

00551



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

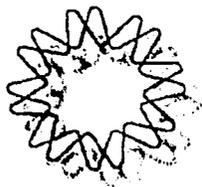
Papel de sistemas de dos componentes en la  
regulación de factores de virulencia en  
*Escherichia coli* entropatógena.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS

PRESENTA

Víctor Antonio García Angulo



Cuernavaca, Morelos. Agosto de 2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

NOMBRE: Victor Antonio García Angulo  
FECHA: 16 sept 2003  
FIRMA: Victor A. García A.

Este trabajo se realizó en el departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. José Luis Punte García.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. José Luis Punte García.

Dra. María Brenda Valderrama Blanco.

Dra. Eida Guadalupe Espín Ocampo.

Durante el desarrollo de este trabajo fui becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Registro 157392), y de la Dirección General de Estudios de Postgrado (DGEP) de la UNAM.

## Agradecimientos

Al Dr. José Luis Puente, por su conducción, y más aún por ser un buen amigo.

Al Dr. Edmundo Calva, por sus comentarios y consejos.

Al comité tutorial: Dr. Lupita Espín y Dr. Brenda Valderrama, y a mis revisores, Dr. Jorge Luis Folch, Dr. Mario Soberón, Dr. Ricardo Grande y Dr. Jaime Martínez, por su valioso papel en la culminación de este trabajo.

A Ale Vázquez y Toño Ibarra, por sus sugerencias e instrucción en el laboratorio.

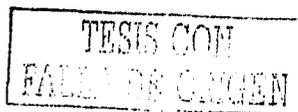
A los derechohabientes del laboratorio: Karol, Miryam, Oll, Mario, Jenny, Amapola, Carmen, Diana, Pancho, Rosalba, Elvira, Ulises, Juan, Nacho, Cristina, Patty, Alma, Vero, Marcos y Ricardo, por la ayuda que siempre me dieron.

A mi familia: mis papás, mis hermanos Mily y Missael, mi cuñado Fernando y mis sobrinos Fernando y Ana Laura. Por su apoyo.

A Nora, por todo.

A mis compañeros de generación y camaradas de IBt: Gina, Gaby, Edith, Ángeles, Andrés y Fernando, por la compañía y amistad.

A mis compas de siempre, porque el lazo de tierra nunca se rompe: Christian, Chester, Niño y Ramsés.



## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
1. INTRODUCCIÓN.....	2
2. ANTECEDENTES.....	14
3. OBJETIVOS.....	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
5. RESULTADOS.....	28
6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	42
7. PERSPECTIVAS.....	48
8. BIBLIOGRAFÍA.....	49

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
Tabla 1. Tipos de <i>E. coli</i> patógenas para humanos.....	3
Tabla 2. Regulación de virulencia en patógenos mediada por sistemas de dos componentes.....	13
Tabla 3. Cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio.....	19
Tabla 4. Oligonucleótidos usados en este trabajo.....	21

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Mecanismo de infección por EPEC.....	4
Figura 2. Factores de virulencia y regulación en EPEC.....	9
Figura 3. Representación esquemática de los sistemas de dos componentes.....	11
Figura 4. Estrategia de mutagénesis mediante fragmentos de PCR en un solo paso.....	23
Figura 5. Confirmación de mutantes por PCR.....	29
Figura 6. Perfil de proteínas de membrana externa .....	32
Figura 7. OmpR es necesario para la adaptación de EPEC a condiciones de bajo $Mg^{+2}$ .....	34
Figura 8. Ensayo de adherencia localizada.....	36
Figura 9. OmpR, PhoP y UvrY no son necesarios para la formación de pedestal por parte de EPEC.....	38
Figura 10. Inmunodetección tipo western con anticuerpos que reconocen factores de virulencia en EPEC.....	39
Figura 11. Actividad de fusiones transcripcionales.....	41

11

## LISTA DE ABREVIATURAS

A/E	Adherencia y Esfascelamiento (“ <u>A</u> ttacching and <u>E</u> ffacing”).
A/L	Adherencia localizada.
BFP	Pili formador de trenza (“ <u>B</u> undle-forming pili”).
CAT	<u>C</u> loranfenicol <u>a</u> cetil <u>t</u> ransferasa.
D.O. <sub>600</sub>	<u>D</u> ensidad <u>ó</u> ptica a 600 nm.
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (“ <u>D</u> ulbecco’s <u>m</u> odified <u>E</u> agle <u>m</u> edium”).
EAF	Factor de adherencia de EPEC ( <u>E</u> PEC <u>a</u> dherence <u>f</u> actor).
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (“ <u>E</u> ntero <u>h</u> aemorrhagic <u>E</u> scherichia <u>c</u> oli”).
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena (“ <u>E</u> nteropathogenic <u>E. coli</u> ”).
FAS	Tinción fluorescente de actina (“ <u>F</u> luorescent <u>a</u> ctin <u>s</u> taining”).
FRT	Secuencia de reconocimiento de FLP (“ <u>F</u> LP <u>r</u> ecognition <u>t</u> argets”).
LEE	Locus de esfascelamiento de enterocitos (“ <u>L</u> ocus of <u>e</u> nterocyte <u>e</u> ffacement”).
PME	<u>P</u> roteínas de <u>m</u> embrana <u>e</u> xterna.
SPI	Isla de patogenicidad de <i>Salmonella</i> (“ <i>Salmonella</i> pathogenicity island”).
SSTT	<u>S</u> istema de <u>s</u> ecreción <u>t</u> ipo <u>t</u> res.
UPEC	<i>E. coli</i> uropatógena (“ <u>U</u> ropathogenic <u>E. coli</u> ”).

## RESUMEN

### **“Papel de Sistemas de Dos Componentes en la Regulación de Factores de Virulencia en *Escherichia coli* enteropatógena”.**

Víctor Antonio García Angulo. Tutor: Dr. José Luis Puente García.

*Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) es uno de los patotipos de *E. coli* causantes de diarrea en humanos y es la principal causa de diarrea en niños en los países en vías de desarrollo. Esta bacteria es el modelo de una familia de patógenos capaces de causar una histopatología característica conocida como lesión A/E (Adherencia y Destrucción), la cual consiste en la eliminación de las microvellosidades del epitelio intestinal y la adherencia íntima de la bacteria con el enterocito formando una estructura de actina polimerizada bajo el sitio de adhesión, llamada pedestal. La infección por EPEC se caracteriza además por la adherencia inicial en forma de colonias discretas sobre la superficie del enterocito (Adherencia localizada), mediante la fimbria tipo IV BFP. En este trabajo se evaluó el efecto regulador de los sistemas de dos componentes EnvZ/OmpR, PhoQ/PhoP y BarA/UvrY sobre los genes requeridos para desarrollar la adherencia localizada y la lesión A/E, construyendo mutaciones no polares en los reguladores de respuesta *ompR*, *phoP* y *uvrY* en EPEC. Aunque inesperadamente la mutación en *ompR* produce una incapacidad para crecer en condiciones limitantes de magnesio, ninguna de estas mutaciones tuvo un efecto sobre la adherencia localizada, el desarrollo de la lesión A/E *in vitro*, o sobre la expresión de los factores de virulencia analizados, en contraste con el importante papel que desarrollan estos sistemas en el control de virulencia en otros patógenos.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* es la bacteria anaerobia facultativa predominante de la flora colonizante humana. Aunque normalmente permanece inocua confinada al lumen intestinal, algunas cepas de *E. coli* han desarrollado la habilidad de causar un amplio espectro de enfermedades. Se han reconocido tres síndromes clínicos generales resultantes de la infección con cepas patógenas de *E. coli*: infección del tracto urinario, sepsis/meningitis y enfermedades entéricas y diarreicas (Nataro y Kaper, 1998). Las cepas que pueden causar enfermedades gastrointestinales se han dividido en seis categorías principales (Puente y Finlay, 2001): *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* difusoadherente (DAEC) y *E. coli* enteropatógena (EPEC). Cada patotipo presenta patrones de adherencia a células hospederas e histopatología característicos, así como la producción o no de toxinas, dados por sus factores de virulencia particulares (Tabla 1).

EPEC es la principal causa de diarrea en niños menores de seis meses en los países en vías de desarrollo (Nataro y Kaper, 1998), y fue uno de los primeros tipos de *E. coli* reconocido como causa de diarrea infantil (Levine, 1987, revisión). Los síntomas de la infección por EPEC incluyen diarrea acuosa prolongada de variable severidad, vómito y fiebre de baja intensidad. A diferencia de otras diarreas causadas por cepas de *E. coli* patógenas, en la producida por EPEC no parece estar involucrada ninguna toxina, y los mecanismos moleculares que la desencadenan no están claramente definidos (Donnenberg *et al*, 1997).

### **Modelo de infección por EPEC.**

EPEC se considera el modelo de un grupo de microorganismos causantes de una histopatología conocida como lesión de Adherencia y Esfascelamiento o lesión A/E (“Attaching and Effacing”). Esta lesión se caracteriza por la eliminación localizada de las microvellosidades del epitelio intestinal; y cambios significativos en el citoesqueleto de la célula hospedera, los cuales incluyen la acumulación de actina polimerizada bajo la bacteria adherida, formando una estructura parecida a un

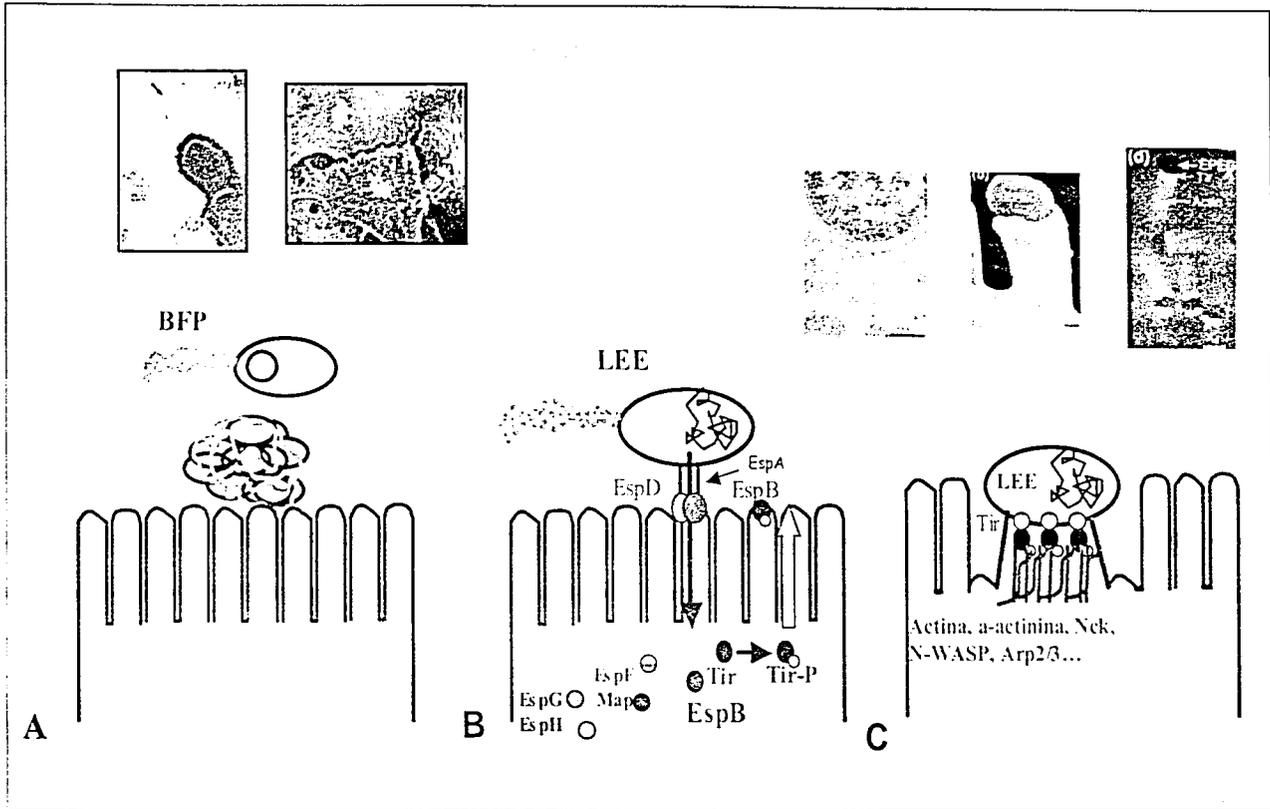
pedestal (Taylor et al, 1986; Rothbaum et al, 1982; Knutton et al, 1989; Nataro y Kaper, 1998).

**Tabla 1. Tipos de *E. coli* patógenas para humanos.\***

Tipo de <i>E. coli</i>	Enfermedad	Factores de virulencia
Enterotoxigénica (ETEC)	De diarrea acuosa a diarrea tipo cólera.	Toxina termosensible (LT), Toxina termoestable (ST), factores de colonización (CF's).
Enteroinvasiva (EIEC)	De diarrea acuosa a disentería.	Ipas, secreción tipo III (Mxi y Spa), VirG/IcsA.
Enteropatógena (EPEC)	Diarrea acuosa.	Esp's, secreción tipo III (Sep y Esc), intimina, Tir y BFP.
Enterohemorrágica (EHEC)	Colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico (SUH).	Factores de EPEC (excepto BFP), toxina Shiga, hemolisina.
Enteroadherente (EAEC)	De diarrea acuosa a mucosa.	Adhesinas AAF, EAST-, Pet, Pic, hemolisina.
Difusoadherente (DAEC)	Diarrea acuosa.	Fimbrias F1845 y AIDA-I.
Uropatógena (UPEC)	Infecciones del tracto urinario.	Pili tipo I, pili P, adhesinas afimbriales (Afa), hemolisina, CNF-1.
Séptica (SEC)	Sepsis neonatal, meningitis.	Cápsula, pili tipo I, adhesina fimbrial S, proteínas de invasión IbeA e IbeB.

\* Tomado de Puente y Finlay, 2001.

Las interacciones entre EPEC y la célula hospedera que conllevan al establecimiento de la lesión A/E han sido divididas en tres etapas: adherencia inicial, transducción de señales, y adherencia íntima (Figura 1) (Donnenberg y Kaper, 1992). Este modelo de infección por EPEC es generalmente aceptado aunque aún no es clara la secuencia temporal de los eventos, y ciertamente, éstos podrían tener lugar concurrentemente.



Modificado de Ibarra, 2003

**Figura 1. Mecanismo de infección por EPEC.** Se ilustra el modelo de infección en tres etapas. A) El pilus BFP es responsable de la adherencia localizada. En los recuadros se muestran micrografías de la fimbria y de microcolonias sobre una célula epitelial. B) Durante la segunda etapa son translocadas las proteínas efectoras a través del filamento de EspA del sistema de secreción tipo III. C) La formación de la adherencia íntima, mediada por la interacción Tir-intimina conlleva a la formación de pedestales de actina bajo la bacteria, reclutando proteínas del citoesqueleto hospedero (ver recuadro).

TESIS CON  
 VALORACION  
 MODIFICADO

La primera etapa se caracteriza por la unión no íntima de la bacteria con la célula hospedera, formando microcolonias en un patrón conocido como Adherencia Localizada (A/L). La formación de microcolonias y la A/L están asociadas a la producción de una fimbria tipo IV, llamada BFP ("Bundle forming pilus") (Cravioto et al, 1979; Vuopio-Varkila y Schoolnik, 1991). Esta fimbria mantiene unidas entre sí a las bacterias que forman parte de la microcolonia, y pareciera también mediar la adherencia de ésta a la célula hospedera, utilizando como receptor una fosfatidiletanolamina de la membrana celular eucariote (Barnett-Foster et al, 1999; Khursigara et al, 2001). El operón *bfp* codifica los genes necesarios para la biogénesis de la fimbria BFP, consta de catorce genes, y se encuentra localizado en el plásmido de alto peso molecular denominado pEAF (EPEC Adherence Factor). Se ha demostrado que 12 de los catorce genes son necesarios para la producción de la fimbria BFP y el fenotipo de adherencia localizada. Dichos genes son *bfpA*, *bfpG*, *bfpC*, *bfpD*, *bfpE*, *bfpB*, *bfpP*, *bfpU*, *bfpI*, *bfpJ*, *bfpK* y *bfpL*; mientras que *bfpF* y *bfpH* no son requeridos (Ramer et al, 2002). Aunque el papel individual de las proteínas codificadas en el locus *bfp* en la biogénesis de la fimbria no ha sido completamente documentado, se sabe que el primer gen del operón, *bfpA*, codifica para la bundlina, proteína de 193 aminoácidos y subunidad estructural de la fimbria, y por lo tanto el constituyente mayoritario de ésta (Girón et al, 1991; Soheli et al, 1996; Stone et al, 1996; Tobe et al, 1999). La importancia del pEAF y, por lo tanto, de la adherencia inicial en el esquema de infección por EPEC, ha sido documentada con estudios en adultos voluntarios (Bieber et al, 1998).

