



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL  
GEN *espC* DE *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

VERÓNICA IRANZÚ MARTÍNEZ SANTOS

Director de tesis: Dr. José Luis Puente García



2004



FACULTAD DE CIENCIAS  
SECCION ESCOLAR

---

---



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.



UNIVERSIDAD DE VALPARAISO  
VALPARAISO  
1950

**ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ**  
**Jefe de la División de Estudios Profesionales de la**  
**Facultad de Ciencias**  
**Presente**

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Estudio de la regulación transcripcional del gen espC de Escherichia coli enteropatógena"

realizado por Verónica Irazú Martínez Santos

con número de cuenta 09710269-6 , quien cubrió los créditos de la carrera de:

. Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dr. José Luis Puente García

Propietario Dr. José Antonio Ibarra García

Propietario Dra. Patricia Ileana Joseph Bravo

Suplente Dr. Enrique Merino Pérez

Suplente Dr. Juan Mauricio Téllez Sosa

Consejo Departamental de Biología FACULTAD DE CIENCIAS

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en Cuernavaca, Morelos, México, en el laboratorio de los doctores José Luis Puente García y Edmundo Calva Mercado, bajo la asesoría del Dr. José Luis Puente García.

Durante la realización del trabajo se me proporcionó una beca de alimentación y hospedaje otorgada por el Instituto de Biotecnología de enero a diciembre del 2003, así como una beca de DGAPA (Proyecto No. IN201703-3) de enero a junio del 2004.

## DEDICATORIAS

A mi mamá, mi papá y mi hermano, que siempre han estado conmigo, me han soportado y me han apoyado en todo lo que he hecho; a mis "niñas" Coquis<sup>†</sup>, Bola y Camila, que son parte de la familia. Los quiero mucho.

A mi abuelita, que siempre me dio buenos consejos. Te extraño.

A Diosito por permitirme cumplir una de mis metas.

## AGRADECIMIENTOS

A mis papás y mi hermano por estar siempre conmigo y ayudarme a elegir carrera, sin ustedes esto no habría sido posible. A mi mamá por compartir conmigo noches en vela estudiando.

A los Drs. José Luis Puente y Edmundo Calva por haberme aceptado en su laboratorio. En particular, quiero agradecer al Dr. José Luis Puente por haber dirigido mi tesis, por su paciencia y apoyo en momentos de crisis y frustraciones. Al Dr. Edmundo Calva por haberle dedicado parte de su tiempo a la revisión de la tesis, aún cuando no le tocaba. A los EPECos, EHECos, Citrobactos, Salmonelos y anexos: Panchukis, Alma, Ale, Marcos, Jenny, Ulises, Cristina, Diana, Myriam, Juan, Tomás, Toño, Mario A., Carmen, Miguel Ángel, Ricardo, Olivia, Karol, Víctor B., Víctor A., Betty y Norma por su amistad. A Ale Vázquez por compartir su mesa de trabajo conmigo y darme mis primeras enseñanzas en el trabajo de laboratorio. A Jenny, Toño, Mario A., Karol, Diana, Alma y Myriam por haberme dedicado parte de su tiempo para enseñarme a hacer los experimentos. A Víctor A. por haberme regalado un poco de sus oligos, con los cuales empezó el proyecto. A Marcos por sus "tips" para mejorar algunos experimentos. A las otras integrantes del laboratorio: Amapola y Rosalva por su amistad y ayuda para resolver algunos problemillas, y a Elvira y Paty por su paciencia y colaboración en la preparación de material.

A mis amigos de la facultad, en especial a la "Tropa Goofy": el 'apá Emmanuelle, la 'amá Dalia, y las "hijas" Laura y Nancy por haberme brindado su amistad, por haber compartido muchos momentos alegres en la facultad y en las prácticas de campo, por haberme apoyado y ayudado con las clases, exámenes y tareas. A Karen por ser mi amiga desde la prepa.

A los compañeros del taller: Nancy, Idalia, Alma, Margarito, Alejandro, Mayra, Eria, Ingrid, Rebeca y Olga por su amistad.

A mis sinodales, los Drs. José Luis Puente, José Antonio Ibarra, Patricia Joseph, Juan Téllez y Enrique Merino por la revisión de la tesis.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE.....	i
LISTA DE ABREVIATURAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
LISTA DE TABLAS.....	v
RESUMEN.....	vi
I. INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 <i>Escherichia coli</i> .....	1
I.2 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena.....	4
I.3 Mecanismo de diarrea.....	4
I.4 Modelo de patogénesis.....	6
I.5 Locus de eliminación de enterocitos (LEE).....	8
I.6 El plásmido EAF.....	9
I.7 Mecanismo de regulación.....	10
II. ANTECEDENTES.....	14
III. HIPÓTESIS.....	17
IV. OBJETIVOS.....	18
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
VI. RESULTADOS.....	30
VII. DISCUSIÓN.....	51
VIII. CONCLUSIONES.....	56
IX. PERSPECTIVAS.....	57
X. BIBLIOGRAFÍA.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A</b>	Adenina
<b>AE</b>	Adherencia y eliminación de microvellosidades
<b>Amp</b>	Ampicilina
<b>Arp2/3</b>	Complejo de 7 proteínas, de las cuales Arp2 y Arp3 son similares a actina
<b>BFP</b>	Pilus formador de haces (por sus siglas en inglés)
<b>C</b>	Citosina
<b>°C</b>	Grados centígrados
<b>Ca</b>	Calcio
<b>CAT</b>	Enzima cloranfenicol acetil transferasa
<b>Cm</b>	Cloranfenicol
<b>DEPC</b>	Dietil pirocarbonato
<b>DMEM</b>	Medio de cultivo para células eucariontes tipo Eagle modificado por Dulbecco (por sus siglas en inglés)
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DTNB</b>	Ditio-bis (2-ácido nitrobenzónico)
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EAF</b>	Factor de adherencia de EPEC (por sus siglas en inglés)
<b>EMSA</b>	Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (por sus siglas en inglés)
<b>Esp</b>	Proteína secretada por EPEC (por sus siglas en inglés)
<b>et al</b>	Y colaboradores
<b>G</b>	Guanina
<b>HRP</b>	Enzima peroxidasa de rábano (por sus siglas en inglés)
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A
<b>kb</b>	Kilobases
<b>kDa</b>	Kilodaltones
<b>Km</b>	Kanamicina
<b>LA</b>	Fenotipo de adherencia localizada (por sus siglas en inglés)
<b>LB</b>	Medio de cultivo tipo Luria (por sus siglas en inglés)
<b>M</b>	Molar
<b>MDa</b>	Mega Daltones

<b>mg</b>	Miligramos
<b>μg</b>	Microgramos
<b>ml</b>	Mililitros
<b>μl</b>	Microlitros
<b>μM</b>	Micromolar
<b>μm</b>	Micrómetro
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>ORF</b>	Marco de lectura abierto (por sus siglas en inglés)
<b><sup>32</sup>-P</b>	Fósforo 32 radioactivo
<b>PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida (por sus siglas en inglés)
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBS</b>	Regulador salino de fosfatos (por sus siglas en inglés)
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)
<b>PKC</b>	Proteín cinasa C
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>seg</b>	Segundos
<b>Sm</b>	Estreptomicina
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio (por sus siglas en inglés)
<b>T</b>	Timina
<b>TBS</b>	Solución salina de tris boratos (por sus siglas en inglés)
<b>Tc</b>	Tetraciclina
<b>Tir</b>	Receptor translocado de intimina (por sus siglas en inglés)
<b>V</b>	Volts
<b>W</b>	Watts
<b>wt</b>	Cepa silvestre

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Modelo de los probables mecanismos de la diarrea producida por EPEC.....	5
<b>Figura 2.</b> Modelo de patogénesis de EPEC.....	8
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de la isla de patogenicidad LEE.....	9
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática del plásmido EAF.....	10
<b>Figura 5.</b> Regulación de genes de virulencia en EPEC.....	13
<b>Figura 6.</b> Mapa genético de la isla de patogenicidad <i>espC</i> .....	14
<b>Figura 7.</b> Modelo del mecanismo de secreción de autotransportadores (tipo V).....	16
<b>Figura 8.</b> Experimento de "primer extension".....	31
<b>Figura 9.</b> Esquema de las fusiones construidas entre la región reguladora de <i>espC</i> y el gen reportero <i>cat</i> .....	32
<b>Figura 10.</b> Curva de actividad de la cepa E2348/69 transformada con las fusiones <i>espC</i> - 401 y <i>espC</i> -58.....	34
<b>Figura 11.</b> Actividad de las cepas EPEC silvestre, $\Delta ler$ y $\Delta hns$ transformadas con todas las fusiones.....	36
<b>Figura 12.</b> Actividad de las cepas de <i>E. coli</i> MC4100 silvestre y $\Delta hns$ transformadas con todas las fusiones en.....	40
<b>Figura 13.</b> Representación esquemática de las regiones necesarias para la regulación de <i>espC</i> .....	42
<b>Figura 14.</b> Actividad de las cepas EPEC silvestre, $\Delta ler$ y $\Delta hns$ , MC4100 silvestre y $\Delta hns$ transformadas con algunas fusiones en LB.....	44

