet S, Huerre MR, Coyle AJ, DiStefano PS, Sansonetti PJ, Labigne A, Bertin J, Philpott DJ, Ferrero RL (2004) *Nod1* responds to peptidoglycan delivered by the *Helicobacter pylori* cag pathogenicity island. *Nat Immunol* 5: 1166-74.
26. Kohler PL, Cloud KA, Hackett KT, Beck ET, Dillard JP (2005) Characterization of the role of *LtgB*, a putative lytic transglycosylase in *Neisseria gonorrhoeae*. *Microbiology* 151: 3081-8.
27. Parisien A, Allain B, Zhang J, Mandeville R, Lan CQ (2007) Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J Appl Microbiol* 104: 1-13.
28. Baron C (2010) Antivirulence drugs to target bacterial secretion systems. *Curr Opin Microbiol* 13: 100-5.
29. Keyser P, Elofsson M, Rosell S, Wolf-Watz H (2008) Virulence blockers as alternatives to antibiotics: type III secretion inhibitors against Gram-negative bacteria. *J Intern Med* 264: 17-29.
30. Baron C, Coombes B (2007) Targeting bacterial secretion systems: benefits of disarmament in the microcosm. *Infect Disord Drug Targets* 7: 19-27.