Durante la segunda etapa, una serie de proteínas translocadas a la célula hospedera por EPEC, a través de un sistema de secreción tipo III (SSTT), inician cascadas de transducción de señales, lo cual inicia una serie de cambios en el interior de la célula eucariote. Estos cambios incluyen el aumento en la concentración intracelular de calcio y de inositol 1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) (Baldwin et al, 1991; Foubister et al, 1994), la activación de fosfolipasa C<sub>γ</sub> (PLC<sub>γ</sub>) (Kenny y Finlay, 1997), proteína cinasa C (PKC) (Crane y Oh, 1997) y NF-κB (Savkovic et al, 1997). Las proteínas translocadas

también participan en la inducción de rearrreglos del citoesqueleto y la desaparición de las microvellosidades intestinales (Manjarrez *et al*, 1992; Rosenshine *et al*, 1992). El SSTT usado por EPEC, así como la mayoría de las proteínas translocadas efectoras documentadas hasta la fecha responsables de la producción de la lesión A/E, se encuentran codificadas en una isla de patogenicidad cromosomal llamada LEE (Locus of enterocyte effacement). Actualmente se tiene conocimiento de al menos siete proteínas codificadas en el LEE que son translocadas hacia la célula hospedera vía el SSTT: EspB (*Escherichia coli* secreted protein), EspD, EspF, EspG, Map, Tir y EspH. EspB y EspD han sido involucradas en la formación de un poro en la membrana de la célula hospedera, a través del cual son inyectadas las proteínas mediante el SSTT (Taylor *et al*, 1999; Wachter, *et al*, 1999). EspF y EspG, aunque al parecer no tienen papel en la formación de la lesión A/E en EPEC, son translocadas y pudieran tener relación con la producción de diarrea y la capacidad de colonizar el intestino (McNamara *et al*, 2001; Elliot *et al*, 2001). Map tampoco posee un papel claro en la formación de la lesión A/E, pero se ha propuesto que participa en la formación de filopodios transitorios en la membrana del hospedero, además de ser localizado en la mitocondria (Kenny *et al*, 2002). Tir es sin duda la proteína translocada más interesante de EPEC, puesto que siendo de origen bacteriano, una vez translocada se localiza en la membrana de la célula epitelial y funciona como receptor de una proteína de membrana externa de EPEC, la intimina, permitiendo el establecimiento de una unión íntima entre la bacteria y la célula eucariote. Este evento, a su vez, también involucra la activación de vías de transducción de señales que producen la acumulación de actina bajo la bacteria (Kenny *et al*, 1997b). Recientemente se demostró que EspH es translocada hacia la célula hospedera, en donde tiene un papel modulador en los rearrreglos del citoesqueleto que producen eventualmente la formación de los pedestales de actina (Tu *et al*, 2003).

Se ha demostrado que existe al menos una proteína fuera de LEE que también es translocada hacia la célula hospedera: EspC, cuya secreción es independiente del SSTT. Esta proteína es miembro de la familia de proteínas autotransportadoras, se

encuentra codificada en una segunda isla de patogenicidad de EPEC, y pareciera ser una enterotoxina (Mellies *et al*, 2001).

La tercer etapa de la infección involucra la interacción de la proteína Tir, localizada en la membrana de la célula hospedera, con la intimina, la cual se localiza en la membrana externa de EPEC. Esta interacción se produce después de la fosforilación de Tir en un residuo de tirosina (Kenny, 2002; revisión). La interacción de Tir con Intimina promueve la acumulación de filamentos de actina bajo los sitios de adhesión de la bacteria, dando lugar a formaciones parecidas a un pedestal. Se ha demostrado que estos rearrreglos del citoesqueleto hospedero tienen lugar mediante el reclutamiento por parte de Tir de las proteínas adaptadoras Nck1 y Nck2, quienes a su vez reclutan a la proteína N-WASP, la cual puede interactuar con el complejo Arp2/3, capaz de nuclear actina (Gruenheid *et al*, 2001; Kalman *et al*, 1999, Campellone *et al*, 2002).

#### **Regulación de factores de virulencia en EPEC.**

Como se ha venido estableciendo, los principales factores de virulencia en EPEC están codificados en dos loci principales, el pEAF y la isla de patogenicidad LEE. La adecuada expresión de dichos factores se asegura mediante una compleja red reguladora cuyos componentes y modos de acción empiezan a dilucidarse. Esta red reguladora implica componentes tanto del pEAF y la región LEE, como reguladores externos globales (Fig. 2).

Los genes del operón *bfp* se expresan selectivamente en medio de cultivo de células eucariotes durante la fase exponencial de crecimiento a 37°C, y se regula negativamente a temperaturas por arriba o por abajo de 37°C y en presencia de sales de amonio (Puente *et al*, 1996). La expresión de este operón requiere de la acción de la proteína PerA, también conocida como BfpT, producto del primer gen del locus *per*, presente en el plásmido pEAF, e integrado por tres genes: *perA*, *perB* y *perC* (Puente *et al*, 1996; Tobe *et al*, 1996). PerA es también requerido para la activación de su propio promotor, y se ha determinado recientemente la interacción directa de

esta proteína con las regiones reguladoras de ambos operones (Bustamante *et al*, 1998; Martínez-Laguna *et al*, 1999; Ibarra *et al*, 2003). Se ha involucrado también a la proteína GadX como regulador positivo del locus *per*, pero sólo en condiciones específicas de cultivo (Shin *et al*, 2001).

La región LEE se encuentra organizada en al menos cinco operones: *LEE1*, *LEE2* y *LEE3*, los cuales codifican proteínas componentes del SSTT (los genes *esc* y *sep*) y un regulador transcripcional (*Ler*); *LEE4*, el cual contiene genes para proteínas translocadas (*Esp*); y *LEE5*, en donde se encuentran codificados los genes necesarios para la adherencia íntima: *tir*, *cest* y *eae* (intimina) (Jarvis *et al*, 1995; Mellies *et al*, 1999; Sánchez-SanMartín *et al*, 2001). *Ler*, codificado por el primer gen del operón *LEE1*, regula positivamente la transcripción de los operones *LEE2*, *LEE3*, *LEE4* y *LEE5*, en donde se ha propuesto que revierte la regulación negativa ejercida por H-NS, y en el caso de *LEE5*, de un represor no identificado (Bustamante *et al*, 2001; Sánchez-SanMartín *et al* 2001; Haack *et al*, 2003), y al gen *espC*, fuera de LEE (Elliott *et al*, 2000). El operón *per* también ha sido involucrado en la regulación de los genes de LEE a través de *ler* (Gómez-Duarte y Kaper, 1995; Bustamante *et al*, 2001).

La regulación transcripcional de *ler* ha mostrado ser bastante compleja, puesto que además de los factores ya mencionados han sido involucrados los reguladores globales IHF (Friedberg *et al*, 1999), Fis (Goldberg *et al*, 2001), el regulador de "quorum sensing" QseA (Sperandio *et al*, 2002a), y la GTPasa BipA (Grant *et al*, 2003) como moduladores positivos, así como H-NS (J. Barba, comunicación personal) como regulador negativo.

La regulación de los factores de virulencia en EPEC, como en cualquier patógeno, tiene como objetivo sincronizar la patogenicidad y el nicho correcto en el cual desplegarla. Las fimbrias que median la adherencia de un patógeno a su lugar de colonización responden a las señales proporcionadas por éste, y se especula que la secreción de proteínas a través del SSTT de EPEC es inducida en condiciones similares a las encontradas en el tracto gastrointestinal mamífero (Edwards y Puente, 1998, revisión; Kenny *et al*, 1997a). A pesar del avance en el entendimiento de la

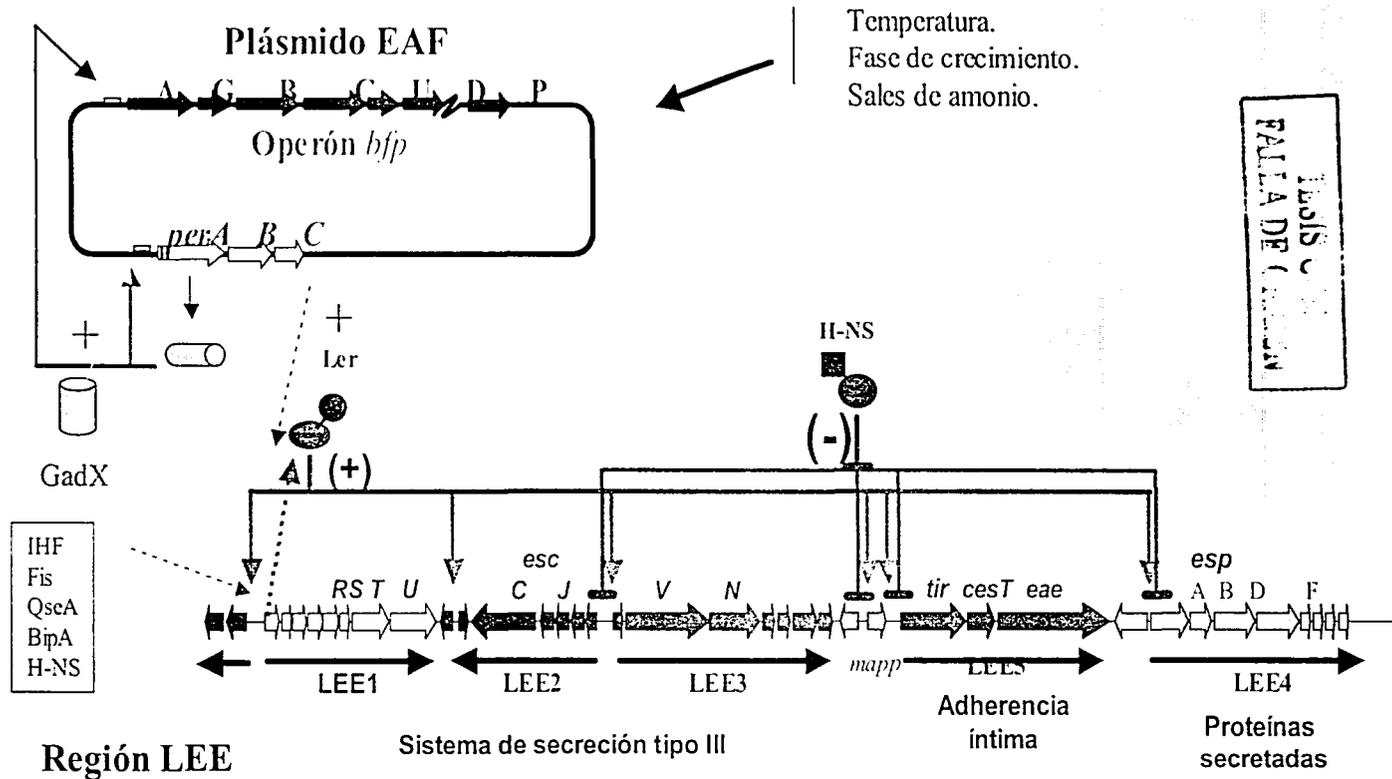


Figura 2. Factores de virulencia y regulación en EPEC

regulación de los factores de virulencia específicos de EPEC, y del conocimiento generado acerca de las condiciones ambientales necesarias para la apropiada expresión de éstos (temperatura, concentración de sales de amonio, fase de crecimiento y medios de cultivo), poco se ha logrado dilucidar con respecto a las posibles vías de comunicación entre la red reguladora mostrada en la figura 2 y las señales ambientales que modularían positiva o negativamente la expresión de estos factores. En este contexto, candidatos a realizar esta función son los sistemas de regulación de dos componentes. Estos sistemas ampliamente distribuidos, han demostrado ser piezas importantes en la regulación ambiental, tanto de genes de virulencia, como de genes con otro tipo de funciones.

#### **Sistemas de dos componentes y regulación de virulencia en patógenos.**

Los sistemas de dos componentes son mecanismos de señalización ampliamente utilizados por procariontes e incluso eucariotes para producir respuestas adaptativas a estímulos ambientales. En el genoma de *E. coli* se han identificado 32 de tales sistemas (Mizuno, 1997; Oshima *et al*, 2002). El modo de acción de éstos se esquematiza en la figura 3. El sistema de dos componentes básico consta de dos proteínas, una proteína de membrana detectora que recibe la señal, o histidin-cinasa, la cual generalmente actúa en forma dimerica, y una proteína reguladora de respuesta, en su mayoría citoplásmicas, que interactúa con la región reguladora de los genes blanco. El papel de la histidin-cinasa es la autofosforilación dependiente de ATP en respuesta a un estímulo ambiental específico, en un residuo conservado de histidina, y la fosforilación posterior de su regulador de respuesta en un residuo de aspartato. De esta manera, el regulador de respuesta fosforilado puede, a su vez, interactuar con regiones reguladoras promoviendo la transcripción de genes. Algunos sistemas contienen componentes adicionales (Fig. 3b); éstos generalmente requieren múltiples pasos de fosfotransferencia, los cuales involucran un dominio receptor en la histidin-cinasa y, algunas veces, una tercera proteína, llamada proteína HPt ("His container phosphotransfer"). Estos componentes adicionales han sido llamados

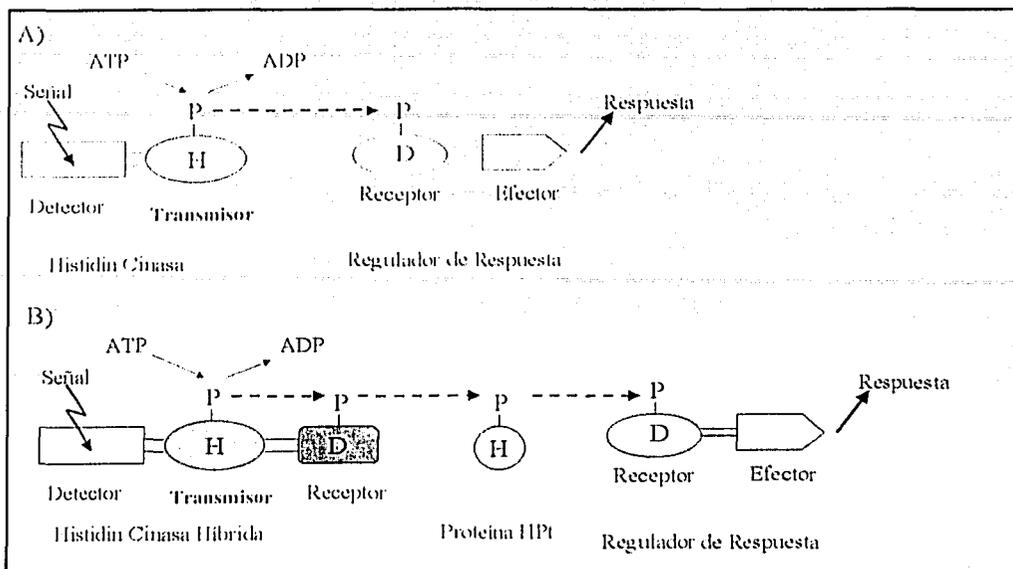


Figura 3. Representación esquemática de los sistemas de dos componentes. A) Un sistema de dos componentes típico consta de una proteína dimérica transmembranal (representada aquí en forma de monómero) histidín cinasa, y un regulador de respuesta citoplásmico. La percepción de la señal mediante el dominio detector de la histidín cinasa induce la autofosforilación del dominio transmisor en un residuo conservado de histidina. Posteriormente el fosfato es transferido hacia un residuo conservado de aspartato en el regulador de respuesta, el cual adquiere la propiedad de adherirse a DNA, mediante su dominio efector, y activar la transcripción de genes. B) Un sistema complejo de multifosfotransferencia puede contener una histidín cinasa híbrida, la cual posee un dominio receptor adicional en el extremo carboxilo. En este esquema ocurre más de una reacción de fosfotransferencia, y usualmente se involucra a una tercera proteína que también contiene un residuo de histidina, llamada Hpt, que sirve como intermediario fosforilado. Algunos sistemas de dos componentes incluyen el dominio Hpt como parte de la proteína detectora de membrana.

componentes puente (revisado por Chang y Stewart, 1998; West y Stock, 2001; Oka *et al*, 2002)).

Ciertos parámetros ambientales son frecuentemente asociados con el control de la transcripción de genes de virulencia en patógenos, como la concentración de hierro, temperatura, variaciones en pH y osmolaridad, concentración de iones divalentes como  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Mg}^{+2}$ , y gases como el  $\text{O}_2$  y  $\text{CO}_2$ . Dicha regulación en muchas ocasiones se produce a través de sistemas de dos componentes (revisado por Dziejman y Mekalanos, 1995).

La tabla 2 muestra ejemplos de patógenos en los cuales se ha demostrado control de virulencia por parte de sistemas de dos componentes.

Tabla 2. Regulación de virulencia en patógenos mediada por sistemas de dos componentes.

Organismo	Señal	Respuesta adaptativa	Proteínas reguladoras
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Compuestos fenólicos, monosacáridos.	Formación de tumor agalla de la corona	VirA/VirG
<i>Bacteroides fragilis</i>	Tetraciclina.	Expresión de porinas, Autotransferencia de DNA	RprX/RprY RtcA/RtcB
<i>Bordetella pertussis</i>	Temperatura, CO <sub>2</sub> , ácido nicotínico.	Activación y represión de factores de virulencia, incluyendo toxina HA	BvgA/BvgS
<i>Citrobacter freundii</i>	Desconocida.	Expresión de antígeno V1	ViaA/ViaB
<i>Clostridium perfringens</i>	Desconocida.	Expresión de colagenasa, HO y perfringolisina-O	VirR
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina.	Resistencia a vancomicina	VanR/VanS
<i>Erwinia amylovora</i>	Desconocida.	Síntesis de exopolisacáridos Respuesta hipersensitiva	ResB7/ResC HrpS ?
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	N <sub>2</sub>	Producción de ureasa	NirA/NirC
	O <sub>2</sub> , N <sub>2</sub>	Fijación de nitrógeno	NifA/NifL
<i>Nisseria gonorrhoeae</i>	Desconocida	Producción de capsula	RmpA2 ?
	Estrés	Producción de pili	PilA/PilB
<i>Salmonella typhimurium</i>	Osmolaridad.	Expresión de porinas	OmpR/EnvZ
	Magnesio.	Represión de genes de invasión.	PhoQ/PhoP
<i>Erwinia carotovora</i>	Ambiente intracelular.	Resistencia a polimixina B.	SsrA/SsrB
	Magnesio	Expresión de endopoligalacturonasa	PehR/PehS
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Desconocida	Producción de piocianina y cianuro	GacA/GacS
	Desconocida	Expresión de pili	PilR/PilS
	Enterobactina, hierro	Receptor de enterobactina férrica	PfeR/PfeS
	Osmolaridad	Síntesis de alginate.	AlgR1/AlgR2
<i>Streptococcus</i> Grupo A	Magnesio	Polisacárido capsular.	CsrA/CsrS

Modificada de Dziejman y Mekalanos, 1995.