Figura 15. “Western blot” para detectar EspC.....	45
Figura 16. Ensayos de complementación en la cepa de <i>E. coli</i> MC4100.....	46
Figura 17. Ensayo de retardamiento en gel (EMSA) de la región reguladora de <i>espC</i> con H-NS.....	47
Figura 18. Ensayo de retardamiento en gel (EMSA) de la región reguladora de <i>espC</i> con Ler.....	48
Figura 19. Ensayo de protección a DNasa I de la región reguladora de <i>espC</i> .....	50

## LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Cepas de <i>E. coli</i> patógenas para humanos.....	3
Tabla 2. Serotipos característicos de EPEC.....	4
Tabla 3. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.....	19
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	21
Tabla 5. Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en este trabajo.....	28
Tabla 6. Actividades de las fusiones de <i>espC</i> en las distintas cepas.....	41

## RESUMEN

*Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) es una bacteria patógena extracelular Gram negativa. Es el agente etiológico predominante de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, afectando principalmente a niños menores de seis meses. A pesar de que aún no se conoce completamente su mecanismo de patogenicidad, el desarrollo de la enfermedad está muy relacionado a la capacidad de la bacteria de unirse a la superficie de la célula hospedera e inyectarle directamente factores de virulencia mediante un sistema de secreción tipo III. La interacción de EPEC con la célula hospedera provoca una histopatología característica conocida como lesión de adherencia y destrucción (AE), la cual se caracteriza por la pérdida de las microvellosidades y la reorganización del citoesqueleto de actina para formar una estructura parecida a un pedestal. Los genes necesarios para generar esta lesión, están codificados en una isla de patogenicidad denominada LEE ("Locus of Enterocyte Effacement"). Para la expresión de los genes del LEE se requiere del activador Ler, codificado en la misma isla. EPEC secreta al menos seis proteínas al medio extracelular; de éstas, sólo EspC es secretada de manera independiente del sistema de secreción tipo III. EspC se encuentra codificada por el gen *espC* en una segunda isla de patogenicidad, localizada en el cromosoma de EPEC y denominada isla *espC*. Se ha reportado anteriormente que *espC* también es regulado de manera positiva por Ler, aunque el mecanismo no se ha caracterizado en detalle.

Este trabajo tuvo como objetivo estudiar el mecanismo de regulación a nivel transcripcional del gen *espC*. Para cumplirlo, se construyeron una serie de fusiones transcripcionales entre el gen reportero *cat* y recortes de diferentes tamaños de la región reguladora del gen. Estas fusiones se utilizaron para hacer ensayos de actividad de CAT en distintas cepas de EPEC: silvestre,  $\Delta$ *ler* y  $\Delta$ *hns*, así como en las cepas de *E. coli* MC4100 silvestre y  $\Delta$ *hns*. Estas fusiones sirvieron para determinar la región reguladora mínima, así como el sitio de inicio de la transcripción que permitió definir al promotor de *espC*. Los resultados obtenidos con los ensayos de actividad de CAT se corroboraron con un experimento tipo "western blot" para identificar a EspC. Para determinar si Ler es el único regulador positivo necesario para la expresión de *espC*, se hicieron ensayos de complementación con Ler clonada en un plásmido multicopia en la cepa de *E. coli* K12. Así mismo, se determinaron los posibles sitios de pegado de Ler y H-NS mediante ensayos de retardamiento de banda, así como por ensayos de protección a DNAsa I ("footprinting") en el caso de Ler.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que la actividad transcripcional del promotor de *espC* es reprimida por H-NS y que esta regulación negativa es eliminada por Ler, de forma similar a lo ocurrido para algunos promotores de la isla LEE.

# I. INTRODUCCIÓN

## I.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es la especie típica del género *Escherichia*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, en la cual se encuentran mayoritariamente bacilos Gram-negativos móviles (Nataro y Kaper., 1998) de tamaño medio, con flagelos peritricos, que pueden habitar en suelo, agua y vegetación. *E. coli* mide de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de longitud y 1  $\mu\text{m}$  de ancho; es la bacteria anaerobia facultativa predominante de la microbiota intestinal de varios mamíferos, incluyendo al humano. La interacción de la bacteria con el humano comienza cuando coloniza el tracto gastrointestinal de infantes a las pocas horas de haber nacido, obteniendo ambos un beneficio mutuo (Nataro y Kaper., 1998). *E. coli* es el microorganismo más extensamente estudiado, pues ha sido el sistema modelo para el estudio del metabolismo bacteriano, procesos de división celular, biosíntesis de pared celular, quimiotaxis y genética bacteriana (Puente y Finlay., 2001).

Los serotipos de *E. coli* se clasifican con base en los perfiles de sus antígenos de superficie O (somático), H (flagelar) y K (capsular). Se han reconocido un total de 170 antígenos O, cada uno definiendo un serogrupo, mientras que una combinación específica de antígenos O y H define el serotipo. Las cepas de *E. coli* de serogrupos específicos pueden asociarse reproduciblemente con ciertos síndromes clínicos (Nataro y Kaper., 1998).

*E. coli* por lo regular reside inocuamente en el lumen intestinal. Sin embargo, en hospederos debilitados o inmunosuprimidos incluso las cepas no patógenas pueden provocar una infección (Nataro y Kaper., 1998). En lo que se refiere a las cepas patógenas, se ha reportado una gran variedad de patotipos que causan diversas enfermedades intestinales y extraintestinales. Las infecciones provocadas por estas cepas patógenas pueden estar limitadas a la superficie mucosa o pueden diseminarse por todo el cuerpo, provocando así tres tipos de enfermedades: i) infección del tracto urinario (UTI, "urinary tract infection"), ii) sepsis / meningitis, y iii) enfermedad entérica / diarrea (Nataro y Kaper., 1998).

Los patotipos intestinales se clasifican en 6 categorías distintas de acuerdo a sus esquemas de patogenicidad (Tabla 1). Estas cepas altamente adaptadas han desarrollado la habilidad de provocar un amplio espectro de enfermedades en humanos y, al igual que muchos patógenos que actúan sobre la mucosa, siguen una estrategia de infección, la cual consta de cuatro etapas: i) colonización de la mucosa, ii) evasión de las defensas del hospedero, iii) multiplicación y iv) daño al hospedero (Nataro y Kaper., 1998).

De estas cepas, EPEC es el organismo prototipo de un grupo de bacterias patógenas que provocan lesiones intestinales de adherencia y destrucción (AE, "attaching and effacing"), dentro del cual se encuentran: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Tabla 1); *Hafnia alvei*, que provoca diarrea en niños; *Citrobacter rodentium*, que provoca hiperplasia de colon transmisible en ratones; y *E. coli* enteropatógena de conejos (REPEC), a los que les provoca diarrea (Haack *et al.*, 2003).

Tabla 1. Cepas de *E. coli* patógenas para humanos.

CATEGORIA	SÍNTOMAS CLÍNICOS	HOSPEDEROS	FACTORES DE PATOGENICIDAD
<b>INTESTINALES</b>			
ETEC ( <i>E. coli</i> enterotoxigénica)	Diarrea acuosa (diarrea del viajero) generalmente sin sangre, moco o pus, de intensidad variable. Puede haber fiebre y vómito.	Bebés recién destetados y adultos de países donde la enfermedad no es endémica.	Toxina termolábil (LT), toxina termoestable (ST) y factores de colonización (CFAs).
EPEC ( <i>E. coli</i> enteropatógena)	Diarrea aguda. Puede haber vómito y fiebre.	Niños menores de 6 meses.	BFP, Intimina, Tir, Esps, sistema de secreción tipo III (Sep y Esc).
EHEC ( <i>E. coli</i> enterohemorrágica)	Diarrea acuosa con sangre, síndrome urémico hemolítico y colitis hemorrágica.	Adultos y niños, principalmente en EEUU, Argentina, Australia, Chile, Sudáfrica y Canadá.	Intimina, Tir, Esps, sistema de secreción tipo III (Sep y Esc), toxina tipo Shiga (Stx), enterohemolisina.
EAEC ( <i>E. coli</i> enteroagregativa)	Diarrea acuosa persistente, con moco, poca fiebre y poco o nulo vómito.	Niños.	Adhesinas fimbriales AAF/I y AAF/II, proteínas Pet y Pic, hemolisina y toxina termoestable EAST-1 ("enteroagregative heat-stable toxin-1").
EIEC ( <i>E. coli</i> enteroinvasiva)	Diarrea acuosa, algunas veces cuadro disentérico con sangre, moco y pus, junto con fiebre.	Adultos.	Ipas ("invasion plasmid antigens"), secreción tipo III (Mxi y Spa) y VirG/IcsA.
DAEC ( <i>E. coli</i> difusoadherente)	Diarrea acuosa persistente.	Niños de 2 a 5 años.	Fimbria F1845 y adhesina no fimbrial de membrana externa AIDA-1.
<b>EXTRAINTESTINALES</b>			
UPEC ( <i>E. coli</i> uropatógena)	Infección del tracto urinario (uretritis, cistitis y pielonefritis).	Principalmente mujeres.	Pili tipo I, pili P, adhesinas no fimbriales (Afa-I y Afa-III), hemolisina y toxina CNF-1 ("cytotoxic necrotizing factor 1").
NMEC ( <i>E. coli</i> asociada a sepsis y meningitis)	Sepsis y meningitis neonatal.	Recién nacidos.	Cápsula, pili tipo I, adhesinas fimbriales S, IbeA e IbeB (proteínas de invasión).