EnvZ/OmpR, PhoQ/PhoP y BarA/UvrY, han sido tres de los sistemas de dos componentes involucrados en regulación de factores de virulencia que más se han documentado. Por su papel fundamental en la regulación de factores de virulencia, han sido seleccionados en este trabajo para ser evaluados como posibles reguladores de patogenicidad en EPEC.

### El sistema EnvZ/OmpR

El sistema EnvZ/OmpR, originalmente reportado como el regulador principal de la expresión de las porinas de membrana externa OmpC y OmpF en *E. coli*, y posteriormente OmpS1 y OmpS2 en *Salmonella* (Hall y Silhavy, 1981; Fernández-Mora *et al*, 1995; Oropeza *et al*, 1999), media la adaptación a cambios en la osmolaridad del medio, y se encuentra codificado en el operón *ompB*, el cual contiene los genes *ompR* y *envZ* (Pratt y Silhavy, 1995, revisión).

Este sistema compuesto por la proteína de membrana detectora EnvZ y el regulador de respuesta OmpR, es importante para la virulencia de *Salmonella typhimurium* en ratón (Groisman *et al*, 1992 y Dorman *et al*, 1989, citados por Groisman y Heffron, 1995.), y es requerido para la citotoxicidad hacia macrófagos (Lindgren *et al*, 1996). Estudios posteriores han mostrado que el regulador de respuesta OmpR fosforilado regula positivamente la transcripción de la isla de patogenicidad SPI2, mediante la activación transcripcional del operón *ssrA-ssrB*. Las proteínas SsrA y SsrB constituyen un sistema de dos componentes el cual está contenido en SPI2, y monitorea el ambiente vacuolar, en donde es requerido para activar la transcripción del resto de los genes de SPI2, incluido un SSTT, y otros genes involucrados en la replicación y sobrevivencia de *S. typhimurium* dentro de la célula hospedera y la infección sistémica (Lee *et al*, 2000). Además, se ha asociado a la capacidad de inducir apoptosis en macrófagos (Van Der Velden *et al*, 2000).

Schwan *et al*, en 2002, mostraron que en la regulación ambiental por pH y osmolaridad de los genes *fim* en *E. coli* uropatógena (UPEC) se encuentra involucrado

OmpR. Estos genes producen la fimbria tipo 1, responsable principal de la adherencia de UPEC a las células uroepiteliales, donde coloniza.

### **El sistema PhoQ/PhoP.**

El sistema compuesto por el detector de membrana PhoQ y el regulador de respuesta PhoP media la adaptación en ambientes limitantes de  $Mg^{+2}$ , activando la transcripción de los sistemas *mgtA* y *mgtB* de adquisición de magnesio. Dicho sistema, el cual responde a variaciones en la concentración extracitoplásmica de  $Mg^{+2}$  y  $Ca^{+2}$  (Soncini *et al*, 1996; Kato *et al*, 1999; Chamnongpol y Groisman, 2002, revisión), también gobierna virulencia en una gran cantidad de patógenos Gram negativos (Groisman, 2001, revisión). Los genes *phoP* y *phoQ* se encuentran codificados en el operón *phoP* en el cromosoma de *E. coli* K-12 y *Salmonella* (Kasahara *et al*, 1992; Groisman, 2001, revisión).

Especialmente en *Salmonella*, se ha demostrado que el sistema PhoQ/PhoP tiene un papel relevante en el control de virulencia. Cepas mutantes en PhoP o PhoQ son altamente atenuadas en ratones (Fields *et al*, 1989). En este patógeno al sistema se le involucra en la resistencia a pH ácido, sobrevivencia dentro de macrófagos y resistencia a péptidos antimicrobianos y sales biliares (Groisman, 2001). Se ha demostrado que reprime la expresión de algunos genes de la isla de patogenicidad SPI1, que codifica para proteínas que le permiten a *Salmonella* invadir células epiteliales intestinales y macrófagos, y a su vez activa un segundo sistema de dos componentes: PmrA/PmrB, el cual regula genes involucrados en presentación de lipopolisacáridos y median la resistencia a polimixina B, así como otros genes requeridos para la sobrevivencia dentro de macrófagos. (Lucas y Lee, 2000; Ernst *et al*, 2001). Además, mediante análisis por microarreglos, se demostró también que PhoP participa en la muerte celular de macrófagos humanos inducida por este patógeno (Detweiler *et al*, 2001).

*Salmonella* no es el único patógeno en donde se ha probado su importancia. Una cepa mutante nula en *phoP* de *Shigella flexneri* es hipersensible a ser eliminada por neutrófilos (Moss *et al*, 2001), mientras que una mutante de *Yersinia pestis* tiene una

dosis letal 75 veces mayor que una cepa silvestre, y tiene una menor capacidad para sobrevivir dentro de macrófagos (Oyston *et al*, 2000).

De este modo, a pesar de que *Salmonella*, *Shigella* y *Yersinia* causan diferentes patologías, la inactivación de *phoP* evita la proliferación dentro de células fagocíticas en las tres especies. Sin embargo, también controla factores de virulencia en *Erwinia carotovora*, un patógeno extracelular de plantas (Flego *et al*, 2000), en donde es requerido para la expresión de uno de los principales factores de virulencia, la endopoligalacturonasa PehA, lo que indica que este sistema puede controlar virulencia incluso en patógenos que no tienen un estilo de vida intracelular (Groisman, 2001).

### **El sistema BarA/UvrY.**

A pesar de desconocerse la señal ambiental a la que responde, se ha propuesto que el sistema integrado por el detector de membrana BarA y el regulador de respuesta UvrY está ubicado en la cima de una cascada de regulación de virulencia en una gran cantidad de patógenos. El detector de membrana, BarA, pertenece a la clase de histidin cinasas tripartitas, las cuales además del dominio transmisor ortodoxo con el residuo conservado de histidina, poseen un dominio central receptor adicional, con un residuo conservado de aspartato, y otro dominio carboxilo terminal fosfotransmisor con un residuo conservado de histidina (Pernesting *et al*, 2001). Este sistema controla la expresión de un amplio espectro de factores de virulencia en muchas especies, tales como toxinas, sistemas de secreción tipo III, metabolitos secundarios, genes de invasión y proteasas, entre otros. Pareciera que dentro de la variedad de elementos regulados por BarA/UvrY y sus homólogos, el aspecto común es que la mayoría de los productos son extracelulares y tienden a modificar el ambiente (Parkins, 2001). BarA y UvrY están codificados en diferentes loci, sin embargo, el gen *uvrY* forma un operón con el gen codificado corriente abajo, *uvrC*, el cual forma parte de un complejo enzimático involucrado en reparo de DNA (Pernesting *et al*, 2001).

El primer género en donde se describió este sistema es *Pseudomonas*, y es en donde más a fondo se ha estudiado (Heeb y Haas, 2001, revisión). En *P. fluorescens* se demostró que el homólogo de UvrY, GacA, es esencial para la producción de la proteasa extracelular AprA, a través de un control postranscripcional mediado por la proteína RsmA, y también de metabolitos secundarios como cianuro de hidrógeno, controlando la transcripción de los genes *hcnABC*, involucrados en su síntesis (Blumer et al, 1999).

Por otro lado, en *P. aeruginosa*, GacA ha sido relacionado con la regulación en respuesta a la densidad celular ("quorum sensing"), pues una mutación nula en el gen produce retraso y disminución en la síntesis de la señal de densidad celular *N*-butiril-L-homoserinlactona (BHL), y la producción de los compuestos citotóxicos piocianina y cianuro, además de la enzima lipasa (Reimman et al, 1997). En esta especie, además, se ha encontrado que GacA es esencial para la capacidad de desarrollar "biofilm", y en menor escala, para la resistencia a ciertos antibióticos (Parkins et al, 2001).

En *S. typhimurium* el sistema homólogo BarA/SirA, ha sido documentado como un regulador positivo de los genes de invasión, a través de la regulación transcripcional ejercida sobre el regulador HlxA codificado dentro de la isla de patogenicidad SPI1, la cual además codifica otros genes necesarios para invasión, incluidos *invF*, *orgA* y los operones *sip* y *prg* (Altier et al, 2000; Johnston et al, 1996).

Adicionalmente, los homólogos de BarA/UvrY han sido involucrados en la regulación de virulencia en *Vibrio cholerae* (BarA/VarA), donde es requerido para la expresión del regulón ToxR y para la colonización del intestino de ratón (Wong et al, 1998); *Erwinia carotovora* (ExpS/ExpA), donde regula la expresión de enzimas extracelulares (Eriksson et al, 1998); y *E. coli* uropatógena (BarA/UvrY), participando en la regulación de un sistema para la adquisición de hierro y en el cambio de la vía metabólica glicolítica hacia la vía gluconeogénica, al parecer por medio de la regulación del sistema Csr (Pernesting et al, 2003), entre muchos otros.

### 3. OBJETIVOS

#### Objetivo General

Estudiar los mecanismos de regulación de factores de virulencia en *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

#### Objetivo Particular

Evaluar el papel de los sistemas reguladores de dos componentes EnvZ/OmpR, PhoQ/PhoP y BarA/UvrY en la regulación de factores de virulencia en EPEC.

#### Objetivos Específicos

- Obtener mutantes de EPEC nulas en los reguladores de respuesta de cada uno de los sistemas de dos componentes estudiados: OmpR, PhoP y UvrY.
- Evaluar los fenotipos de adherencia localizada y adherencia íntima en cada una de las cepas mutantes.
- Evaluar la expresión de los genes *lor*, *tir*, y el operón *LEE2* mediante fusiones de sus regiones reguladoras con el gen reportero *cat*, comparando entre EPEC silvestre y las cepas mutantes.
- Evaluar la expresión de las proteínas BfpA, EspB y Tir en cada una de las cepas mutantes mediante ensayos tipo western.

#### 4. MATERIALES Y MÉTODOS

##### Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo.

En la tabla 3 se describen las cepas y los plásmidos utilizados en este estudio. Para el crecimiento de las cepas se usaron el medio Luria-Bertani (LB), el medio SOB, medio mínimo N (según se reportó previamente en García-Véscovi et al, 1996; con 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{MgCl}_2$ , y cuando fue requerido, 60  $\mu\text{M}$  de EDTA), y el medio DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle Medium") (Gibco BRL) suplementado con 1% de LB y 4  $\mu\text{g/ml}$  de piridoxal. Cuando fue el caso, se suplementaron estos medios con kanamicina (30  $\mu\text{g/ml}$ ), ampicilina (200  $\mu\text{g/ml}$ ), cloranfenicol (25  $\mu\text{g/ml}$ ) y ácido nalidíxico (75  $\mu\text{g/ml}$ ).

Tabla 3. Cepas bacterianas y plásmidos usados en este estudio.

CEPAS BACTERIANAS	
E2348/69	EPEC O126/H6; contiene el plásmido pEAF (69 kb) y el plásmido críptico (3 kb) (Levine et al, 1978)
JPN15	Cepa derivada de E2348/69, que carece del plásmido pEAF (Jerse et al, 1990).
E2348/69 $\Delta$ ompR	Cepa derivada de E2348/69 mutante en el gen <i>ompR</i> ; <i>ompR::Km</i> (Este trabajo).
E2348/69 $\Delta$ phoP	Cepa derivada de E2348/69 mutante en el gen <i>phoP</i> ; <i>phoP::Km</i> (Este trabajo).
E2348/69 $\Delta$ uvrY	Cepa derivada de E2348/69 mutante en el gen <i>uvrY</i> ; <i>uvrY::Km</i> (Este trabajo).
E2348/69 $\Delta$ ler	Cepa derivada de E2348/69 mutante en <i>ler</i> (sustracción en fase de <i>ler</i> ) (Bustamante et al, 2001).
PLÁSMIDOS	
pAT222	Derivado de pACYC conteniendo el gen <i>ompR</i> de <i>Salmonella typhi</i> (Irma Martínez, comunicación personal).

pKD46	Plásmido termosensible conteniendo el sistema de recombinación Red ( $\gamma$ , $\beta$ y $\text{exo}$ ) bajo el promotor $P_{\text{araB}}$ (Datsenko y Wanner, 2000).
pKD4	Plásmido molde para el fragmento de PCR mutagénico, con el gen de resistencia a kanamicina, flanqueado por secuencias FRT ("ELP recognition target") (Datsenko y Wanner, 2000).
PCR2.1-TOPO	Derivado de pUC, usado para la clonación de fragmentos de PCR (Equipo TOPO TA Cloning <sup>®</sup> de Invitrogen).
pSEPZ-11	Derivado de pKK232-8, conteniendo la fusión transcripcional <i>sepZ-cat</i> de los nucleótidos -469 a +121 (Bustamante et al, 2001).
pLER-1179	Derivado del pKK232-8, conteniendo la fusión transcripcional <i>ler-cat</i> desde el nucleótido -1179 hasta +220 (Víctor Bustamante, comunicación personal).
pTir394	Derivado de pKK232-8, conteniendo la fusión transcripcional <i>tir-cat</i> de los nucleótidos -394 a +138 (Sánchez-SanMartín et al, 2001).
pPHOP1M	Derivado del PCR2.1-TOPO, conteniendo el gen <i>phoP</i> con su propio promotor, y clonado a favor de <i>Plac</i> (Este trabajo).

### Oligonucleótidos.

Todos los oligonucleótidos usados en este trabajo fueron solicitados a la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología, UNAM. Estos oligonucleótidos fueron usados para las reacciones de PCR requeridas, diluidos a una concentración inicial de 25 $\mu$ M, y se describen en la Tabla 4.

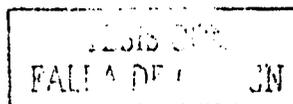
Tabla 4. Oligonucleótidos usados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
NuvrY/H1P1	<u>GATGACCACGA</u> ACTGGTGGCGCGCAGGGATACGACGCATT GTAGGCTGGAGCTGCTTCG
NuvrY/H2P2	<u>CTGGCTGGT</u> IACGGTTTTTAAAAACGCTTTTGGCGTCAAACATA TGAATATCCTCCTTAG
UvrYUp	CGGAGIATACATAAGCTTTGGCT
UvrYLo	GGCTGGATCCGGTTTTTAAAAACGC
OmpR/H1P1	<u>AACCTTTGGGAGTACA</u> AAACAATGCAAGAGAATTATAAGATTC <u>TGGT</u> TGTAGGCTGGAGCTGCTTCG
OmpR/H2P2	<u>GACGTAGAACAGAC</u> CCCAGACGGTCTGAATGCATATGAATA TCCTCCTTAG
PhoPUp	GGAAGTGAAGCTTGACCATC
PhoPLo	GAAAACGGATCCGCAGCGAG
PhoP/H1P1	GGAGAAATAAAAATGCGCGTAATGTTGTTGAAGACAATTG TAGGCTGGAGCTGCTTCG
PhoP/H2P2	<u>CACTTGTGGGATATTGTG</u> CCTGAATTTTTTCCGCCAGCATA TGAATATCCTCCTTAG
OmpRUp	CGTTCATCTCGTTGATTCCC
OmpRLo	ACAACCAACTGGCTGCCGTCC
K1	CAGCATAGCCGAATAGCCT
K2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC
Kl	CGGCCACAGTCGATGAATCC

En los oligonucleótidos con parte de su secuencia subrayada, ésta representa la fracción de la secuencia que es homóloga al gen a susituir.

### Mutagénesis.

La metodología de mutagénesis por fragmentos de PCR se realizó según el procedimiento descrito por Datsenko y Wanner (2000), con modificaciones, y se describe brevemente a continuación.



### **Obtención del producto de PCR mutagénico.**

Para cada gen a mutar se preparó un fragmento de PCR utilizando como molde el plásmido pKD4 y oligonucleótidos H1P1 y H2P2 diseñados específicamente. Estos oligonucleótidos poseen un fragmento de secuencia homólogo a las secuencias flanqueantes al gen de kanamicina y FRT del plásmido pKD4, y otro fragmento de secuencia homólogo al gen a interrumpir. La estructura final del producto se ilustra en la figura 4. En dicho producto, hacia el extremo 3' del cassette de Kanamicina, se encuentra una secuencia de sitio de unión a ribosoma, y corriente abajo de ésta, un codón de inicio de traducción (ATG), por lo que es posible construir mutaciones no polares en operones, si el oligonucleótido con homología al extremo 3' del gen blanco se diseña en fase con dicho codon de inicio. Los oligonucleótidos H2P2 usados en cada mutagénesis fueron diseñados de esta manera (Tabla 4).

### **Transformación y selección.**

La cepa E2348/69 se transformó con el plásmido pKD46 y se seleccionó en cajas de LB con ampicilina a 30°C. Para la preparación de células electrocompetentes de la cepa E2348/69/pKD46 se creció a 30 °C en medio SOB suplementado con ampicilina y L-arabinosa (0.1 M final) como inductor del sistema de recombinación Red, el cual promueve la recombinación entre las secuencias homólogas del producto de PCR y el gen a sustituir. Estas células se electroporaron con aproximadamente 200 ng del producto de PCR obtenido en el paso anterior utilizando un electroporador BioRad Micropulser<sup>®</sup>, y el programa EC2 (2.5 kV durante 5.7 ms). Posterior a una recuperación en medio SOC durante 1 hora a 37 °C, la selección de posibles mutantes se llevó a cabo en cajas de agar LB con kanamicina, a 42°C. A las colonias obtenidas se les comprobó pérdida de resistencia a ampicilina a 30°C, y posteriormente se les extrajo DNA cromosomal con el equipo Quantum Prep<sup>®</sup> de BioRad según las especificaciones del fabricante, para llevar a cabo reacciones de PCR con el fin de comprobar la sustitución del gen de interés y la nueva estructura cromosomal con las combinaciones de los oligonucleótidos indicados en la figura 4.

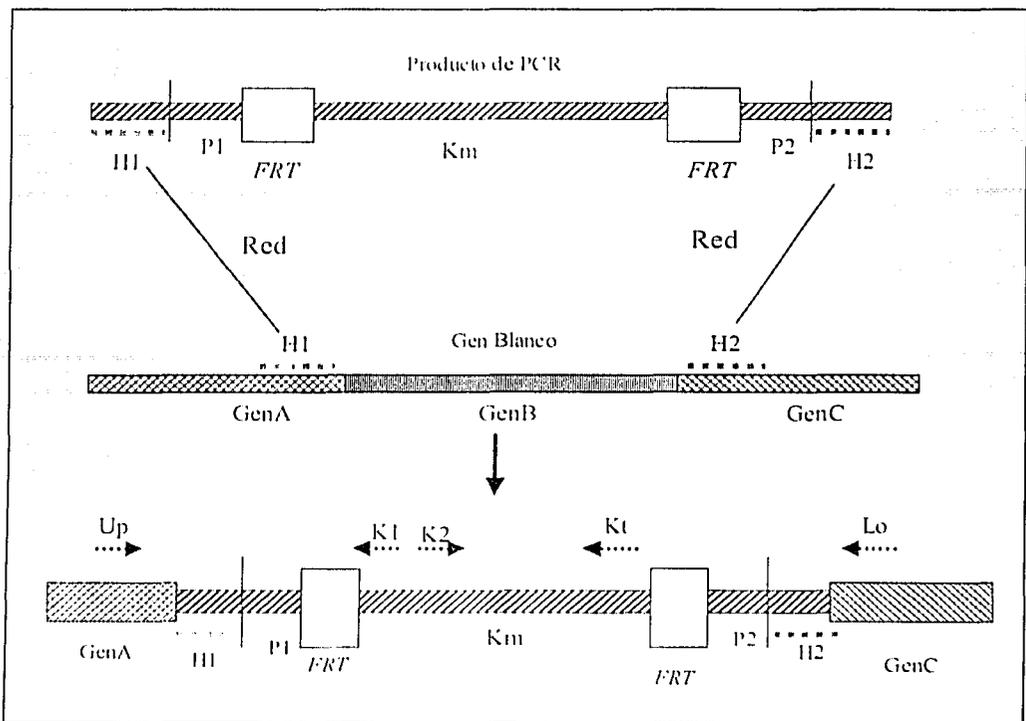


Figura 4. Estrategia de mutagénesis mediante fragmentos de PCR en un solo paso. El producto de PCR conteniendo las secuencias homólogas a los extremos del gen a sustituir (H1), el cassette de resistencia a kanamicina y las secuencias FRT, recombina con el gen cromosomal, evento facilitado por la recombinasa del sistema Red, expresada desde el pKD46. Las secuencias P1 y P2 son homólogas a los extremos del cassette de kanamicina y a las secuencias FRT contenidas en el plásmido molde pKD4. Las flechas punteadas indican las posiciones relativas de los oligonucleótidos que serán utilizados para corroborar la mutación, después de seleccionar colonias resistentes a Km. Las secuencias FRT son invertidas repetidas y pueden ser usadas posteriormente para escindir el cassette de kanamicina, mediante la introducción del plásmido pCP20 que codifica para la recombinasa FLP.

#### Ensayo de adherencia localizada.

El ensayo de adherencia localizada se realizó según el procedimiento descrito anteriormente (Puentes *et al*, 1996). 5 mL de LB en tubo se inocularon y se incubaron

en agitación a 37 °C toda la noche con las cepas señaladas en la tabla 3. Posteriormente con este cultivo se inocularon 5 mL de DME suplementado con LB al 1%, con una dilución 1:50 y se incubaron en las mismas condiciones 3 horas más. Previamente se prepararon monocapas de células HeLa en cubreobjetos circulares (Bellco) en medio de cultivo de células MEM en placas de 24 pozos (50,000 células por pozo aproximadamente).

Cada monocapa se infectó con 200 µL del subcultivo de cada cepa, y se incubaron a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% por 1.5 horas. Al término de este tiempo las bacterias no adheridas se removieron con tres lavados de PBS, las preparaciones se fijaron con metanol absoluto frío por 10 minutos, y se tiñeron toda la noche con solución de Giemsa 1:25. Se retiraron los cubreobjetos de la placa, se montaron con resina en portaobjetos y se observaron y fotografiaron en un microscopio Nikon Eclipse E600 en la modalidad de campo claro.

#### **Ensayo de tinción fluorescente de actina (FAS).**

El ensayo de tinción fluorescente de actina o "fluorescence actin staining" (FAS) se realizó según el procedimiento descrito por Knutton *et al* (1989). Se prepararon cultivos de bacterias y monocapas de células HeLa en cubreobjetos redondos de manera similar que para el ensayo de adherencia localizada. Se inocularon los pozos con 200 µL de cultivo de bacterias en DME y se incubaron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% por 1.5 horas. Al término se retiraron las bacterias no adheridas mediante tres lavados con PBS. Posteriormente se fijaron las preparaciones con formaldehído al 3% durante 20 minutos y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% en PBS durante 5 minutos. Después se efectuaron tres lavados con PBS y se tiñeron con una solución de faloidina conjugada con rodamina o fluoresceína (Sigma) 2 µg/mL durante 20 minutos. Finalmente se lavó tres veces con PBS y las preparaciones se montaron en un portaobjetos impregnadas en una solución al 50% de glicerol en

PBS. Las preparaciones se observaron en un microscopio de fluorescencia Eclipse E600 (Nikon).

### **Ensayo de inmunodetección (“western blot”).**

Las bacterias se cultivaron en medio LB durante toda la noche; posteriormente se subcultivaron con una dilución 1:100 en medio DME complementado con LB (1% final) a 37°C, sin agitación en atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Se tomó 1 mL de muestra a D.O.<sub>600</sub> de 1.0. Se centrifugó a 5000 rpm durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 100 µL de amortiguador de corrimiento para proteínas. Las muestras resuspendidas se desnaturalizaron por 10 minutos a 96°C, y se corrieron 15 µL en un gel de SDS-poliacrilamida al 12%. Después las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm de poro (Amersham) utilizando una cámara de transferencia húmeda (BioRad) durante 30 minutos a 100 V. Como una manera de corroborar la uniformidad de la concentración de proteínas en cada carril la membrana se tiñó con rojo de Ponceau (Sigma) por 5 minutos y posteriormente se destiñó con agua. A continuación la membrana se bloqueó con una solución al 5% de leche descremada deshidratada (Carnation), en amortiguador TBS-Tween durante 1 hora a temperatura ambiente. Durante toda la noche la membrana se incubó con la dilución adecuada del anticuerpo primario anti-BfpA (anticuerpo policlonal, diluido 1:20,000), anti-Tir (anticuerpo policlonal, diluido 1:10,000), anti-EspB (anticuerpo monoclonal, diluido 1:10,000) o anti-DnaK (anticuerpo monoclonal, diluido 1:10,000), a temperatura ambiente con agitación. Después de esto se le aplicaron tres lavados de 10 minutos con regulador TBS-Tween a temperatura ambiente con agitación, y se le adicionó una dilución 1:10,000 del anticuerpo secundario (anti-conejo o anti-ratón) acoplado a peroxidasa (HRP) (Biomed). Se incubó la membrana durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación. Finalmente se efectuaron tres lavados con TBS-Tween. La membrana se reveló con el equipo de quimioluminiscencia Chemi-Glow (Alpha

Innotech), y se observó en el transiluminador Chemi Image (Alpha Innotech) o se expuso a película fotográfica (Kodak) por diferentes tiempos.

### **Ensayo de actividad de fusiones transcripcionales.**

La actividad de las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* se determinó como se describe en Puente *et al* (1996). Las cepas transformadas con los plásmidos conteniendo las fusiones se cultivaron en 60 mL de LB con ampicilina en un baño con agitación (110 rpm) a 37 °C toda la noche. Los cultivos se lavaron y ajustaron a una D.O.<sub>600</sub> de 1.0 con PBS, y se subcultivaron 1:50 en 50 mL de DME suplementado con LB al 1 %, a 37 °C con agitación (220 rpm). Se tomaron alícuotas al alcanzar una D.O.<sub>600</sub> igual a 1.0, y éstas se centrifugaron a 10,000 rpm por 2 minutos en centrifuga refrigerada Eppendorf Centrifuge 5403 a 4°C. Las pastillas celulares se lavaron con solución TDTT (Tris-HCl 0.05 mM pH 7.8, DTT 3 µM). Posteriormente se resuspendieron en 0.5 mL de TDTT para ser sonicadas en un sonicador Soni-Prep 150 (Sonics and Materials), con 6 pulsos de 15 segundos, con intervalos de 10 segundos. A continuación se centrifugó a 10,000 rpm a 4 °C por 20 minutos y se recuperó el sobrenadante. La concentración de proteína de los extractos se determinó con el equipo comercial BCA (Pierce), mientras que la actividad de la enzima cloranfenicol acetil-transferasa (CAT) se determinó mediante una cinética de actividad enzimática en presencia de acetil-CoA (0.1mM), cloranfenicol (0.1mM) y 5,5´ditio-bis(2-ácido nitrobenzoico) (DNTB) (1mM) (Research Organics) en placas de 96 pozos y un lector de microplacas computarizado Ceres 900C, y el programa KC3 (Biotek Instruments). La actividad específica de CAT (µmol/min/mg) por extracto se determinó dividiendo la actividad obtenida en las cinéticas entre la concentración de proteína en mg/mL.

TESIS CON  
FALLA DE CONTEN

### **Extracción de proteínas de membrana externa.**

La extracción de proteínas de membrana externa se realizó básicamente como en Oropeza *et al* (1999). 500 mL de un inóculo de toda la noche se adicionaron a 50 mL de DME o LB y se incubaron aproximadamente por 12 horas a 37°C sin agitación en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. A continuación se tomó una alícuota de 5 mL y se centrifugó 2 minutos a 12,000 rpm, se lavaron las pastillas con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM pH 7.2, y se resuspendieron en 0.5 mL de la misma solución. Se rompieron las células mediante sonicación en un sonicador Soni-Prep 150 (Sonics and Materials). Después se centrifugó por 2 minutos a 12,000 rpm, y el sobrenadante se volvió a centrifugar, pero esta vez a 10,000 rpm durante 1 hora, a 4°C. Al terminar de centrifugar se resuspendió la pastilla en Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM pH 7.2 con 2% de Tritón X-100 y se incubó a 37°C con agitación. Al término de esta incubación la preparación se centrifugó a 4°C a 10,000 rpm durante 1 hora. Después de un lavado con Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> la preparación se resuspendió en 50 µL de PBS pH 7.4 y se diluyó 1:1 en amortiguador de corrimiento para proteínas. Las proteínas extraídas se visualizaron en un gel de SDS-poliacrilamida al 12 %.

### **Crecimiento en condiciones limitantes de magnesio.**

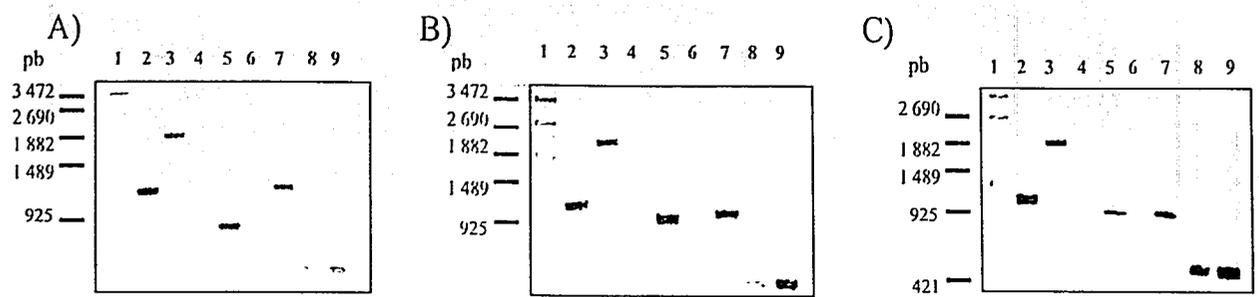
Las cepas se cultivaron toda la noche en 5 mL de medio LB con el antibiótico correspondiente, a 37°C con agitación. Al día siguiente se tomó muestra con ayuda de un cotonete estéril y se aplicó directamente sobre la caja de medio mínimo N (1% agarosa), complementado con magnesio (20 µM) y en su caso, EDTA (60 µM). Las cajas se incubaron aproximadamente 36 horas y se fotografiaron.

## 5. RESULTADOS

### Mutagénesis de los reguladores de respuesta *ompR*, *phoP* y *uvrY*.

Con el propósito de generar mutaciones no polares en los genes que codifican para los reguladores de respuesta *OmpR*, *PhoP* y *UvrY*, los cuales han sido involucrados en la virulencia de otras bacterias patógenas, éstos se interrumpieron mediante el procedimiento descrito por Datsenko y Wanner (2000) para obtener mutantes con productos de PCR en un solo paso. Después de obtener colonias candidatas con resistencia a kanamicina y sensibles a ampicilina, se realizaron reacciones de PCR para comprobar el reemplazamiento del gen de interés, con el gen de resistencia a kanamicina insertado, de acuerdo al esquema de la figura 4. En la figura 5 se muestran los resultados de las PCR realizadas a partir de DNA de las cepas silvestre y mutantes. Dicha figura también indica los tamaños de banda teóricos resultantes de la sustitución de cada gen, por el gen de resistencia a kanamicina, según la secuencia de *E. coli* enterohemorrágica y *E. coli* K-12. En los recuadros A, B y C de la figura 5 se observan las bandas obtenidas con las combinaciones de oligonucleótidos utilizadas en reacciones de PCR para comprobar las mutaciones en los genes *ompR*, *phoP* y *uvrY*, respectivamente. En los carriles 2 y 3 las PCR se llevaron a cabo utilizando DNA de las cepas silvestre y mutante, respectivamente, y los oligonucleótidos Up y Lo. La finalidad de esta reacción es observar la diferencia de tamaños de banda generados por el DNA silvestre y mutante (1167 pb vs. 2144 pb para la mutación en *ompR*, 1162 pb vs. 2078 pb para la mutación de *PhoP* y 1105 pb vs. 1934 pb para la mutación en *uvrY*) de acuerdo a la tabla D presentada en la figura 5. Posteriormente se presentan las reacciones realizadas con la combinación de oligonucleótidos Up/K1, usando DNA silvestre y mutante (carriles 4 y 5 respectivamente). El oligonucleótido Up hibrida en cada caso con la secuencia corriente arriba del sitio de la inserción, mientras el oligonucleótido K1 lo hace hacia el extremo 5' de la secuencia del gen de resistencia a Km insertado (figura 4). Por lo tanto con ésta reacción se observa la presencia de una banda de tamaño determinado

Figura 5



D)

Carril	DNA	Oligonucleótidos	Tamaño esperado (pb)		
			<i>ompR</i> (A)	<i>phoP</i> (B)	<i>uvrY</i> (C)
1	$\lambda$ /Hind III	-	-	-	-
2	Silvestre	Up/Lo	1167	1162	1105
3	Mutante	Up/Lo	2144	2078	1934
4	Silvestre	Up/k1	-	-	-
5	Mutante	Up/k1	760	964	962
6	Silvestre	Lo/k2	-	-	-
7	Mutante	Lo/k2	1125	1018	923
8	Silvestre	k2/kt	-	-	-
9	Mutante	k2/kt	470	470	470