\*Modificado de Puente y Finlay (2001).

## 1.2 *Escherichia coli* enteropatógena

Las cepas de EPEC se establecieron originalmente como aquellas que pertenecían a ciertos serotipos (Tabla 2), asociados con epidemias y casos esporádicos de diarrea infantil severa en países desarrollados durante mediados del siglo XX (Nougayrède *et al.*, 2003). Estas cepas se caracterizan principalmente por no producir toxinas tipo Shiga (Stx) y no ser invasivas (Clarke *et al.*, 2003). Aunque las cepas de EPEC ya no son una causa importante de diarrea en países desarrollados, sí son los agentes causales predominantes de diarrea infantil en países en vías de desarrollo y pobres, afectando principalmente a niños menores de 6 meses donde colonizan la superficie del epitelio intestinal (Nataro y Kaper., 1998).

Tabla 2. Serotipos característicos de EPEC.

SEROGRUPO	ANTIGENO H ASOCIADO
O55	H6, NM**
O86	H34, NM
O111	H2, H12, NM
O119	H6, NM
O125ac	H21
O126	H27, NM
O127	H6, NM
O128	H2, H12
O142	H6

\*Tomado de Nataro y Kaper (1998).

\*\*NM, no móvil.

## 1.3 Mecanismo de diarrea

A pesar de todos los estudios realizados en los últimos 25 años, el mecanismo por el cual EPEC produce diarrea es aún incierto. Se ha propuesto que una de las causas es la mala absorción provocada por la pérdida dramática de las microvellosidades absorbentes del epitelio intestinal como consecuencia del desarrollo de la lesión AE (Nataro y Kaper.,

1998). Sin embargo, la diarrea se da de manera muy rápida, lo cual sugiere que EPEC activa un mecanismo de secreción (Vallance y Finlay., 2000), lo que podría inducir una gran variedad de mediadores intracelulares de transporte iónico intestinal como el calcio intracelular, proteína cinasa C (PKC), inositol fosfatos y tirosin-cinasas, cuyas funciones son alteradas durante la infección (Nataro y Kaper., 1998). A su vez, la infección por EPEC reduce la integridad de las uniones estrechas de las monocapas epiteliales (Vallance y Finlay., 2000), o puede alterar activamente el transporte de iones, ya sea provocando un flujo hacia adentro de iones positivos, o un flujo hacia afuera de iones negativos (Donnenberg *et al.*; 1997), causando un incremento rápido y transitorio en la corriente de circuito corto (Isc) en monocapas epiteliales intestinales (Vallance y Finlay., 2000) (Fig. 1).

Por otro lado, otros factores del hospedero podrían contribuir a la diarrea, esto es, se ha visto que hay un reclutamiento sustancial de neutrófilos y otras células polimorfonucleares (PMN) al sitio de la infección *in vivo* (Vallance y Finlay., 2000). Esta inflamación podría favorecer el daño celular y, por lo tanto, la diarrea.

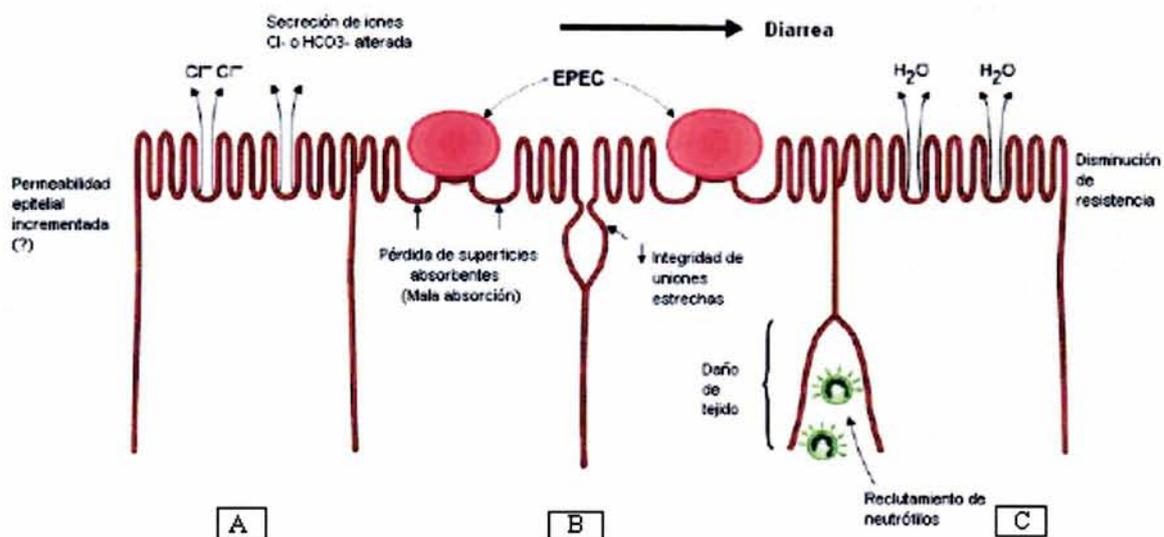


Fig. 1. Modelo de los probables mecanismos de la diarrea producida por EPEC. (A) Se propone que ocurre un aumento de la permeabilidad epitelial y alteraciones en la secreción de iones  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$ . (B) Los cambios estructurales incluyen la pérdida de superficies absorbentes, reducción de la integridad de las uniones estrechas y daño tisular. (C) También se propone que el reclutamiento de neutrófilos favorecería la producción de diarrea. Modificado de Vallance y Finlay (2000).

## 1.4 Modelo de patogénesis

La interacción de EPEC con células epiteliales lleva a la producción de una histopatología característica conocida como lesión de adherencia y destrucción (AE), la cual se caracteriza por la pérdida de microvellosidades en la superficie de los enterocitos y la inducción de pedestales de actina polimerizada justo por debajo del sitio donde se adhiere la bacteria (Vallance y Finlay., 2000). El modelo de patogenicidad se ha dividido en tres etapas para su mejor entendimiento (Fig. 2):

i) **Adherencia localizada.** La primera etapa involucra la adherencia inicial de la bacteria al epitelio intestinal del hospedero. En esta etapa, EPEC forma microcolonias densas que se adhieren a las células epiteliales en un patrón denominado adherencia localizada (LA) (Vallance y Finlay., 2000). Baldini y colaboradores (1983), demostraron que la habilidad de EPEC de adherirse con este patrón, depende de la presencia del plásmido EAF (“EPEC adherence factor”, descrito más adelante). La identidad del factor que media la LA fue reportada por Girón y colaboradores (1991), quienes describieron una fimbria de 7 nm de diámetro que tiende a agregarse y a formar haces, por lo que sugirieron el nombre BFP (“bundle-forming pilus”).

ii) **Transducción de señales.** Después del primer contacto con la célula hospedera, EPEC se une a la superficie de la célula y le inyecta directamente factores de virulencia a través de un sistema de secreción tipo III. Éste es una maquinaria molecular multimérica especializada, compuesta de aproximadamente 20 proteínas, entre cuyos componentes principales se encuentran las proteínas EspA, EspB y EspD que conforman el translocón (Vallance y Finlay., 2000). EspA forma un filamento en la superficie bacteriana, mientras que EspB y EspD forman un poro en la membrana celular de la célula hospedera. Estas proteínas conforman una jeringa molecular a través de la cual son liberadas diversas moléculas efectoras al citoplasma (Campellone y Leong., 2003), entre las cuales se encuentran EspG (Elliott *et al.*, 2001), EspF, EspH, Map (“mitochondria-associated protein”) y Tir (Clarke *et al.*, 2003). Estas moléculas efectoras activan vías de señalización celulares causando alteraciones en la arquitectura del citoesqueleto, lo que resulta en la pérdida de las microvellosidades y la despolimerización de actina.

Entre la variedad de vías que activa EPEC, ocurre un aumento en los niveles de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular en cultivos de células epiteliales (Baldwin *et al.*, 1991; Dytoc *et al.*, 1994; Philpott *et al.*, 1996). Se ha hipotetizado que este incremento produce cambios en el citoesqueleto mediante la activación de una proteína separadora de actina dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  que induce la despolimerización de la actina que constituye a las microvellosidades (Baldwin *et al.*, 1991).