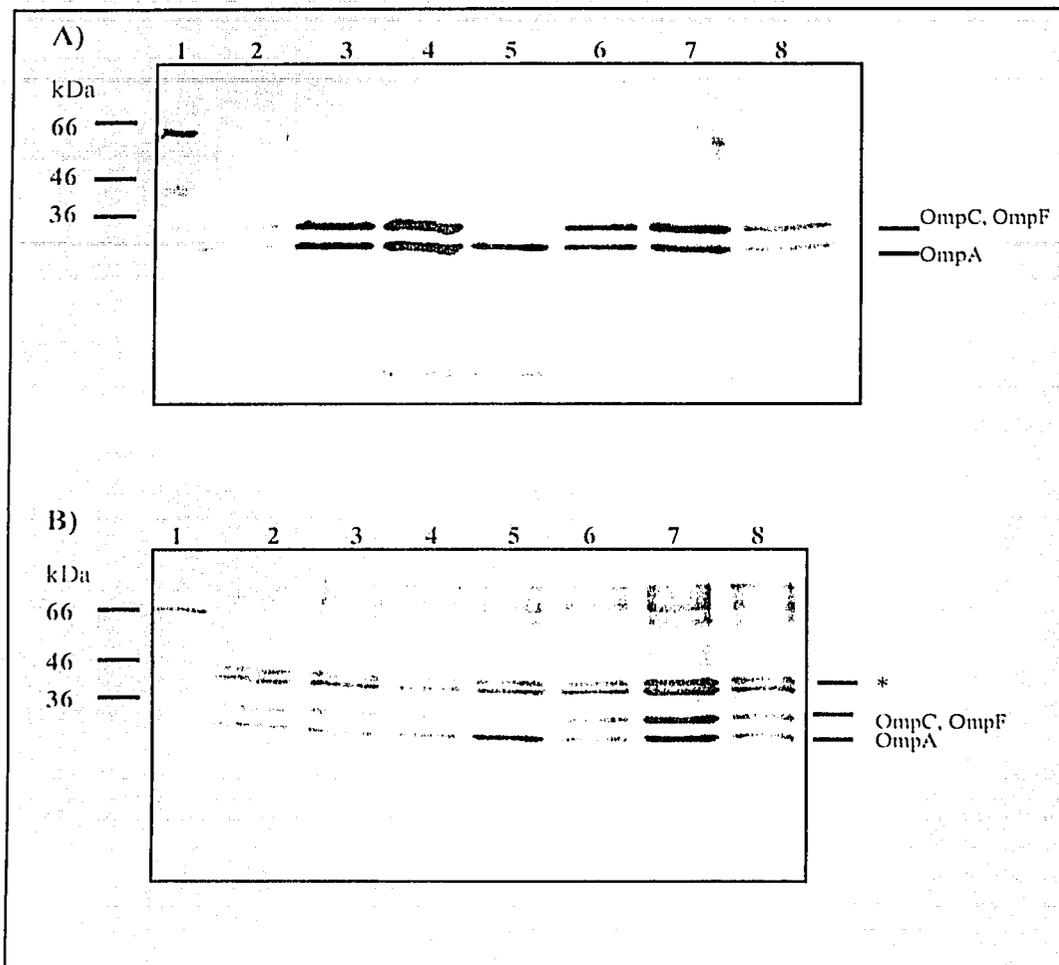
**Figura 5. Análisis de mutantes por PCR.** En esta figura se muestran los resultados de las PCR realizadas a las cepas mutantes de EPEC E2348/69  $\Delta ompR::Km$  (A),  $\Delta phoP::Km$  (B) y  $\Delta uvrY::Km$  (C), comparadas con el perfil de la cepa silvestre. Las posiciones relativas de los oligonucleótidos utilizados se indican en la figura 4, y los tamaños de producto esperados en cada reacción se enlistan en D. Brevemente, los carriles 2 y 3 muestran la diferencia en tamaño de los productos de PCR de la cepa con el gen silvestre y el de la cepa mutante con el gen sustituido por el cassette de resistencia a Km; el carril 5 muestra el producto obtenido usando los oligonucleótidos Up y K1, que representa la fusión entre la región 5' flanqueante al gen interrumpido y el cassette de resistencia a kanamicina, la cual no se observa en la cepa silvestre (carril 4), e indica la correcta sustitución del gen blanco. El producto mostrado en carril 7, obtenido con los oligonucleótidos K2 y Lo, representa la presencia de la fusión con el cassette de resistencia en la secuencia flanqueante al extremo 3' del gen interrumpido. Finalmente el producto mostrado en el carril 9 muestra la presencia del cassette de kanamicina, puesto que se obtuvo utilizando oligonucleótidos internos a la secuencia de éste (K1 y K2).

para cada mutación (760 pb para la mutación en *ompR*, 964 pb para la mutación en *phoP* y 962 pb para la mutación en *uvrY*), mientras que en la cepa silvestre no se observa ninguna banda, debido a la ausencia del gen de resistencia a Km en esas regiones. Una revisión similar pero hacia el extremo 3' de la inserción se observa en los carriles 6 y 7, utilizando los oligonucleótidos Lo/K2, con los cuales aparece una banda correspondiente al peso esperado en cada mutación (carril 7 los recuadros A, B y C de la figura 5 para las mutaciones en *ompR*, *phoP* y *uvrY*, respectivamente, y tabla D de la misma figura). El PCR realizado con oligonucleótidos internos al gen de resistencia a Km (K2 y K1, Fig. 4), produce una banda del tamaño esperado (470 pb) en todas las mutantes (carril 9, figuras 5A, 5B y 5C), sin embargo, aunque más débil, está presente también en el carril de la cepa silvestre (carril 8). Dicha banda ha sido observada con frecuencia al analizar otras mutantes en la misma cepa (Alejandra Vázquez, comunicación personal). Es posible que esta banda se deba a que los oligonucleótidos reconocen alguna secuencia inespecífica en el genoma de EPEC, ya que un análisis tipo BLAST usando la secuencia del fragmento de 470 pb del cassette

de Km contra el genoma de la cepa de EPEC E2348/69 no presentó ningún resultado positivo.

### **Preparación de porinas de membrana externa.**

En *E. coli* y *Salmonella* el sistema de dos componentes EnvZ/OmpR regula positivamente la expresión de las porinas de membrana externa OmpC y OmpF, por lo que una cepa de *E. coli* K-12 mutante nula en este sistema expresa cantidades muy reducidas de dichas proteínas (Hall y Silhavy, 1981). Para evaluar la mutación en el gen *ompR*, así como en los genes *phoP* y *uvrY*, se procedió a obtener preparaciones de proteínas de membrana externa (PME) en bacterias cultivadas tanto en medio LB como en DMEM, sin agitación y en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, hasta que alcanzaran una densidad óptica a 600 nm igual a 1.0. Como lo muestra la figura 6, las proteínas OmpC y OmpF comigran en un gel de poliacrilamida cerca de la banda de 36 kDa. Los pesos moleculares de OmpC y OmpF son 36 kDa y 37.2 kDa respectivamente (Mizuno et al, 1983), y la migración de dichas proteínas en esta región ha sido documentada previamente (Puente et al, 1995). En el panel A se muestran los extractos de proteínas de membrana externa obtenidas de bacterias cultivadas en LB. La banda correspondiente a OmpC y OmpF no está presente en el carril correspondiente a la cepa de EPEC mutante en el gen *ompR* (carril 5), y se restablece al complementar con el gen *ompR* de *Salmonella typhi* (carril 6). La banda correspondiente a la proteína OmpA no desaparece, puesto que la expresión de esta proteína no está regulada por el sistema EnvZ/OmpR. En los carriles correspondientes a las cepas de EPEC mutantes en *phoP* (carril 7), *uvrY* (carril 8) y *ler* (carril 4), y la cepa JPN15, no se observa diferencia alguna con respecto a la cepa silvestre. Ninguno de estos genes reguladores o el plásmido pEAF ha sido involucrado en la regulación de porinas. Este patrón de expresión de OmpC y OmpF es similar cuando las cepas se cultivan en DMEM (Fig. 6B); sin embargo, en estas condiciones se expresan dos proteínas de alrededor de 46 kDa (\*), en cantidades similares a OmpC, OmpF y OmpA. Asimismo, se aprecian en estas condiciones otras bandas en la región de migración por arriba de los 66 kDa. Hasta la fecha no se ha reportado en EPEC la

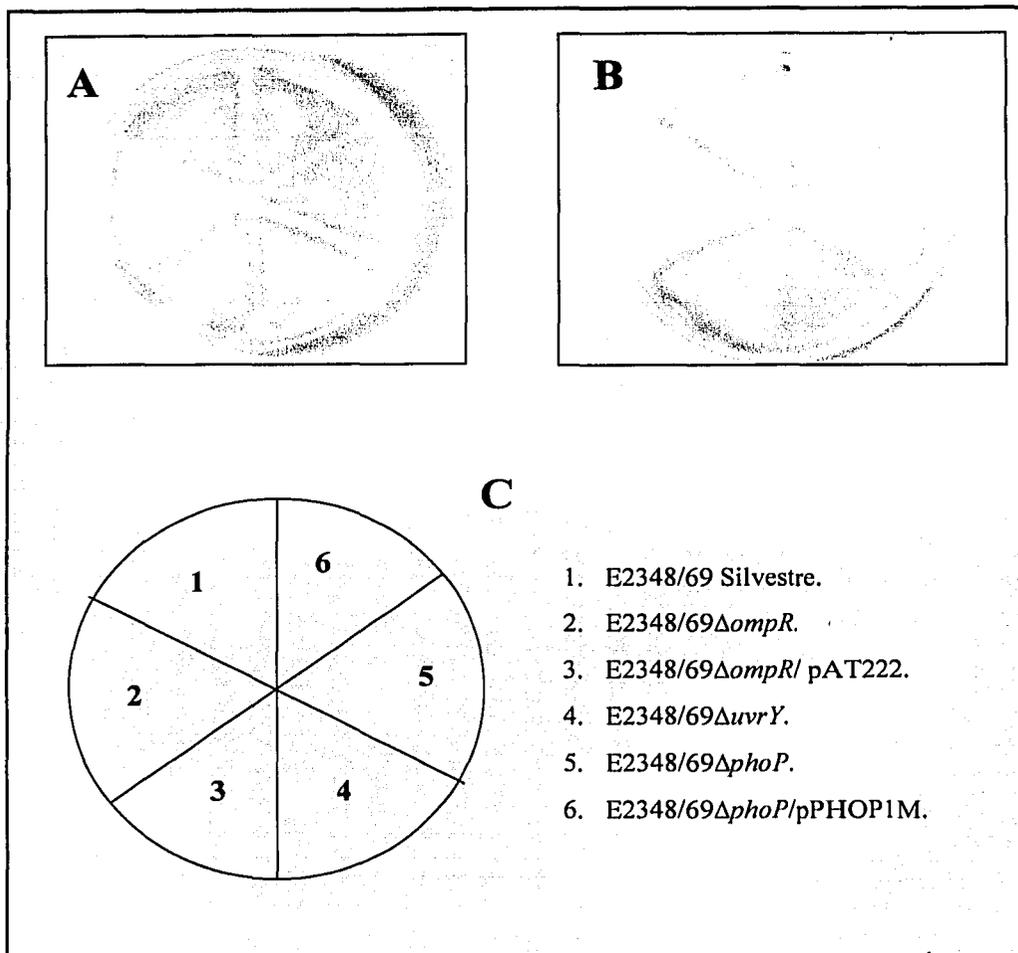


**Figura 6. Perfil de proteínas de membrana externa.** En las fotografías se muestran los perfiles electroforéticos de las proteínas de membrana externa preparadas a partir de muestras obtenidas a una D.O<sub>600</sub> igual a 1.0 de cultivos en LB (A) y DMEM (B), crecidos a 37°C, sin agitación, bajo una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. En los carriles se muestran: 1. Marcador de peso molecular (kDa); 2. EPEC E2348/69 silvestre; 3 JPN15; 4. E2348/69Δ*ler*; 5. E2348/69Δ*ompR*, 6. E2348/69Δ*ompR*/pAT224; 7. E2348/69Δ*phoP*; 8. E2348/69Δ*uvrY*. A la derecha de cada foto se indican las posiciones de OmpC, OmpF y OmpA. \*Proteínas expresadas únicamente en DMEM.

expresión adicional de porinas en condiciones donde se favorece la expresión de factores de virulencia. Estas bandas no pertenecen a componentes del sistema de secreción tipo III asociados a la membrana externa, puesto que en la cepa mutante en *ler*, la cual no expresa el SSTT (Bustamante *et al*, 2001) su expresión no se altera. Los resultados obtenidos con la extracción de porinas comprueban que *ompR*, como en *E. coli* K-12 y *Salmonella*, también es responsable de la activación de las porinas en EPEC. Por otra parte, estos resultados plantean la posibilidad de investigar la expresión de proteínas asociadas a membrana externa en EPEC ajenas al SSTT codificado en LEE bajo condiciones de inducción de virulencia (crecimiento en medio DMEM).

#### **Evaluación de crecimiento en condiciones limitantes de magnesio.**

En *S. typhimurium* el sistema PhoQ/PhoP activa la transcripción de los sistemas de transporte de magnesio *mgtA* y *mgtB*, en condiciones de bajo magnesio extracelular (Snavely *et al*, 1991; Soncini *et al*, 1996). Debido a que una mutante de *S. typhimurium* en *phoP* o *phoQ* no puede formar colonias en placas de medio mínimo N con concentraciones menores a 40  $\mu\text{M}$  de magnesio (García-Véscovi *et al*, 1996), se determinó la capacidad de las cepas mutantes obtenidas de EPEC para crecer en dichas condiciones (Fig. 7). Contrario a lo esperado, la cepa E2348/69 $\Delta$ *phoP* creció de manera similar a la silvestre en cajas con una concentración de 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{Mg}^{+2}$  (Fig. 7A, posición 5), al igual que la misma cepa complementada con *phoP* en plásmido (Fig. 7A, posición 6). La capacidad de crecer de esta cepa se mantiene incluso al agregar EDTA, un agente secuestrante de iones divalentes (Fig. 7B). Inesperadamente la cepa E2348/69 $\Delta$ *ompR* presentó una moderada disminución en el crecimiento con respecto a la cepa silvestre en medio mínimo N con 20  $\mu\text{M}$  de  $\text{Mg}^{+2}$ , y supresión completa de éste al agregar EDTA al medio (Figs. 7A y B, posición 2). El crecimiento fue restaurado al complementar la cepa mutante con el gen *ompR* clonado (Fig. 7, posición 3), sugiriendo que el sistema EnvZ/OmpR está involucrado en regular la respuesta adaptativa a condiciones limitantes de  $\text{Mg}^{+2}$ .



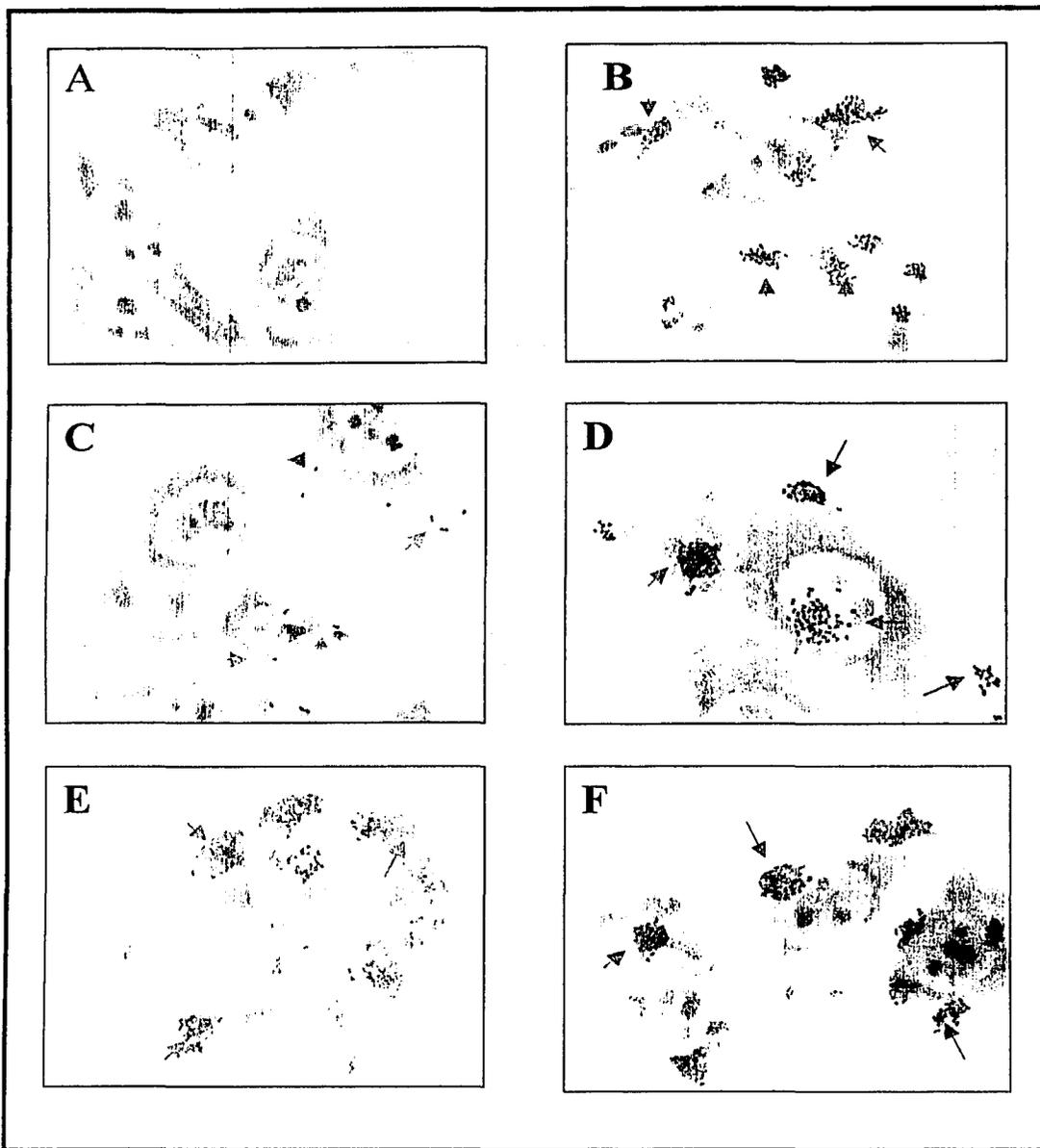
**Figura 7. *OmpR* es necesario para la adaptación de EPEC a condiciones de bajo  $Mg^{+2}$ .** La fotografía A muestra el crecimiento de las cepas en cajas de medio mínimo N con 20  $\mu M$  de magnesio. En la fotografía B el medio mínimo N con 20  $\mu M$  de magnesio contiene además 60  $\mu M$  de EDTA. El orden de las cepas sembradas está indicado en el esquema C. Las cajas se incubaron a 37°C durante aproximadamente 36 horas.

### **Ensayo de adherencia localizada (A/L).**

El ensayo de adherencia localizada se realizó inoculando una monocapa de células epiteliales HeLa con un cultivo de bacterias preinducido en DMEM. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 8. La finalidad es observar la formación de microcolonias de bacterias adheridas sobre las células HeLa, un fenotipo mediado por la fimbria BFP, codificada en el plásmido pEAF. Como control positivo se usó la cepa EPEC E2348/69 silvestre parental de las cepas mutantes (Fig. 8B), y la cepa JPN15, la cual es una cepa derivada de EPEC E2348/69 carente del plásmido pEAF (Jerse *et al*, 1990), y de la cual se espera sólo adherencia de bacterias individuales, sin la formación de microcolonias (Fig. 8C). Adicionalmente, se observan células HeLa sin infectar (Fig. 8A), usadas como control negativo. En esta figura se observa la producción de microcolonias de manera similar a la cepa silvestre por las cepas de EPEC mutantes en los genes *ompR*, *phoP* y *uvrY* (Fig. 8D, 8E y 8F respectivamente), las cuales se indican con flechas; mientras que la cepa JPN15 presenta sólo adherencia individual, puesto que al no poseer el plásmido EAF no produce la fimbria BFP.

### **Ensayo de Adherencia Íntima: Tinción Fluorescente de Actina (FAS).**

La transducción de señales iniciada por las proteínas translocadas por EPEC hacia la célula hospedera, y la interacción de Tir con la proteína intimina resultan en la polimerización de actina inmediatamente bajo la bacteria adherida, formando una estructura de pedestal (Fig. 1). Para evidenciar la formación de pedestales de actina y por lo tanto, de la adherencia íntima de EPEC con la célula epitelial, se ha desarrollado la técnica de tinción fluorescente de actina, o FAS (“Fluorescence actin staining”) (Knutton *et al*, 1989). En esta técnica se permite la visualización de la actina en una monocapa de células HeLa infectadas con EPEC. La técnica consiste en permeabilizar la preparación y marcar la actina mediante el uso de faloidina acoplada a un fluoróforo y la observación de ésta mediante microscopía de fluorescencia. La figura 9 muestra los resultados de los ensayos FAS realizados con las cepas mutantes



**Figura 8. Ensayo de adherencia localizada (A/L).** Las fotos muestran células epiteliales HeLa sin infectar (A); o infectadas con EPEC E2348/69 silvestre (B), JPN15 (C), E2349/69 $\Delta$ ompR (D), E2348/69 $\Delta$ phoP (E) y E2348/69 $\Delta$ uvrY (F). Las flechas indican las bacterias adheridas.

en los sistemas de dos componentes analizados, además de la cepa E2348/69 silvestre, y JPN15. La actina en este caso fue teñida con faloidina acoplada a flouresceína. Los puntos con concentración de señal flourescente pertenecen a acumulaciones de actina de manera localizada, que forma los pedestales inducidos por EPEC. La tinción de células HeLa sin infectar muestra la actina presente en el citoesqueleto (Fig. 9A). Al infectar las células con EPEC E2348/69 se observan conjuntos de puntos brillantes, los cuales corresponden a polímeros focalizados de actina bajo el lugar de adhesión de las bacterias. Estos puntos se concentran en grupos que corresponden a la forma localizada de adhesión inicial (microcolonias). La infección con la cepa JPN15 produce pedestales aislados, ciertamente mejor definidos (Fig. 9C), debido a que la adherencia es individual en ausencia de la fimbria BFP. La infección de la monocapa con las cepas de EPEC mutantes en *ompR* (Fig. 9D), *phoP* (Fig. 9E) y *uvrY* (Fig. 9F), produce la formación de focos de pedestales de manera muy similar a la cepa silvestre.

#### **Ensayos tipo western.**

Como una manera de evaluar el efecto de las mutaciones en los genes que codifican para los reguladores de respuesta de los sistemas de dos componentes seleccionados, en la expresión de factores de virulencia de EPEC, se realizaron ensayos tipo western con anticuerpos anti-BfpA (codificado en el plásmido pEAF); y anti-Tir y anti-EspB (codificadas en LEE). Adicionalmente se utilizaron anticuerpos contra DnaK, como control para normalizar la cantidad de proteína cargada en cada carril. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 10. El primer carril corresponde al extracto de la cepa E2348/69 silvestre, la cual, según se observa, en las condiciones probadas produce las proteínas Tir, EspB y BfpA. Como controles se usaron la cepa JPN15, carente del plásmido EAF (carril 2), y la cepa E2348/69 $\Delta$ *ler* (mutante nula en *ler*) (carril 3). La cepa JPN15 no produce la proteína BfpA, subunidad estructural de la fimbria BFP, puesto que no posee el operón *bfp*, codificado en el plásmido pEAF. Además se ve afectada de manera negativa, pero moderada, en la expresión de las proteínas EspB y Tir, lo cual concuerda con observaciones realizadas anteriormente,

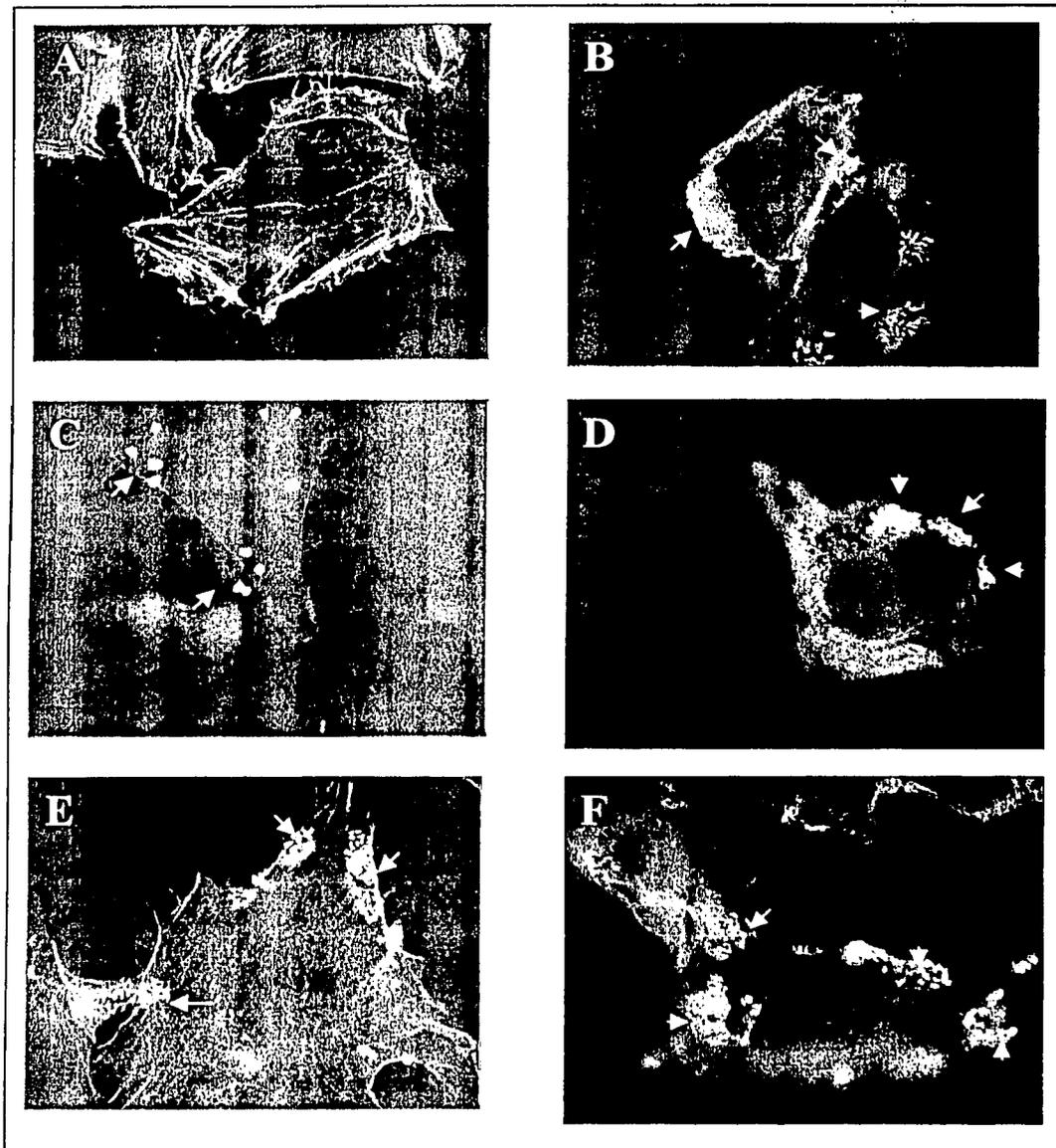
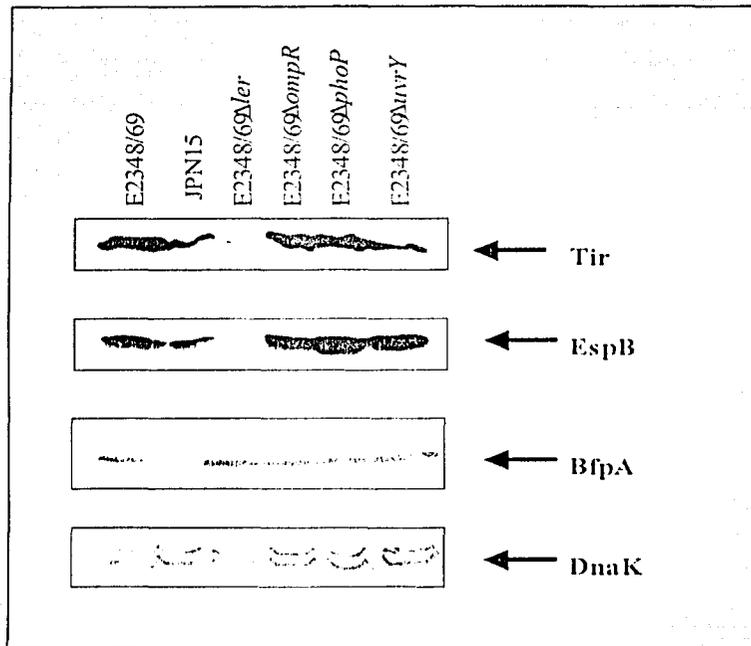


Figura 9. *OmpR*, *PhoP* y *UvrY* no son necesarios para la formación de pedestales inducidos por EPEC. Microscopía de fluorescencia de células epiteliales HeLa sin infectar (A); o infectadas con EPEC E2348/69 silvestre (B), JPN15 (C), E2348/69 $\Delta$ *ompR* (D), E2348/69 $\Delta$ *phoP* (E) y E2348/69  $\Delta$ *uvrY* (F). Las preparaciones se tiñeron con faloidina fluoresceïnada para evidenciar la actina polimerizada. Las flechas indican la presencia de pedestales.

en las que se le atribuye un papel positivo al locus *per* sobre la activación a través de *ler* de los genes codificados en el LEE (Mellies *et al*, 1999). La cepa mutante en *ler* (carril 3), expresa la proteína BfpA pero no las proteínas codificadas en el LEE Tir y EspB, lo cual confirma los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio (Bustamante *et al*, 2001). Las cepas mutantes en *ompR* (carril 4), *phoP* (carril 5) y *uvrY* (carril 6), producen las proteínas citadas de manera similar a la silvestre.



**Figura 10.** Inmunodetección tipo western con anticuerpos que reconocen factores de virulencia de EPEC. Extractos de las diferentes cepas cultivadas en DMEM a 37°C, sin agitación, en atmósfera al 5 % de CO<sub>2</sub>, fueron preparados a partir de muestras obtenidas a una D.O.<sub>600</sub> = 1.0. Después de someterlos a electroforesis en un gel de SDS-poliacrilamida al 12% se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con anticuerpos anti-Tir, anti-EspB, anti-BfpA y anti-DnaK según se indica en la figura. La cantidad de proteína en los carriles se estandarizó, y posteriormente se corroboró tiñendo la membrana de nitrocelulosa con Rojo de Ponceau.

### **Ensayo de actividad de fusiones a CAT.**

La actividad de fusiones transcripcionales de los genes *ler*, *tir* y el operón *LEE2* al gen reportero CAT en las cepas E23-48/69 silvestre y mutantes se evaluó en DMEM a 37°C con agitación. Los resultados de este ensayo a una D.O. igual a 1.0 se grafican en la figura 11. La actividad de la fusión al gen *ler* fue muy similar en todas las cepas. Sin embargo, las actividades de las fusiones de *LEE2* y *tir*, presentan una disminución en la cepa mutante en *ompR*, entre el 45 y 60%, respectivamente, con respecto a la silvestre. Las actividades observadas para ambas fusiones fueron similares en las otras dos mutantes. En resumen, estos resultados indican que los reguladores de respuesta analizados, no están involucrados en la regulación de los genes necesarios para la generación de la adherencia localizada o la lesión A/E. Queda por definir el significado de la reducción en la actividad de dos de las fusiones en el fondo *ompR*, aunque esto no parece alterar significativamente la capacidad de la cepa para producir las proteínas, así como para adherirse y producir los fenotipos estudiados.

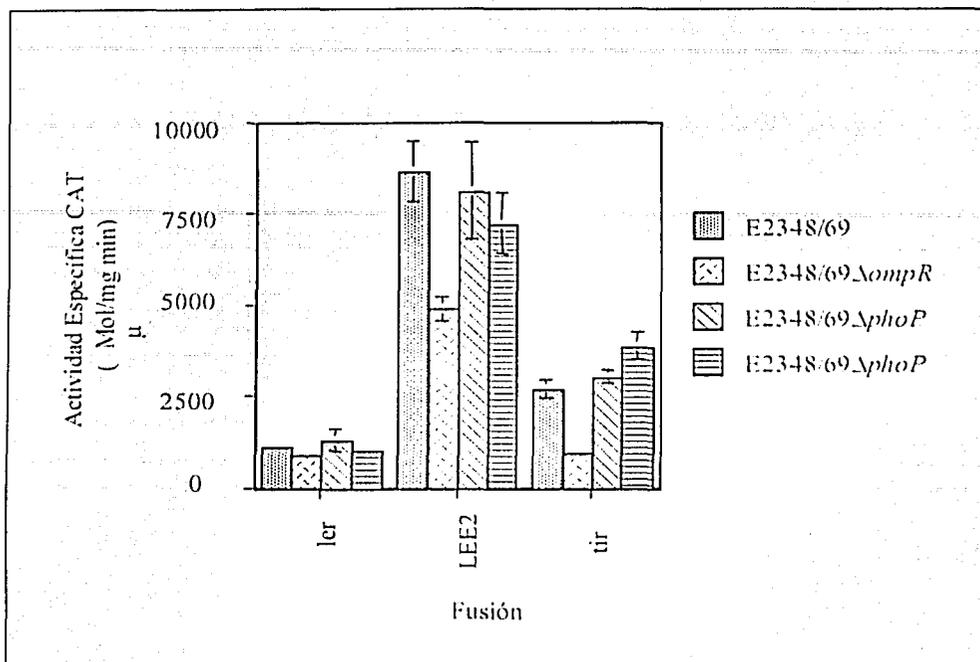


Figura 11. Actividad de fusiones transcripcionales. Resultados de la medición de las actividades transcripcionales de *ler*, *LEE2* y *tir* al gen reportero *cat*. Las cepas se cultivaron en DMEM a 37°C con agitación y se muestreó 1 ml. al alcanzar una D.O.<sub>600</sub> igual a 1.0. Los resultados mostrados son el promedio de dos ensayos.