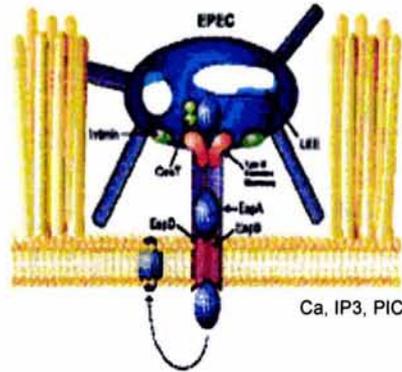
También se ha demostrado la activación de al menos dos cinasas, proteína cinasa C (PKC) y la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) (Baldwin *et al.*, 1990; Manjarrez-Hernández *et al.*, 1996; Crane y Oh., 1997). La activación de la PKC induce cambios rápidos del contenido de agua intestinal y del equilibrio electrolítico *in vivo* e *in vitro* (Nataro y Kaper., 1998), mientras que la fosforilación de la cadena ligera de miosina puede llevar a un incremento en la permeabilidad de las uniones estrechas (Nataro y Kaper., 1998).

iii) **Adherencia íntima.** Una vez translocada, Tir es modificada por fosforilación de residuos de treonina y serina, pero principalmente es fosforilada en un residuo de tirosina, Tyr474, localizado en la región C-terminal citoplasmática (Campellone y Leong., 2003). Posteriormente, Tir se inserta en la membrana de la célula hospedera donde adopta una estructura tipo "pasador", mostrando un dominio extracelular central que se une a una proteína de membrana externa de la bacteria llamada intimina (Campellone y Leong., 2003) que actúa como adhesina. Los dominios amino y carboxilo de Tir residen en el citoplasma de la célula hospedera, donde son capaces de interactuar con componentes del citoesqueleto (Campellone y Leong., 2003). Recientemente se ha demostrado que péptidos de Tir que contienen el residuo Tyr474 fosforilado se unen de manera directa a la proteína adaptadora Nck *in vitro* (Campellone *et al.*, 2002), pero no ocurre esta unión cuando el residuo de tirosina no está fosforilado. Nck recluta al dominio amino terminal de N-WASP ("neuronal Wiskott- Aldrich syndrome protein") y al complejo de proteínas relacionadas a actina 2/3 (Arp 2/3). El reclutamiento de Arp2/3 resulta en la nucleación de filamentos de actina y el inicio de la formación del pedestal. Por lo tanto, se ha propuesto que este residuo de tirosina fosforilado es crítico para la señalización de actina y la formación del pedestal (Kalman *et al.*, 1999) (Fig. 3B).

A) Adherencia localizada



B) Transducción de señales



C) Adherencia íntima

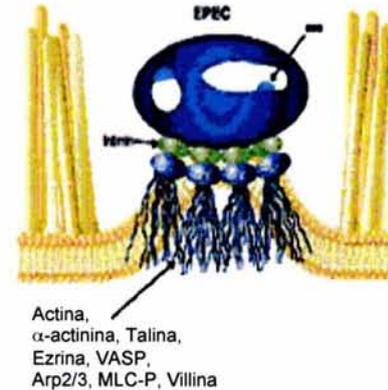


Fig. 2. Modelo de patogénesis de EPEC. A) La adherencia localizada está mediada por la producción del pilus BFP. Los genes necesarios para la producción de este pilus están codificados en el plásmido EAF (Sohel *et al.*, 1996; Stone *et al.*, 1996). B) La transducción de señales ocurre cuando EPEC le inyecta factores de virulencia a la célula hospedera mediante el sistema de secreción tipo III, las cuales activan vías de señalización celulares causando alteraciones en la arquitectura del citoesqueleto, lo que resulta en la despolimerización de actina y la pérdida de las microvellosidades. C) La adherencia íntima se da cuando Tir es translocada a la célula hospedera donde es fosforilada. Posteriormente, Tir se inserta en la membrana de la célula hospedera y funciona como receptor para la proteína de membrana externa intimina. La fosforilación de Tir también lleva al reclutamiento de proteínas de la célula hospedera para la formación del pedestal de actina. Modificado de Strynadka y Ness (2002).

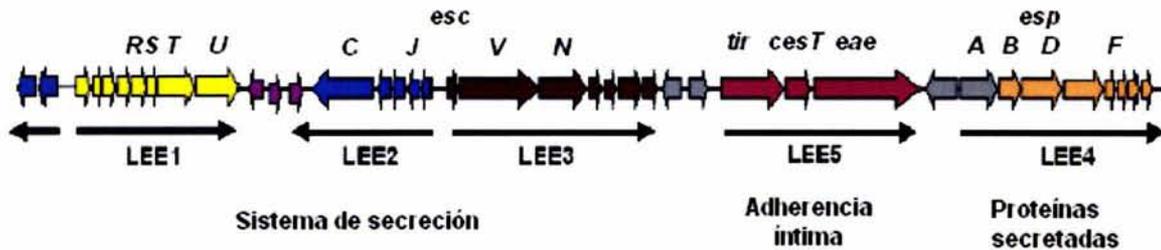
### 1.5 Locus de eliminación de enterocitos (LEE)

EPEC y otras *E. coli* patógenas parecen haber evolucionado de cepas no patógenas mediante la adquisición de factores de virulencia por transferencia horizontal de DNA. Se propone que este DNA se organiza, por lo regular, en islas de patogenicidad en el cromosoma o en plásmidos (Puente y Finlay., 2001). Una de las islas de patogenicidad de EPEC es la denominada LEE (“Locus of Enterocyte Effacement”), la cual mide 35 kb y se localiza en el cromosoma en el minuto 82 (Donnenberg *et al.*, 1997). En esta región está codificado el sistema de secreción tipo III, el cual, como ya se mencionó, es utilizado por EPEC para secretar a las proteínas efectoras fuera de la bacteria y/o translocarlas a la célula hospedera (ver sección anterior). Este sistema está codificado por los genes *esc* (“E. coli secretion”) y *sep* (“secretion of E. coli proteins”) que están distribuidos en al menos 3 operones (*LEE1* a *LEE3*) de la isla (Elliott *et al.*, 1998). Los genes necesarios para la adherencia íntima (*tir*, *cesT* y *eae*) están codificados en el operón *LEE5* (Sánchez-

Justificar

San Martín *et al.*, 2001), mientras que las proteínas translocadoras y la mayoría de las secretadas están codificadas en el operón *LEE4* (Mellies *et al.*, 1999) (Fig. 3A).

A)



B)

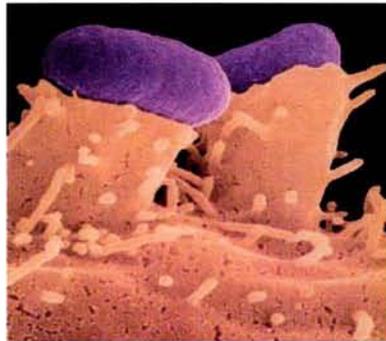


Fig. 3. (A) Representación esquemática de la isla de patogenicidad LEE de EPEC E2348/69 mostrando algunos genes representativos. La isla LEE contiene 41 marcos de lectura abiertos (ORF'S), arreglados en al menos cinco operones policistrónicos denominados *LEE1* hasta *LEE5*. Los genes que codifican para la vía de secreción tipo III se encuentran en los operones *LEE1* a *LEE3* (Elliott *et al.*, 1998); las proteínas efectoras, en su mayoría, están codificadas en el operón *LEE4* (Mellies *et al.*, 1999); y las proteínas necesarias para la adherencia íntima (AE) están codificadas en el operón *LEE5* (Sánchez-San Martín *et al.*, 2001). (B) Fotomicrografía del pedestal formado por EPEC. Tomado de Rosenshine *et al* (1996).

## 1.6 El plásmido EAF

El plásmido de virulencia de EPEC (EAF, " EPEC adherence factor") es un plásmido de alto peso molecular (~92 kb ó 60 MDa) (Fig. 4) que codifica para el regulador PerA y para las proteínas involucradas en la formación del pilus BFP, ambos necesarios para la virulencia en humanos (Bieber *et al.*, 1998).

Los plásmidos EAF no presentan genes para la síntesis de  $\alpha$ -hemolisina, colicina y aerobactina; y no poseen ningún marcador bioquímico o de resistencia a antibiótico reconocido (Nataro *et al.*, 1987). Algunas cepas de EPEC no poseen el pEAF y, por lo tanto, no expresan el BFP. Con base en esto, las cepas de EPEC se han clasificado en clase I (si tienen pEAF) y clase II (si carecen de él) (Nataro *et al.*, 1985), aunque comúnmente se les llama típicas y atípicas, respectivamente (Kaper., 1996; Trabulsi *et al.*, 2002).

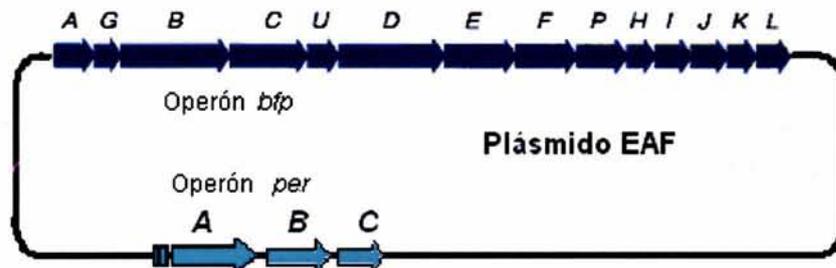


Fig. 4. Representación esquemática del plásmido EAF. Éste contiene al operón *bfp*, el cual está compuesto de 14 genes y abarca 11.5 kb del plásmido, además contiene a los genes que codifican para las proteínas requeridas para la biogénesis del BFP. El plásmido también contiene al operón *perABC* (*bfpTVW*) que codifican para PerA, PerB y PerC. PerA es un regulador perteneciente a la familia de activadores transcripcionales AraC/XylS (Gómez-Duarte y Kaper., 1995) que regula positivamente a su propio operón (Martínez-Laguna *et al.*, 1999) y al operón *bfp* (Bustamante *et al.*, 1998); mientras que PerC modula la activación del operón *LEE1* que codifica para el regulador Ler (Mellies *et al.*, 1999; Bustamante *et al.*, 2001). Modificado de Bustamante *et al* (2001).