## 6. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

### EnvZ/OmpR.

El perfil de PCR realizado con DNA de la cepa mutante en *ompR* mostrado en la figura 5A, concuerda con el esperado. Las bandas muestran la presencia del cassette de resistencia a kanamicina en el cromosoma de la cepa mutante, así como la presencia de las conjunciones entre éste y los extremos al gen interrumpido. Así mismo, el perfil de proteínas de membrana externa (Fig. 6) demuestra la reducción notable en la expresión de las porinas OmpC y OmpF tanto en medio LB como en DMEM, el cual es un comportamiento esperado para una cepa carente del gen *ompR*, puesto que es el principal activador transcripcional de dichas porinas (Hall y Silhavy, 1981). La aparición de proteínas adicionales en los extractos de las cepas cultivadas en DMEM (fig. 6B), implica la expresión de proteínas asociadas a membrana externa en condiciones de inducción de virulencia de EPEC. Estas bandas no pertenecen a elementos del SSTT expresado por EPEC en estas condiciones, puesto que una mutante en *ler*, la cual se ha demostrado deficiente en la expresión de los genes de la isla LEE, en donde se encuentra codificado dicho SSTT (Bustamante et al, 2001; Mellies et al, 1999), es capaz de producir las proteínas asociadas a membrana que aparecen en DMEM (Fig. 6B, carril -4). Dado que la expresión de estas proteínas está asociada al crecimiento en un medio semi-rico como el DMEM, y no en un medio rico como el LB, existe la posibilidad de ser requeridas para el transporte de nutrimentos no muy abundantes, pero necesarios para el crecimiento, o para la utilización de componentes únicamente presentes en DMEM. También queda por definir si estas proteínas son exclusivas de EPEC o también están presentes en otras enterobacterias patógenas o en *E. coli* K-12. En la figura 7 se demostró una deficiencia de la cepa de EPEC mutante en *ompR* para crecer en condiciones limitantes de magnesio. No existe ningún reporte hasta el momento que relacione el sistema EnvZ/OmpR con el transporte de magnesio. Sin embargo, la falta de las principales

porinas de membrana externa de alguna manera puede estar afectando la capacidad para sobrevivir en condiciones de estrés para la bacteria, limitando su tasa de transporte de metabolitos y factores importantes para el crecimiento.

El ensayo de adherencia localizada (Fig. 8), así como la tinción fluorescente de actina (Fig. 9), revelaron la capacidad de la cepa mutante en *ompR* para adherirse inicialmente en forma de microcolonias y de manera íntima induciendo pedestales de actina sobre células HeLa, de manera muy similar a la cepa de EPEC silvestre E2348/69. Los resultados obtenidos con los ensayos de adherencia son reforzados por la presencia de las proteínas Tir, EspB y BfpA en un extracto de la cepa E2348/69 $\Delta$ *ompR* en cantidades similares a las presentes en la cepa silvestre (Fig. 10, carriles 1 y 4). Sin embargo, estos resultados contrastan con los obtenidos en los ensayos de medición de la actividad de fusiones transcripcionales a CAT, en donde a pesar de que la expresión de la fusión de *ler* alcanza valores cercanos a los alcanzados en la cepa silvestre, se observa una disminución en la actividad de las fusiones del operón *LEE2* y el gen *tir*, de 43% y 65%, respectivamente, con respecto a la cepa silvestre. Sin embargo, esta disminución no afecta la capacidad de la bacteria para expresar la proteína y generar adherencia íntima. La disminución de la actividad de CAT en la cepa  $\Delta$ *ompR*, podría estar asociada a un defecto en el crecimiento de la cepa, en particular cuando porta las fusiones en plásmido (datos no mostrados). La dependencia de la expresión de fusiones de genes de virulencia de EPEC al gen reportero *cat*, con la duración de la fase exponencial y velocidad de crecimiento, ha sido documentada previamente (Puentes *et al*, 1996). De alguna manera la mutación en *ompR* predispone a la cepa a una deficiencia en el crecimiento cuando se le introduce la fusión, y este efecto pudiera ser responsable por la disminución en la expresión de las fusiones, más que un efecto directo regulador del sistema. En conjunto estos resultados indican que OmpR no juega un papel regulador específico sobre la expresión de los factores de virulencia en EPEC, tanto para los codificados en el plásmido pEAF, como los presentes en el LEE.

### PhoQ/PhoP

Aunque el sistema PhoQ/PhoP ha sido tradicionalmente asociado a la regulación transcripcional en respuesta a baja concentración de magnesio intracelular, y se ha reportado que una cepa de *S. typhimurium* es incapaz de crecer en condiciones de bajo magnesio (García-Véscovi *et al*, 1996), los resultados mostrados en la figura 7 demuestran que la cepa de EPEC mutante en el gen *phoP* es capaz de crecer en medio mínimo con bajo magnesio (Fig. 7B), y que esta capacidad se mantiene incluso después de quelar iones divalentes con EDTA (Fig. 7B). La adaptación a ambientes limitantes de magnesio mediada por PhoQ/PhoP se relaciona con la capacidad de activar la transcripción de los sistemas MgtA y MgtB de transporte de magnesio, presentes en *Salmonella*, de manera adicional al sistema CorA, el cual no es regulado por PhoQ/PhoP (Hmiel *et al*, 1989; Soncini *et al*, 1996; García-Véscovi *et al*, 1996; Snavely *et al*, 1991). Sin embargo, en el fenotipo de incapacidad de crecimiento en bajo magnesio parecerían estar involucrados otros genes aparte de *mgtA* y *mgtB*, puesto que una doble mutante *mgtA/mgtB* sigue siendo capaz de formar colonias en placas de medio mínimo con bajo magnesio (Soncini *et al*, 1996; García-Véscovi *et al*, 1996). A pesar de que el gen *mgtA* está presente en el genoma de *E. coli* K-12 y responde a variaciones en la concentración de magnesio a través de PhoP/PhoQ (Kato *et al*, 1999), el gen *mgtB* está codificado en la isla de patogenicidad SPI-3 en *Salmonella* (Blanc-Potard y Groisman, 1997), la cual es poco probable que se encuentre también en el genoma de EPEC, y no existen reportes de sensibilidad a bajo magnesio en EPEC. Soncini *et al* (1996) involucran otros genes regulados por PhoP en la incapacidad de formar colonias de *S. typhimurium* en condiciones limitantes de magnesio: *ugd*, *pbgE*, *pbgM*, *pbgN*, *pcgD* y *pcgP*, los cuales participarían en el desarrollo de este fenotipo producido por una mutante en *phoP*. Sin embargo, en estudios orientados a encontrar genes de *E. coli* regulados por la concentración de magnesio a través de PhoP/PhoQ (Kato *et al*, 1999; Minagawa *et al*, 2003), no se reporta la regulación de estos mismos genes. Es posible que algunos de estos genes no estén regulados por el sistema PhoQ/PhoP en EPEC, y por ello no se observa la deficiencia en crecimiento a bajas concentraciones de magnesio. Cabe

considerar también que EPEC pudiera contar con otros reguladores encargados de activar genes involucrados en la adaptación a condiciones limitantes de  $Mg^{+2}$ , como parecen sugerir los resultados obtenidos con OmpR.

Ninguno de los ensayos practicados con la cepa de EPEC mutante en *phoP* mostraron efecto alguno sobre la expresión de los factores de virulencia analizados en este estudio. Los ensayos de adherencia localizada e íntima no reflejaron diferencia alguna entre la cepa silvestre y la mutante en *phoP* en la capacidad para formar microcolonias y pedestales (lesión A/E en general) sobre células HeLa (Figs. 8 y 9). Asimismo, las proteínas Tir, EspB y BfpA se expresan en esta mutante en cantidades aproximadamente iguales a la cepa silvestre, como lo muestra el ensayo tipo western de la figura 10, lo cual coincide con los ensayos de actividad de la figura 11.

Un conjunto de genes regulados por el sistema PhoQ/PhoP (como *pbgP*, *pbgE* y *ugd*), son activados mediante otro sistema de dos componentes: PmrB/PmrA, el cual detecta la concentración de hierro y activa genes de resistencia a polimixina B y modificaciones en el lipopolisacárido (revisado por Groisman, 1998 y 2001). Un sistema de dos componentes que comparte homología con PmrB/PmrA en *E. coli* K-12 y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) se reportó como regulador de genes involucrados en la producción del flagelo y movilidad, respondiendo al regulador de "quorum sensing" AI-2. Sin embargo, dicho sistema, bautizado como QseC/QseB, no regula los genes del LEE presente en EHEC, los cuales responden al regulador AI-2 a través de *ler* (Sperandio *et al*, 2002a; b).

La falta de un papel como regulador de virulencia de PhoQ/PhoP en EPEC, contrasta con el papel desempeñado en *S. flexneri*, *Salmonella* y *Y. pestis*, y apoya la idea de que posiblemente juega un papel general en la regulación de genes necesarios para la sobrevivencia dentro del fagosoma en patógenos intracelulares (Groisman *et al*, 2001). Este sistema pudo evolucionar para concertar la expresión de genes de virulencia en respuesta a la concentración de  $Mg^{+2}$  en el medio, como una manera de indicar el paso hacia el ambiente intracelular, y más aún, intrafagosomal (Groisman, 1998, revisión). En este contexto, PhoQ/PhoP ha sido involucrado en la regulación de la expresión de factores de virulencia en patógenos extracelulares, como *Erwinia*

*carotovora* (Flego et al, 2000). Sin embargo, considerando que EHEC, y probablemente EPEC, poseen un poco más de 1 Mb adicional en el genoma en comparación con *E. coli* K-12 (Perna et al, 2001), no podemos descartar que este sistema regule otros genes de virulencia en EPEC aún no descritos.

#### **BarA/UvrY.**

A pesar de la noción de que el sistema BarA/UvrY controla diferentes cascadas reguladoras en muchos organismos, en el caso de EPEC no se observó ningún defecto asociado a la expresión de genes involucrados en producir la lesión A/E, y en la producción de los fenotipos de adherencia localizada y adherencia íntima (Figs. 8 y 9), puesto que la capacidad de formar microcolonias y focalizar actina en forma de pedestales en células HeLa se mantiene a niveles muy similares a la cepa silvestre. Los ensayos tipo western y de actividad de fusiones transcripcionales en las cepas silvestre y mutante en *uvrY* tampoco mostraron diferencias en la producción de las proteínas Tir, EspB y BfpA (Fig. 10), y la expresión de las fusiones de *ler*, *LEE2* y *tir* (Fig. 11). Estos resultados contrastan con los reportes que indican un papel regulador maestro de este sistema en otros patógenos como *Pseudomonas* (Heeb y Hass, 2001, revisión), *Salmonella* (Altier et al, 2000) y *Vibrio cholerae* (Wong et al, 1998). Sin embargo, como en el caso anterior, no podemos descartar la posibilidad de que regule la expresión de otros factores a la fecha no identificados.

#### **Aspectos generales.**

Los resultados generales obtenidos en este trabajo muestran claramente la ausencia de un papel de los sistemas de dos componentes OmpR/EnvZ, PhoQ/PhoP y BarA/UvrY en la regulación de los factores de virulencia de EPEC codificados en el LEE y en el plásmido pEAF, pues mutantes en los reguladores de respuesta de los tres sistemas siguen siendo capaces de producir los fenotipos de adherencia localizada e íntima, y expresar y sintetizar las proteínas asociadas a virulencia. Sin embargo, a este nivel no es posible aún descartar completamente la importancia que estos sistemas tendrían *in vivo*. Por otro lado, es muy probable que la coordinación de la expresión de

virulencia se lleve a cabo a través de otros sistemas de dos componentes, puesto que esta vía es ampliamente utilizada por bacterias patógenas para reconocer el nicho de colonización. Se ha reportado el papel del sistema QseC/QseB en la regulación de factores de virulencia en EHEC, un patógeno muy cercano a EPEC (Sperandio et al, 2002b), y hay indicios de regulación sobre los genes de LEE en EPEC por parte del sistema CpxA/CpxR, el cual responde a variaciones en el pH y proteínas con patrón de plegamiento incorrecto en periplasma (Ward y Raivio, 2002).

Existen 1387 genes en 1.34 Mb en el genoma de EHEC O157:H7 que no se encuentran en el genoma de *E. coli* K-12 (Perna et al, 2001). Entre estas secuencias han sido localizadas islas de patogenicidad, así como reguladores específicos de virulencia, como *ler* y proteínas similares a los genes de invasión *inv* de *Salmonella*, así como un SSTT adicional al codificado en el LEE (Perna et al, 2001). La secuenciación del genoma de EPEC está ya muy avanzada en el instituto Sanger ([http://sanger.ac.uk./Projects/Escherichia\\_Shigella/](http://sanger.ac.uk./Projects/Escherichia_Shigella/)). Al igual que en EHEC, se espera que exista una gran cantidad de genes cepa-específicos, entre los cuales se pudieran encontrar sistemas de dos componentes responsables de regular los factores de virulencia específicos de EPEC, que le confieran las características de adaptación a los ambientes donde coloniza, así como sus propiedades patogénicas, en respuesta a señales específicas.

Investigaciones similares a este trabajo utilizando otros sistemas de dos componentes muy probablemente tengan éxito buscando canales de comunicación entre los mecanismos que regulan virulencia en EPEC y las señales del entorno que los modulan.

## 7. PERSPECTIVAS

### **Caracterización de las proteínas de membrana externa inducidas por DMEM.**

Existen proteínas asociadas en membrana externa inducidas por el medio DMEM (Fig. 6B), las cuales no son expresadas al cultivarse EPEC en LB (Fig. 6A). La inducción de estas proteínas en condiciones de expresión de virulencia hace interesante su caracterización. Queda por verse si dichas proteínas son específicas de EPEC o son inducidas también en otras cepas enteropatógenas o no patógenas como *E. coli* K-12. La secuenciación y caracterización molecular de estas proteínas podría generar avenidas interesantes de investigación sobre la virulencia en EPEC.

### **Estudio de la respuesta a limitación de $Mg^{+2}$ a través de OmpR.**

La deficiencia en el crecimiento de la mutante en *ompR* en condiciones limitantes de magnesio (Fig. 7), indica un papel de este regulador en la respuesta adaptativa a dichas condiciones. Se requieren estudios similares a los realizados con el sistema PhoQ/PhoP (Soncini *et al.*, 1996; Kato *et al.*, 1999; Minagawa *et al.*, 2003) para detectar posibles genes regulados por OmpR, en respuesta a la concentración de magnesio.

### **Regulación de otros factores de virulencia.**

Se han detectado elementos fuera del LEE que al parecer juegan un papel en la virulencia de EPEC, tales como una isla de patogenicidad (Mellies *et al.*, 2001), y proteínas efectoras secretadas al través del SSTT codificado en LEE (Deng *et al.*, datos sometidos para publicación). Posiblemente los sistemas analizados en este trabajo pudieran estar regulando la transcripción de estos factores probablemente involucrados en otros procesos que tienen que ver con la enfermedad *in vivo*.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Altier, C., Suyemoto, M., Ruiz, A.J., Burnham, K.D., Maurer, R. (2000). Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Mol Microbiol.* **35**: 635-646.
- Balwin, T.J., Ward, W., Aitken, A. Knutton, S., Williams, P.H. (1991). Elevation of intracellular free calcium levels in Hep-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **59**: 1599-1604.
- Barnett Foster, D., Philpott, D., Abul-Milh, M., Huesca, M., Sherman, P.M., Lingwood, C.A. (1999). Phosphatidylethanolamine recognition promotes enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* host cell attachment. *Microb Pathog.* **27**: 289-301.
- Bieber, D., Ramer, S.W., Wu, C.Y., Murray, W.J., Tobe, T., Fernández, R., Schoolnik, G.K. (1998). Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* **280**: 2114-2118.
- Blanc-Potard, A.B., Groisman, E.A. (1997). The *Salmonella selC* locus contains a pathogenicity island mediating intramacrophage survival. *EMBO J.* **16**: 5376-5385.
- Blumer, C., Heeb, S., Pessi, G., Haas, D. (1999). Global GacA-steered control of cyanide and exoprotease production in *Pseudomonas fluorescens* involves specific ribosome binding sites. *Proc Natl Acad Sci.* **96**: 14073-14078.
- Bustamante, V.H., Calva, E., Puente, J.L. (1998). Analysis of cis-acting elements required for *bfpA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **180**: 3013-3016.
- 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.
- Campellone, K.G., Giese, A., Tipper, D.J., Leong, J.M. (2002). A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli*

- Tir binds the host adaptator protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. *Mol Microbiol.* **43**: 1227-1241.
- Chamnongpol, S. y Groisman, E.A. (2002). Mg<sup>2+</sup> homeostasis and avoidance of metal toxicity. *Mol Microbiol.* **44**: 561-571.
- Chang, C. y Stewart, R. (1998). The two-component System. Regulation of diverse signaling pathways in prokaryotes y eukariotes. *Plant Physiol.* **117**: 723-731.
- Crane, J.K. y Oh, J.S. (1997). Activation of host cell protein kinase C by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **65**: 3277-3285.
- Cravioto, A., Gross, R., Scotland, S., Rowe, B. (1979). An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* **3**: 95-99.
- Datsenko, K.A. y Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci.* **97**: 6640-6645.
- Deng, W., Puente, J.L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B.A., Vázquez, A., Barba, J., Ibarra, J.A., O'Donell, P., Metalnikov, P., Ashman, K., Lee, S., Finlay, B.B. (2003). Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenesis island.
- Detweiler, C.S., Cumanan, D.B., Falkow, S. (2001). Host microarray analysis reveals a role for the *Salmonella* response regulator *phoP* in human macrofage cell death. *Proc Natl Acad Sci.* **98**: 5850-5855.
- Donnenberg, M.S. y Kaper, J.B., 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, **60**: 3953-3961.
- Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., Finlay, B.B. (1997). Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cell. *Trends Microbiol* **5**: 109-114.
- Dziejman, M. y Mekalanos, J.J. (1995). Two-component signal transduction and its role in the expression of bacterial virulence factors. En: Two-component signal transduction. Editado por Hoch, J.A y Silhavy, T.J. Washington, D.C. EUA. 305-318.

- Edwards, R.A. y Puente, J.L. (1998). Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *Trends Microbiol.* **6**: 282-287.
- Elliott, S.J., Sperandio, V., Girón, J.A., Shin, S., Mellies, J., Wainwright, L., Hutcheson, S.W., McDaniel, T.K., Kaper, J.B. (2000). The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator control expression of both LEE and Non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **68**: 6115-6126.
- Elliot, S.J., Krejany, E.O., Mellies, J.L, Robins-Browne, R.M., Sasakawa, C., Kaper, J.B. (2001). EspG, a novel type III system-secreted protein from enteropathogenic *Escherichia coli* with similarities to VirA of *Shigella flexneri*. *Infect Immun.* **69**: 4027-4033.
- Eriksson, A.R.B., Andersson, R.A., Pirhonen, M., Palva, E.T. (1998). Two-component regulators involved in the global control of virulence in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol Plant-Microbe Interac.* **11**: 743-752.
- Ernst, R.K., Guina, T., Miller, S.I. (2001). How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote host innate immune responses. *J Infect Dis.* **179**: S326-S330.
- Fernández-Mora, M., Oropeza, R., Puente, J.L., Calva, E. (1995). Isolation and characterization of *ompS1*, a novel *Salmonella typhi* outer membrane protein-encoding gene. *Gene.* **158**: 67-72.
- Fields, P.I., Groisman, E.A., Heffron, F. (1989). A *Salmonella* locus that controls resistance to antimicrobial proteins from phagocytic cells. *Science.* **243**: 1059-1062.
- Flego, D., Marits, R., Eriksson, A.R.B., Koiv, V., Karlsson, M.B., Heikinheimo, R., Palva, T. (2000). A two-component regulatory system, *pehR-pehS*, controls endopolygalacturonase production and virulence in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Mol Plant-Microbe Interac.* **13**: 447-455.
- Foubister, V., Rosenshine, I., Finlay, B.B. (1994). A diarrheal pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) triggers a flux of inositol phosphates in infected epithelial cells. *J Exp Med* **179**: 993-998.

- Friedberg, D., Umanski, T., Fang, Y., Rosenshine, I. (1999). Hierarchy in the expresion of the locus onf enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **34**: 941-952.
- García-Véscovi, E., Soncini, F.C., Groisman, E.A. (1996). Mg<sup>2+</sup> as an extracellular signal: environmental regulation of *Salmonella* virulence. *Cell.* **84**: 165-174.
- Girón, J.A., Ho, A.S.Y., Schoolnik, G.K. (1991). An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* **254**: 710-713.
- Goldberg, M.D., Johnson, M., Hinton, J.C., Williams, P.H., (2001). Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **41**: 549-559.
- Gómez-Duarte, O.G. y Kaper, J.B. (1995). A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **63**: 1767-1776.
- Grant, J.A., Farris, M., Alefounder, P., Williams, P.H., Woodward, M.J., O'Connor, D.C. (2003). Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Mol Microbiol.* **48**: 507-521.
- Groisman, E.A. (1998). The ins and outs of virulence gene expression: Mg<sup>2+</sup>, as a regulatory signal. *BioEssays.* **20**: 96-101.
- Groisman, E.A. (2001). The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. *J Bact.* **183**: 1835-1842.
- Groisman, E.A. y Heffron, F. (1995). Regulation of *Salmonella* virulence by two-component regulatory systems. En: Two-component signal transduction. Editores: Hoch, J.A. y Silhavy, T.J. *ASM Press.* 319-332.
- Gruenheid, S., DeVinney, R., Bladt, F., Goosney, D., Gelkop, S., Gish, D., Pawson, T., Finlay, B.B. (2001). Enteropathogenic *E. coli* binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nat Cell Biol* **3**: 856-859.
- Haack, K.R., Robinson, C.L., Miller, K.J., Fowlkes, J.W., Mellies, J.L. (2003). Interaction of Ler at the LEE5 (*tir*) operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Inf Immun.* **71**: 384-392.

- Hall, M.N. y Silhavy, T.J. (1981). The *ompB* locus and the regulation of the mayor outer membrane porin proteins of *Escherichia coli* K-12. *J Mol Biol.* **146**: 23-43.
- Heeb, S. y Hass, D. (2001). Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *MPMII.* **14**: 1351-1363.
- Hmiel, S.P., Snavey, M.D., Florer, J.B., Maguire, M.E., Miller, C.G. (1989). Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*: genetic characterization and cloning of three magnesium transport loci. *J Bacteriol.* **171**: 4742-4751.
- Ibarra, J.A. (2003). Caracterización de los sitios de unión del activador transcripcional PerA en los genes *bfpA* y *perA* de *Escherichia coli* enteropatógena. Tesis de Doctorado. UNAM.
- Ibarra, J.A., Villalba, M.I., Puente, J.L. (2003). Identification of the DNA binding sites of PerA, the transcriptional activator of the *bfp* and *per* operons in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **185**: 2835-2847.
- Jarvis, K.G., Giron, 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.* **92**: 7996-8000.
- Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D., Kaper, J.B. (1990). A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7839-7843.
- Johnston, c., Pegues, D.A., Hueck, C.J. Lee, C.A., Miller, S.I. (1996). Transcriptional activation of *Salmonella typhimurium* invasion genes by a member of the phosphorylated response-regulator superfamily. *Mol Microbiol.* **22**: 715-727.
- Kalman, D., Weiner, O.D., Goosney, D.L., Sedat, J.W., Finlay, B.B., Abo, A., Bishop, J.M. (1999). Enteropathogenic *Escherichia coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. *Nat Cell Biol.* **1**: 389-391.
- Kasahara, M., Nakata, A., Shinagawa, H. (1992). Molecular analysis of the *Escherichia coli* *phoP-phoQ* operon. *J Bact.* **174**: 492-498.

- Kato, A., Tanabe, H., Utsumi, R. (1999). Molecular characterization of the PhoP-PhoQ two-component system in *Escherichia coli* K-12: identification of extracellular Mg<sup>2+</sup> responsive promoters. *J Bacteriol.* **181**: 5516-5520.
- Kenny, B. y Finlay, B.B. (1997). Intimin-dependent binding of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase C- $\gamma$ 1. *Infect Immun.* **65**: 2528-2536.
- 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. *Infec Immun.* **65**: 2606-2612.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, 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.
- Kenny, B., Ellis, S., Leard, A. D., Warawa, J., Mellor, H., Jepson, M.A. (2002). Coordinate regulation of distinct host cell signaling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. *Mol Microbiol.* **44**: 1095-1107.
- Kenny, B. (2002). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) – a crafty subversive little bug. *Microbiol.* **148**: 1967-1978.
- Khursigara, C., Abul-Milh, M., Lau, B., Giron, J.A., Lingwood, C.A., Foster, D.E. (2001). Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence factor bundle forming pilus has a binding specificity for phophatydilethanolamine. *Infect Immun.* **69**: 6573-6579.
- Knutton, S., Baldwin, T., Williams, P.H., McNeish, A.S. (1989). Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun.*, **57**: 1290-1298.
- Lee, A.K., Detweiler, C.S., Falkow, S. (2000). OmpR regulates the two-component system SsrA-SsrB in *Salmonella* pathogenicity island 2. *J. Bacteriol.* **182**: 771-781.

- 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 causes diarrhoea but do not produce heat-labile or heat stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet*. **1**:1119-1122.
- Levine, M.M. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* **155**: 377-389.
- Lindgren, S.W., Stojiljkovic, Heffron, F. (1996). Macrophage killing is an essential virulence mechanism of *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci*. **93**: 4197-4201.
- Lucas, R.L. y Lee, C.A. (2000). Unravelling the mysteries of virulence gene regulation in *Salmonella typhimurium*. *Mol microbiol*. **36**: 1024-1033.
- Mizuno, T., Chou, M., Inouye, M. (1983). A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer membrane. *J Biol Chem*. **258**: 6932-6940.
- Manjarrez-Hernández, H.A., Baldwin, H.A., Aitken, A., Knutton, S., Williams, P.H. (1992). Intestinal epithelial cell protein phosphorylation in enteropathogenic *Escherichia coli* diarrhoea. *Lancet*. **339**:521-532.
- Martinez-Laguna, Y., Calva, E., Puente, J.L. (1999). Autoactivation and environmental regulation of *blpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bpfA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. **33**: 153-166.
- McNamara, B.P., Koutsouris, A., O'Connell, C.B., Nougayrede, J.P., Donnenberg, M.S., Hecht, G. (2001). Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *J Clin Invest*. **107**: 621-629.
- Mellies, J.L., Elliot, S.J., Sperandio, V., Donnenberg, M.S., Michael, 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., Navarro-García, F., Okeke, I., Frederickson, J., Nataro, J.P., Kaper, J.B. (2001). *espC* Pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. *Infect Immun.* **69**: 315-324.
- Minagawa, S., Ogasawara, H., Kato, A., Yamamoto, K., Eguchi, Y., Oshima, T., Mori, H., Ishihama, A., Utsumi, R. (2003). Identification and molecular characterization of the Mg<sup>2+</sup> stimulon of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **185**: 3696-3702.
- Mizuno, T., Chou, M.Y., Inouye, M. (1983). A comparative study on the genes for three porins of the *Escherichia coli* outer membrane. DNA sequence of the osmoregulated *ompC* gene. *J Biol Chem.* **258**: 6932-6940.
- Mizuno, T. (1997). Compilation of all genes encoding two-component phosphotransfer signal transducers in the genome of *Escherichia coli*. *DNA Res.* **4**: 161-168.
- Moss, J.E., Fisher, P.E., Vick, E.A., Groisman, E.A., Zychlinsky. (2001). The regulatory protein PhoP controls the resolution of *Shigella flexneri* infections. *Cell Microbiol.* **2**: 443-452.
- Nataro, J.P. y Kaper, J. B. (1998). Diarrheogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201.
- Oka, A., Sakai, H., Iwakoshi, S. (2002). His-Asp phosphorelay signal transduction in higher plants: receptors and response regulators for cytokinin signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Genes Genet Syst.* **77**: 383-391.
- Oropoza, R., Sampieri, C.L., Puente, J.L., Calva, E. (1999). Negative and positive regulation of the non-osmoregulated *ompS1* porin gene in *Salmonella typhi*: a novel regulatory mechanism that involves OmpR. *Mol Microbiol.* **32**: 243-252.
- Oshima, T., Aiba, H., Masuda, Y., Kanaya, S., Sugiura, M., Wanner, B.L., Mori, H., Mizuno, T. (2002). Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol.* **46**: 281-291.
- Oyston, P.C.F., Dorrell, N., Williams, D., Li, S.R., Green, M., Titball, R.W., Wren, B.W. (2000). The response regulator PhoP is important for under conditions of

- macrophage-induced stress and virulence in *Yersinia pestis*. *Infect Immun.* **68**: 3419-3425.
- Parkins, M.D., Ceri, H., Storey, D.G. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* GacA, a factor in multihost virulence, is also essential for biofilm formation. *Mol Microbiol.* **40**: 1215-1226.
- Perna, N.T., Plunkett III, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Pósfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamouisis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A., Blattner, F.R. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature.* **409**: 529-533.
- Pernesting, A.K., Melefors, O., Georgellis, D. (2001). Identification of UvrY as the cognate regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **276**: 225-231.
- Pernesting, A.K., Georgellis, D., Romeo, T., Suzuki, K., Tomenius, H., Normark, S., Melefors, O. (2003). The *Escherichia coli* BarA/UvrY two-component system is needed for efficient switching between glycolytic and gluconeogenic carbon sources. *J Bacteriol.* **185**: 843-853.
- Pratt, L.A. y Silhavy, T.J. (1995). Porin regulon of *Escherichia coli*. En: Two-component signal transduction. Editores: Hoch, J.A. y Silhavy, T.J. ASM Press. 105-127.
- Puente, J.L., Juárez, D., Bobadilla, M., Arias, C.F., Calva, E. (1995). The *Salmonella ompC* gene: structure and use as a carrier for heterologous secuencias. *Gene.* **156**: 1-9.
- Puente, J.L., Bieber, D., Ramer, S.W., Murray, W., Schoolnik, G.K. (1996). The bundle forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol.* **20**: 87-100.
- Puente, J.L. y Finlay, B. B. (2001). Pathogenic *Echerichia coli*. En: Principles of bacterial pathogenesis. E. A. Groissman, editor. *Academic Press.* 717-743.

- Ramer, S.W., Schoolnik, G.K., Wu, C.Y., Hwang, J., Schmidt, S.A., Bieber, D. (2002). The type IV pilus assembly complex: biogenic interactions among the bundle forming pilus proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bact.* **184**: 3457-3465.
- Reimmann, C., Beyeler, M., Latifi, A., Winteler, H., Foglino, M., Lazdunski, A., Haas, D. (1997). The global activator GacA of *Pseudomonas aeruginosa* PAO positively controls the production of the autoinducer *N*-butyryl-homoserine lactone and the formation of the virulence factors pyocyanin, cyanide, and lipase. *Mol Microbiol.* **24**: 309-319.
- Rosenshine, I., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., Finlay, B.B. (1992). Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cells proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacteria uptake. *EMBO J.* **11**: 3551-3560.
- Rothbaum, R., McAdams, A.J., Gianella, R., Partin, J.C. (1982). A clinicopathologic study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhoea of infants. *Gastroenterology*, **83**: 441-454.
- Sánchez-Sanmartín, C., Bustamante, V., Calva, E., Puente, J.L. (2001). Transcriptional regulation of the *orf19*, *tir*, *cestY* and *cae* genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **183**: 2823-2833.
- Savkovic, S.D., Koutsouris, A., Hecht, G. (1997). Activation of NF- $\kappa$ B in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Am J Physiol.* **273**: C1160-C1167.
- Schwan, W.R., Lee, J.L., Lenard, F.A., Matthews, B.T., Beck, M.T. (2002). Osmolarity and pH growth conditions regulate *fim* gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **70**: 1391-1402.
- Shin, S., Castanie-Cornet, M.P., Crawford, J.A., Brinkley, C., Kaper, J.B. (2001). An activator of glutamate decarboxylase genes regulate the expresion of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes through control of the plamsid-encoded regulator, Per. *Mol Microbiol.* **41**: 1133-1150.

- Snavely, M.D., Gravina, S.A., Cheung, T.T., Miller, C.G., Maguire, M.E. (1991). Magnesium transport in *Salmonella typhimurium*. *J Biol Chem.* **266**: 824-829.
- Sohel, I., Puente, J.L., Ramer, S.W., Bieber, D., Wu, C.Y., Schoolnik, G.K. (1996). Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J Bacteriol.* **178**: 2613-2628.
- Soncini, F.C., García-Véscovi, E., Solomon, F., Groisman, E.A. (1996). Molecular basis of the magnesium deprivation response in *Salmonella typhimurium*: identification of PhoP-regulated genes. *J Bacteriol.* **178**: 5092-5099.
- Sperandio, V., Caiyi, C., Kaper, J.B., (2002a). Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. *Inf Immun* **70**: 3085-3093.
- Sperandio, V., Torres, A.G., Kaper, J.B. (2002b). Quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC): a novel two-component regulatory system involved in the regulation of flagella and motility by quorum sensing in *E. coli*. *Mol Microbiol.* **43**: 809-821.
- Stone, KD, Zhang, H.Z., Carlson, L.K., Donnenberg, M.S. (1996). A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli*, is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Mol Microbiol.* **20**: 325-337.
- Taylor, C.J., A. Hart, R., Batt, M., McDougall, C., McLean, L. (1986). Ultrastructural and biochemical changes in human jejunal mucosa associated with enteropathogenic *E. coli* (O111) infection. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **5**: 70-73.
- Taylor, K.A., Luther, P.W., Donnenberg, M.S. (1999). Expression of the EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology. *Infect Immun.* **67**: 120-125.
- Tobe, T., Schoolnik, G.K., Soheli, I., Bustamante, V.H., Puente, J.L. (1996). Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **21**: 963-975.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

- Tobe, T., Hayashi, T., Han, C.G., Schoolnik, G.K., Ohtsubo, E., Sasakawa, C. (1999). Complete DNA sequence and Structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. *Infec Immun* **67**: 5455-5462.
- Tu, X., Nisan, I., Yona, C., Hanski, E., Rosenshine, I. (2003). EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **47**: 595-606.
- Van Der Velden, A.W.M., Lindgren, S.W., Worley, M.J., Hefron, F. (2000). *Salmonella* pathogenicity island 1-independent induction of apoptosis in infected macrophages by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Infec Immun.* **68**: 5702-5709.
- Vuopio-Varkila, J. y Schoolnik, G. K. (1991). Localized adherence by enteropathogenic *Escherichia coli* is an inducible phenotype associate with the expression of new outer membrane proteins. *J Exp Med* **174**: 1167-1177.
- Wachter, C., Beinke, M., Mattes, M. Schmidt, M.A. (1999). Insertion of EspD into epithelial target cell membranes by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol microbiol.* **31**: 1695-1707.
- Ward, J.D., Raivio, T.L. (2002). The role of the Cpx two component regulatory system in enteropathogenic *Escherichia coli* virulence. 102 American Society for Microbiology General Meeting. Presentation number: B-353. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- West, A.H. y Stock, A.M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trens Biochem Sci.* **26**: 369-376.
- Wong, S.M., Carroll, P.A., Rahme, L.G., Ausubel, F.M., Calderwood, S.B. (1998). Modulation of expression of the ToxR regulón in *Vibrio cholerae* by a member of the two-component family of response regulators. *Infec Immun.* **66**: 5854-5861.