## 1.7 Mecanismo de regulación

Una regulación precisa de los genes de virulencia y su expresión adecuada en respuesta a cambios en las condiciones ambientales, son los elementos clave en los sistemas patógenos de muchas bacterias. La expresión inadecuada de los genes de virulencia puede traer consecuencias desfavorables para la bacteria, ya que el expresarlos requiere de un gasto metabólico costoso y el expresarlas antes de establecer la infección puede alertar al sistema de defensa del hospedero sobre la presencia de la bacteria antes de una colonización exitosa (Clarke *et al.*, 2003).

La expresión de los factores de virulencia de EPEC se presenta a niveles muy bajos cuando se crece a la bacteria en un medio rico, como el LB (Puentes *et al.*, 1996; Kenny *et al.*, 1997). Sin embargo, cuando se crece en un medio mínimo definido, como el DMEM, se detecta la expresión del BFP y de las proteínas secretadas. La expresión óptima de los genes de virulencia en EPEC se observa durante el crecimiento exponencial a 37°C, pH 7 y a una osmolaridad fisiológica, en presencia de calcio y bicarbonato de sodio (Puentes *et al.*, 1996). Por otro lado, la presencia de sales de amonio reduce significativamente la expresión de *bfpA* y el fenotipo LA *in vitro* (Puentes *et al.*, 1996). Se ha propuesto que este efecto también ocurre *in vivo*, y se da cuando EPEC pasa del ambiente con poco amonio del íleon, al ambiente con alto amonio del colon, donde EPEC no puede adherirse y, por lo tanto, se requiere una regulación negativa de los factores de virulencia (Puentes *et al.*, 1996).

La base genética de la regulación de los genes de virulencia de EPEC se ha enfocado en el papel del regulador Per (“plasmid-encoded regulator”) codificado en el plásmido EAF. El operón *per* incluye a *perA*, *perB* y *perC* (Fig. 4). PerA es miembro de la familia AraC/XylS de activadores transcripcionales (Gómez-Duarte y Kaper., 1995) y regula de manera positiva la expresión de su propio promotor y la del operón *bfp* (Bustamante *et al.*, 1998; Martínez-Laguna *et al.*, 1999). La transcripción de *per* es reprimida parcialmente por GadX, la cual regula también la síntesis de proteínas glutamato descarboxilasas que forman parte del mecanismo de resistencia a ácidos (Shin *et al.*, 2001). Por otro lado, PerC no muestra homología a secuencias de proteínas en la base de datos (Gómez-Duarte y Kaper., 1995; Tobe *et al.*, 1996), pero regula de manera positiva la expresión de los genes de LEE mediante la activación del primer gen de *LEE1* (*ler*) (Bustamante *et al.*, 2001).

La proteína Ler (“LEE-encoded regulator”), producto del gen *ler*, tiene similitud con la familia de proteínas tipo H-NS. La similitud más alta se encuentra en el dominio C-terminal donde se conserva el motivo de unión a DNA (TWTGXGRXP). Ler tiene 23% de identidad con StpA (48% de similitud sobre la región homóloga y un 40% de similitud sobre la secuencia completa), y 36% de identidad con H-NS (55% de similitud sobre la región homóloga y 20% de similitud sobre la secuencia completa) (Elliott *et al.*, 2000). La proteína H-NS (proteína funcionalmente parecida a histona) se une fuertemente al DNA de forma no específica, preferentemente en secuencias intrínsecamente curvas y ricas en

residuos de A's y T's (Falconi *et al.*, 1988), provocando cambios en el superenrollamiento y empaquetamiento e influyendo en la expresión genética. H-NS modula de forma negativa la expresión de genes involucrados en muchos procesos celulares distintos, incluyendo virulencia (Atlung e Ingmer., 1997).

La expresión de *ler* también depende de la función de otros factores, entre los cuales se encuentran:

- IHF (“integration host factor”), la cual es una proteína que se une específicamente al DNA en sitios consenso y lo dobla para formar complejos nucleoproteínicos. IHF actúa como regulador global y es esencial para la activación de *ler* (Friedberg *et al.*, 1999).
- BipA, la cual es miembro de la superfamilia de GTPasas de unión a ribosomas y regula de manera positiva la expresión de *ler* (Grant *et al.*, 2003).
- GrlA, que tiene 23% de identidad con CaiF, un activador transcripcional común de las *Enterobacteriaceae*, y regula de manera positiva la expresión de *ler* (Deng *et al.*, 2004).

Bustamante y colaboradores (2001) reportaron que Ler actúa como un antirepresor para H-NS en la regulación de los operones *LEE2* y *LEE3*. Encontraron que dos regiones denominadas SRS1 y SRS2 (“silencer regulatory sequence”), localizadas en el extremo 5' de la secuencia estructural de *orf12* y entre el sitio de inicio de la transcripción y el codón de inicio de *sepZ*, respectivamente, son requeridas para la regulación negativa de estos operones en ausencia de Ler. Estas regiones reprimen la expresión de ambos operones en presencia de H-NS y al eliminarlas la expresión se hace independiente de Ler. Concluyen que Ler podría estar compitiendo con H-NS por sus sitios de unión y/o alterando la arquitectura local del DNA para evitar la unión de H-NS, interfiriendo con la formación de un complejo nucleoproteínico represor. Ler y H-NS también compiten para activar la transcripción de *LEE5* (Haack *et al.*, 2003). A través de ambos estudios, se ha demostrado que Ler es necesaria para la transcripción de los genes de LEE, compitiendo por las secuencias de unión al DNA con H-NS, la cual reprime su expresión en ausencia de Ler.

A su vez, se ha demostrado que Ler es requerida para la expresión de los operones LEE2, LEE3, LEE4 y LEE5, y *espF*, *espG*, y *map* (Friedberg *et al.*, 1999; Mellies *et al.*, 1999; Elliott *et al.*, 2000; Sperandio *et al.*, 2000; Sánchez-San Martín *et al.*, 2001). Adicionalmente, Ler se requiere para la expresión del gen *espC* no codificado en LEE (Elliott *et al.*, 2000).

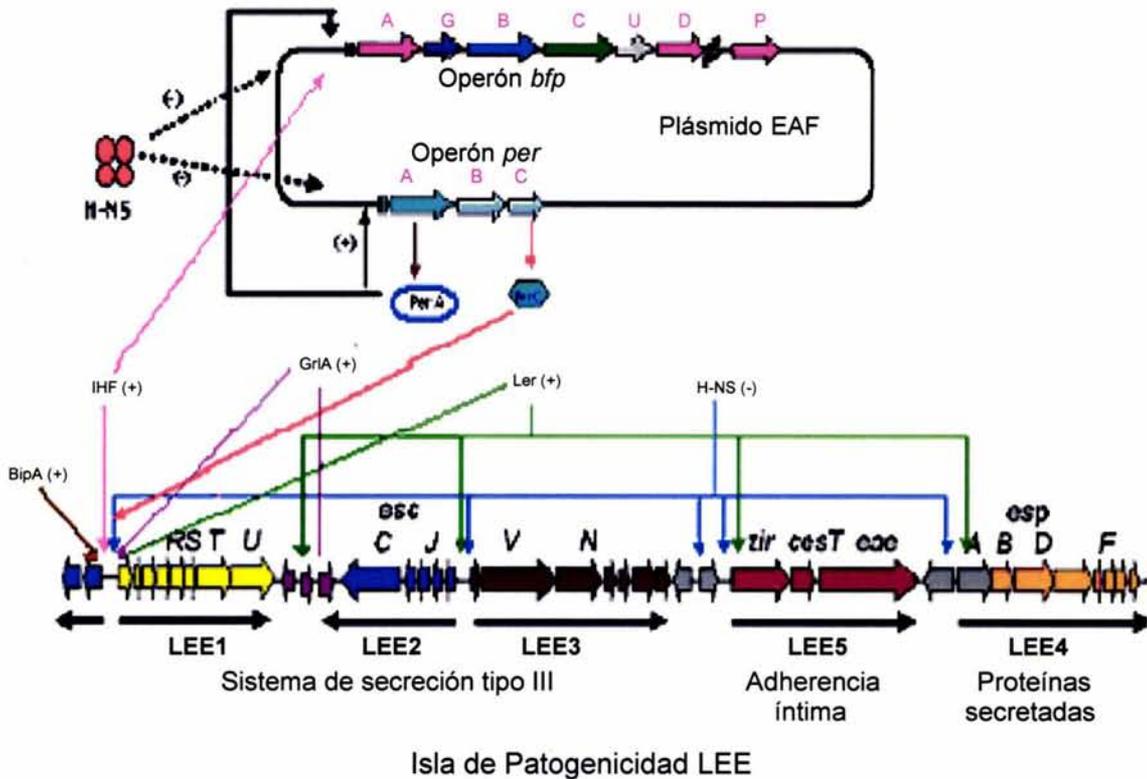


Fig. 5. Regulación de genes de virulencia en EPEC. En el plásmido EAF se encuentra el operón *per*, el cual codifica para PerA, PerB y PerC. PerA regula de manera positiva la transcripción de su promotor y la del operón *bfp*. Por su parte, PerC junto con GrIA, IHF, y BipA, regulan de manera positiva la expresión del primer gen del operón *LEE1*, *ler*. El producto de este gen elimina la represión ejercida por H-NS sobre los promotores de *LEE2*, *LEE3*, *LEE4* y *LEE5*. Modificado de Bustamante *et al* (2001).



hidrofóbicos (dominio H) y, finalmente, una región menos hidrofóbica (dominio C) que contiene un sitio de reconocimiento para la peptidasa señal (Mellies *et al.*, 2001).

EspC comparte homología con miembros de la familia de autotransportadores, entre los cuales se encuentra la proteasa de IgA de *Neisseria gonorrhoeae*, Hap de *Haemophilus influenzae*, Tsh de APEC (“avian pathogenic *E. coli*”), SepA y ShMu de *Shigella flexneri*, Pic y Pet de EAEC, y EspP de EHEC. Varios miembros de la familia de autotransportadores, incluyendo a las proteínas ya mencionadas, tienen un motivo de serín-proteasa conservado, sin embargo, ninguna es capaz de cortar IgA. A esta subfamilia de autotransportadores se le ha denominado SPATE (“serin protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*”) (Mellies *et al.*, 2001).

EspC tiene mayor similitud con la proteína Pet de EAEC, la cual tiene actividad enterotóxica en el tejido intestinal (Mellies *et al.*, 2001). Al respecto, se ha visto que EspC tiene actividad enterotóxica, rompe las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la espectrina, a la pepsina, y al factor de coagulación V (Dutta *et al.*, 2002). Interesantemente, no contribuye con la formación de la lesión AE, ni con la mediación de la transducción de señales inducida por EPEC y no juega un papel en la invasión o adherencia (Mellies *et al.*, 2001). Sin embargo, hay varios elementos que sugieren que EspC pudiera jugar un papel en la patogénesis. Uno es la presencia de homólogos de *espC* en las cepas patógenas de *E. coli* RDEC-1, *C. freundii* y *H. alvei*, pero no en cepas no patógenas (Mellies *et al.*, 2001). Otro es el hecho de que EspC es una proteína altamente inmunogénica (Stein *et al.*, 1996). Un tercero es la identificación de autotransportadores en al menos 30 patógenos Gram-negativos que causan diferentes enfermedades (Mellies *et al.*, 2001). Además, recientemente, Navarro-García y colaboradores (2004) reportaron que EspC produce efectos citopáticos en células epiteliales parecidos a los reportados para Pet.

Se ha visto que el extremo carboxilo terminal del dominio  $\beta$  de los autotransportadores muestra un alto grado de homología a nivel de aminoácidos y parece que tienen una función común, mientras que los dominios pasajeros son más divergentes. De hecho, se les han atribuido distintas funciones, incluyendo adhesión, actividades de proteasa y toxina, e invasión celular. Debido a esto y a la presencia de *espC* en un subgrupo de patógenos, se propone que juega un papel accesorio en la patogénesis, precisamente como enterotoxina (Mellies *et al.*, 2001).

El mecanismo de autotransporte (Fig. 7) fue descrito por primera vez para la proteasa de IgA de *N. gonorrhoeae* (Henderson *et al.*, 2001). La proteína precursora se exporta a través de la membrana citoplasmática de una manera dependiente del sistema Sec, acoplada al rompimiento del péptido señal. La proteína madura posee un dominio C-terminal que forma un barril  $\beta$  en la membrana externa y el dominio pasajero N-terminal es exportado a través del barril, para, posteriormente, ser procesado autocatalíticamente del barril y liberado (Henderson *et al.*, 2001).

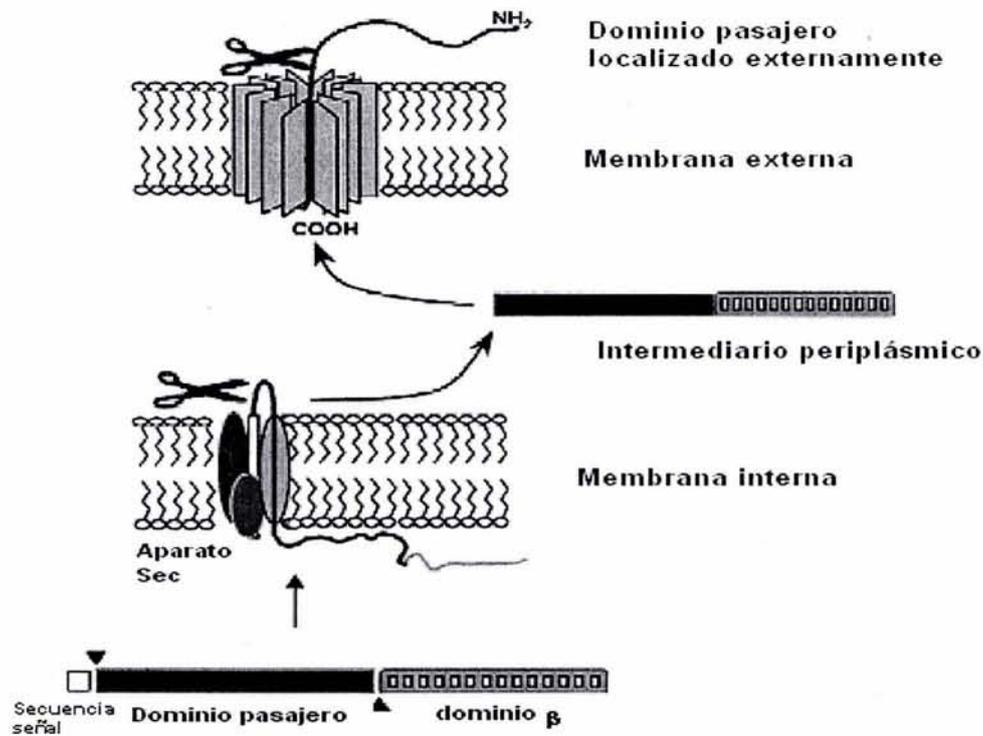


Fig. 7. Modelo del mecanismo de secreción de autotransportadores (tipo V). Las proteínas exportadas por este mecanismo poseen tres dominios (secuencia señal, dominio pasajero y dominio  $\beta$ ). La secuencia señal dirige a la proteína al periplasma a través del sistema Sec y es cortada en la membrana interna por una peptidasa señal, liberando la porción restante en el periplasma. Aquí, el dominio  $\beta$  asume la estructura de un barril  $\beta$  que se inserta en la membrana externa para formar un poro. El dominio pasajero es translocado a la superficie celular bacteriana a través del poro y, posteriormente, es cortado y liberado. Modificado de Henderson *et al* (2001).

En lo que se refiere a la regulación, Elliott y colaboradores (2000) observaron en preparaciones de proteínas secretadas de EPEC, una proteína de alto peso molecular (~110 kDa) en sobrenadantes de cepas silvestres y cepas  $\Delta ler$  complementadas, pero no en sobrenadantes de mutantes en *ler*. Esta banda ya se había identificado previamente

como EspC (Stein *et al.*, 1996), lo cual fue confirmado mediante una inmunodetección con antisuero anti-EspC.

Para demostrar que Ler es capaz de activar a *espC*, construyeron una fusión al gen reportero *lacZ* (conteniendo al probable promotor y al menos 200 pb flanqueándolo). Posteriormente, midiendo la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de la cepa EPEC  $\Delta$ *ler* complementada con *ler* en un plásmido, encontraron que Ler activa fuertemente la transcripción del promotor e incrementa los niveles de EspC secretada, por lo que propusieron que Ler activa de manera directa la transcripción de *espC*.

Posteriormente, Grant y colaboradores (2003) reportaron que la GTPasa BipA controla la expresión de Ler y, al analizar la secreción de EspC en la mutante en BipA (la cual presenta una disminución en la expresión de *ler*), vieron que disminuye en comparación con la silvestre, concluyendo que BipA controla la expresión de *espC* a través de Ler.

### III. HIPÓTESIS

Dado que la expresión de *espC* es dependiente de Ler, y de acuerdo a lo observado en otros genes de EPEC, *espC* es regulado negativamente por H-NS y positivamente por Ler.

## IV. OBJETIVOS

- Objetivo general

⇒ Estudiar la regulación transcripcional del gen *espC* de *E. coli* enteropatógena (EPEC).

- Objetivos particulares

⇒ Caracterizar el promotor del gen *espC*.

⇒ Determinar la región reguladora mínima de *espC*.

⇒ Determinar el papel de los reguladores Ler y H-NS en la regulación de *espC*.

- Objetivos experimentales

⇒ Construir fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* con fragmentos de distintos tamaños de la región reguladora del gen *espC*.

⇒ Analizar la expresión de estas fusiones en distintos fondos genéticos: E2348/69 (silvestre), EPEC  $\Delta ler$ , EPEC  $\Delta hns$ , MC4100 (silvestre), y MC4100  $\Delta hns$ .

⇒ Analizar la expresión de las fusiones en distintos medios de cultivo.

⇒ Determinar el inicio de la transcripción por "primer extension".

⇒ Inmunodetectar la proteína EspC en cepas con distintos fondos genéticos.

⇒ Hacer ensayos de complementación en la cepa de *E. coli* K12 con un plásmido que contenga a *ler*.

⇒ Hacer ensayos de retardamiento de banda para determinar la afinidad de las proteínas H-NS y Ler por distintos fragmentos de la región reguladora de *espC*.

⇒ Determinar el sitio de unión de Ler por ensayo de protección a DNasa I.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### ➤ Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas y plásmidos utilizados en este estudio se enlistan en la Tabla 3. Se usaron los medios LB (Luria-Bertani, contiene 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl por litro, ajustado a pH 7.5 con NaOH) o DMEM (“Dulbeco’s Modified Eagle Medium”, Gibco BRL Life Technologies, contiene alta glucosa, L-glutamina e hidrocloreuro de piridoxina), los cuales fueron suplementados con los siguientes antibióticos, según fue requerido: ampicilina (100 µg/ml), ácido nalidíxico (25 µg/ml), estreptomina (100 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml), y tetraciclina (10 µg/ml).

Tabla 3. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

CEPAS	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
E2348/69	EPEC silvestre O127:H6	Nal <sup>r</sup> J. B. Kaper
$\Delta$ ler	E2348/69 con una eliminación en fase de <i>ler</i>	Nal <sup>r</sup> Laboratorio
$\Delta$ hns::Km	E2348/69 con una inserción <i>hns</i> ::Km	Nal <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup> Laboratorio
MC4100	F' <i>araD139 D(argF-lac) U169 rpsL150 relA1 flb5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	Sm <sup>r</sup> Casabadan et al, 1976
MC4100 $\Delta$ hns	MC4100 con una eliminación en fase de <i>hns</i>	Sm <sup>r</sup> Laboratorio
$\Delta$ escC	E2348/69 con una eliminación de <i>escC</i>	Sm <sup>r</sup> Gauthier et al, 2003
$\Delta$ espC (MAS111)	E2348/69 con una eliminación de <i>espC</i>	Sm <sup>r</sup> Stein et al, 1996
<b>PLÁSMIDOS</b>		
pKK232-8	Derivado del pBR322 que contiene el gen <i>cat</i> (cloranfenicol acetil transferasa) sin promotor, utilizado para la construcción de fusiones transcripcionales.	Pharmacia Biotech
pMPMT3	Derivado del p15A, vector de clonación de bajo número de copias (Tc <sup>r</sup> )	Mayer, 1995
pMPMT3ler-4	Derivado del pMPMT3 que contiene al gen <i>ler</i> de <i>Citrobacter rodentium</i> bajo un promotor <i>tac</i> , utilizado en ensayos de complementación.	Laboratorio
pSEPZ-11	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>sepZ-cat</i> de los nucleótidos -469 a +121.	Bustamante et al, 2001
pESPC-401	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>espC-cat</i> de la región -401 a +141 con respecto al inicio de transcripción.	Este estudio

pESPC-287	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>espC-cat</i> de la región -287 a +141 con respecto al inicio de transcripción.	Este estudio
pESPC-210	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>espC-cat</i> de la región -210 a +141 con respecto al inicio de transcripción.	Este estudio
pESPC-121	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>espC-cat</i> de la región -121 a +141 con respecto al inicio de transcripción.	Este estudio
pESPC-58	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>espC-cat</i> de la región -58 a +141 con respecto al inicio de transcripción.	Este estudio
pESPC-43	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>espC-cat</i> de la región -43 a +141 con respecto al inicio de transcripción.	Este estudio
pESPC-29	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>espC-cat</i> de la región -29 a +141 con respecto al inicio de transcripción.	Este estudio

### ➤ Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados se solicitaron a la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología-UNAM y se muestran en la Tabla 4. Todos los oligonucleótidos se diluyeron a una concentración de 25  $\mu$ M antes de utilizarlos.

Los oligonucleótidos pKK232-BHI-F, pKK232-H3-R y *espC-crm*, utilizados en la secuenciación de DNA y en el “primer extension”, se marcaron con [<sup>32</sup>P]- $\gamma$ ATP y con la enzima T4 polinucleótido cinasa (Amersham) con la siguiente mezcla de reacción:

Oligonucleótido (25 $\mu$ M)	0.4 $\mu$ l
Regulador de cinasa 10 x	1.0 $\mu$ l
[ <sup>32</sup> P]- $\gamma$ ATP	0.4 $\mu$ l
Enzima T <sub>4</sub> PNK (USB, 30 U/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l
Agua	8.0 $\mu$ l

Esta mezcla se incubó a 37°C por media hora y la enzima se inactivó por calor a 75°C por 5 min.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

OLIGO.	SECUENCIA 5' - 3'	CARACTERÍSTICAS	USO	FRAGMENTO AMPLIFICADO
espC-1N	ATG-AGA-TGG-ATC-CGT-CGC-AAC-G	Genera un sitio de <i>Bam</i> HI. Fwd. <sup>a</sup>	pESPC-401	570 pb
espC-2	CGC-GTG-ACA-AGC-TTT-TAA-TGC-G	Genera un sitio de <i>Hind</i> III. Rev. <sup>b</sup>	Todas las fusiones	-----
espC-3	TTG-CTG-GGT-GGA-TCC-GGG-CTT-TTT	Genera un sitio de <i>Bam</i> HI. Fwd.	pESPC-29	200 pb
espC-4	TTA-ATA-AGG-GGA-TCC-TGT-TTG-TTA	Genera un sitio de <i>Bam</i> HI. Fwd.	pESPC-58	230 pb
espC-5	TTC-TTT-TTG-GGA-TCC-AGG-GTA-TTA	Genera un sitio de <i>Bam</i> HI. Fwd.	pESPC-121	300 pb
espC-6	TTA-TTA-GAA-GGA-TCC-TAT-TGT-TAT	Genera un sitio de <i>Bam</i> HI. Fwd.	pESPC-210	370 pb
espC-7	TGT-TTG-TTA-GGA-TCC-TGC-TGG-GTT	Genera un sitio de <i>Bam</i> HI. Fwd.	pESPC-43	210 pb
espC-8	ACG-AAA-CTG-GGA-TCC-GGA-ATT-AAA	Genera un sitio de <i>Bam</i> HI. Fwd.	pESPC-287	440 pb
espC-crm	TAT-CAC-CAG-ATC-TGA-AGT-CC	No genera ningún sitio. Rev.	"primer extension"	-----
pKK232-BHI-F	GGA-ATT-CTC-GGG-GAT	Incluye parte del pKK y el sitio de <i>Bam</i> HI. Fwd.	secuenciación de fusiones	-----
pKK232-H3-R	GTT-TTG-TCC-TAC-AGC	Incluye parte del pKK y el sitio de <i>Hind</i> III. Rev.	secuenciación de fusiones	-----
ompA	TTT-GCG-CCT-CGT-TAT-CAT-CCA-A	Corresponde al gen estructural <i>ompA</i> . Rev.	"primer extension"	-----

a. A favor.

b. Reverso.

## ➤ Construcción de las fusiones transcripcionales

Para la construcción de fusiones se utilizaron los oligonucleótidos espC1N a espC-8 (Tabla 4) con los cuales se realizaron las reacciones de PCR, utilizando como molde DNA genómico de la cepa EPEC E2348/69 y la enzima *Taq* polimerasa (Altaenzymes). Las condiciones variaron de acuerdo a la  $T_m$  de los oligonucleótidos y a los tamaños de los fragmentos. Una vez obtenidos los productos de PCR, se precipitaron utilizando el método de cloroformo:alcohol isoamílico y acetato de potasio como se describe a continuación.

Se juntó el contenido de los tubos de cada PCR en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Se le agregaron 1/10 de volumen de acetato de potasio 3M pH 4.8, 0.5 volúmenes de fenol y 0.5 volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se agitó el tubo por 10 min, luego se centrifugó por 10 min a 12,000 rpm. Se recuperó la fase acuosa en otro tubo y se le adicionó 1 volumen de cloroformo:alcohol isoamílico, después se agitó por 10 min. Al terminar se centrifugó por 8 min a 12,000 rpm. Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo y se le adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto. Se dejó precipitar el DNA toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Al día siguiente se centrifugó por 30 min a 12,000 rpm y se decantó. Se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó por 10 min a 12,000 rpm. Se decantó y se secó por 10 min en el Savant. El DNA se resuspendió en 30  $\mu\text{l}$  de agua.

Después de resuspender los DNA's, se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (Invitrogen) de la siguiente manera: a 30  $\mu\text{l}$  de DNA se le adicionaron 5  $\mu\text{l}$  del regulador de *Hind*III 10 x, 14  $\mu\text{l}$  de agua y 1  $\mu\text{l}$  de enzima, se incubó la reacción a  $37^{\circ}\text{C}$  por 3 hrs. Después se le agregó 1  $\mu\text{l}$  de *Bam*HI y se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  por otras 3 hrs. Posteriormente, se concentró el DNA con una columna Microcon-100 (Amicon, Millipore), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En seguida, se realizaron las reacciones de ligación con los insertos y el vector pKK232-8 digerido también con *Bam*HI y *Hind*III, en una relación 3:1 respectivamente, utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Promega) como se menciona a continuación:

Se prepararon las mezclas:

Vector	3	μl
Inserto	1	μl
Agua	13	μl

Estas mezclas se incubaron 10 min a 65°C, luego 10 min a 4°C. Posteriormente se les añadió 2 μl de regulador de ligasa 10 x y 1 μl de enzima T4 DNA ligasa. Se mezclaron, se centrifugaron y finalmente se incubaron a 4°C toda la noche.

Se transformó la cepa de *E. coli* MC4100 (silvestre) con 10 μl de cada reacción de ligación por electroporación, se recuperaron en medio SOC (contiene bacto tripton 2 g, extracto de levadura 0.5 g, NaCl 5 M 0.2 ml, KCl 1 M 0.25 ml, MgCl 1 M 1 ml, MgSO<sub>4</sub> 1 M 1 ml y glucosa 0.36 g aforado 100 ml) a 37°C por 2 horas, y se cultivaron en agar LB con ampicilina 100 μg/ml para seleccionar aquellas que tuvieran el plásmido. Posteriormente, se eligieron varias colonias y se les extrajo el plásmido por Miniprep como se describe a continuación.

Se centrifugaron 2.5 ml de cultivo por 3 min a 12,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante. Se le agregaron 200 μl de solución GET a la pastilla (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-H-Cl 25 mM), se resuspendió y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Después se le agregaron 200 μl de solución 2 (contiene 5 ml de SDS 20%, 2 ml de NaOH 10 N, aforado a 100 ml), se mezcló por inversión y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se agregaron 200 μl de acetato de potasio 3 M pH 4.8, se mezcló por inversión y se incubó 10 min a 4°C. Se centrifugó por 10 min a 12,000 rpm y se recuperó el sobrenadante en un tubo nuevo. Se le agregó 0.5 volúmenes de fenol y 1/5 de volumen de cloroformo:alcohol isoamílico, se mezcló por inversión y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó por 8 min a 12,000 rpm y se recuperó la fase acuosa en otro tubo. Se agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto y se mezcló por inversión. Se centrifugó por 15 min a 12,000 rpm a 4°C. Se decantó, se agregó 1 ml de etanol al 70% y se mezcló por inversión. Se centrifugó 10 min a 12,000 rpm a 4°C. Se decantó y se secó en un Savant a temperatura media por 15 min. Se resuspendió el DNA en 35 μl de agua.

Para corroborar las construcciones, se revisaron por digestión doble con *Bam*HI y *Hind*III y se observaron en un gel de agarosa al 1%. Una vez que se revisó el plásmido, se purificó con el estuche comercial High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se transformó el resto de las cepas: EPEC E2348/69 silvestre, EPEC  $\Delta$ *er*, EPEC  $\Delta$ *hns* y MC4100  $\Delta$ *hns* con 4  $\mu$ l del plásmido purificado.

### ➤ Secuenciación de fusiones

Para corroborar que las construcciones no tuvieran alguna mutación que pudiera alterar los resultados, éstas se secuenciaron utilizando los oligonucleótidos pKK8-BHI-F y pKK8-H3-R, los cuales se marcaron radioactivamente como se mencionó anteriormente. En las reacciones de secuencia se utilizó DNA de las fusiones y uno de los oligonucleótidos marcados, la secuencia se hizo mediante el procedimiento de terminación de la cadena por dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977), usando el estuche de secuenciación cíclica ThermoSequenase (Amersham Life Science). Se preparó la siguiente mezcla:

DNA	10.0 $\mu$ l
Regulador de secuenasa 10 x	2.4 $\mu$ l
Oligo $\gamma$ -ATP	1.0 $\mu$ l
Termosequenasa (USB, 4 U/ $\mu$ l)	0.6 $\mu$ l
Agua	7.0 $\mu$ l

Aparte, en tubos Eppendorf de 0.5 ml para PCR se ponen por separado 4  $\mu$ l de cada terminador ddNTP (ddATP, ddTTP, ddGTP, ddCTP, New England Biolabs) y se reparten 4  $\mu$ l de la mezcla anterior en cada tubo. Posteriormente se someten a los siguientes ciclos en un termociclador:

94 ° C	5 min	1 ciclo
94 ° C	30 seg	} 50 ciclos
47 ° C	30 seg	
60 ° C	2 min	

A las muestras se les adicionó 4  $\mu$ l de regulador de formamida, fueron desnaturalizadas calentándolas a 80°C por 3 minutos y se corrieron en un gel de secuencia de poliacrilamida 8%/ urea 7 M/ TBE (Trisma base 130 mM, ácido bórico 40 mM, EDTA 2.799 mM). El gel se secó al vacío a 80°C y se expuso en una pantalla de PhosphorImager (Molecular Dynamics).

#### ➤ Ensayo de actividad de CAT

Cuando se tuvieron las fusiones secuenciadas, se hicieron ensayos de actividad de la cloranfenicol acetil transferasa. La determinación de la actividad de las fusiones transcripcionales al gen *cat* se realizó como se describió anteriormente (Puente *et al.*, 1996). Brevemente, las cepas transformadas con las fusiones se cultivaron en 50 ml de LB adicionado con Ap en un baño con agitación a 37°C toda la noche. Los cultivos se ajustaron a una  $DO_{600}$  de 1.0 con regulador salino de fosfatos 1 x (PBS, contiene 80 g NaCl, 6.1 g  $Na_2HPO_4$ , 2 g  $KH_2PO_4$ , 2 g KCl en un litro, pH 7.4), se tomó 1 ml para inocular 50 ml de medio (LB o DMEM según el caso) suplementado con Ap y se incubaron en agitación. Se tomó 1 ml de muestra de cada cultivo a las  $DO_{600}$  de 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 (1.2 y 1.4 para ensayos en LB). Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min a 4°C y las pastillas se lavaron con 800  $\mu$ l de regulador TDTT (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, DTT 3 $\mu$ M) y, posteriormente, se resuspendieron en 300  $\mu$ l de TDTT. Para obtener los extractos crudos las muestras se sonicaron con 3 pulsos de 1 minuto y se centrifugaron a 10,000 rpm por 25 min a 4°C.

La concentración de proteínas se determinó con el estuche comercial BCA (Pierce) y la actividad de CAT se determinó mediante una cinética de actividad enzimática con acetil-CoA, cloranfenicol y 5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzónico) (DTNB, Research Organics) en

un lector de microplacas computarizado tipo Ceres (Biotek) y el programa KC3. La actividad específica de CAT se determinó dividiendo la actividad obtenida entre la concentración de proteína de cada extracto.

Para la realización de las curvas de actividad, a lo largo de la curva de crecimiento, se siguió básicamente el mismo procedimiento, con la diferencia de que los inóculos se pusieron en 65 ml de medio DMEM. Además, para la obtención de muestras se tomaron 15 ml a las 2 horas, 10 ml a las 3 horas, 5 ml a las 4 horas, 3 ml a las 5 horas, y de la sexta a la doceava horas se tomó 1 ml.

#### ➤ **Determinación del inicio de transcripción por “primer extension”**

Las bacterias se cultivaron como se mencionó anteriormente. Los cultivos se ajustaron a una  $DO_{600}$  de 1.0 con PBS 1x, se tomó 1 ml para inocular 50 ml de DMEM y se incubaron en agitación a 37°C hasta que llegaron a una  $DO_{600}$  de 1.0. De los cultivos se tomaron 20 ml de muestra, se centrifugaron a 8,000 rpm a 4°C y las pastillas se guardaron a -20°C. Posteriormente, se extrajo el RNA total con el estuche comercial RNeasy (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración y la calidad de RNA se determinaron midiendo la absorbancia a 260 y 280 nm ( $A_{260}$  y  $A_{280}$ ), y corriendo 4  $\mu$ l de muestra en un gel de agarosa al 2%. Para la cuantificación se utilizó la fórmula:  $[\text{ng}/\mu\text{l}] = A_{260} \times 40 \times \text{factor de dilución}$ .

Las reacciones de primer extension se hicieron como se describió anteriormente (Martínez-Laguna *et al.*, 1999) con algunas modificaciones. Para la reacción se utilizó el oligonucleótido marcado con  $^{32}\text{P}$  (pKK8-H3-R o espC-crm) y 4-10  $\mu$ g de RNA en NaCl 5M, Tris H-Cl 1M pH 8, agua DEPC calentando 3 minutos a 90°C y después enfriando lentamente hasta 50°C. Las reacciones de transcripción se hicieron a 37°C por una hora y media con la enzima transcriptasa reversa MLV (Invitrogen) adicionando además DTT 100 mM y dNTP's 10 mM, así como inhibidor de RNAsa (Invitrogen, 40 U/ $\mu$ l). Los productos se purificaron y concentraron usando una columna Microcon-30 (Amicon, Millipore), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Al final, se adicionaron 4  $\mu$ l de regulador de formamida. Las muestras fueron desnaturalizadas calentándolas a 80°C por 3 minutos y

se corrieron en un gel de poliacrilamida 8%/ urea 7 M/ TBE. El gel se secó al vacío a 80°C y se expuso en una pantalla de PhosphorImager. Como control se utilizó el oligonucleótido ompA y RNA tanto de la cepa silvestre como de la mutante en *ler*.

Para las reacciones de secuencia se utilizaron el oligonucleótido pKK-8-H3R y DNA de la fusión espC-401 (Fig. 8B); y el oligonucleótido espC-crm y DNA cromosomal de la cepa EPEC silvestre (Fig. 8A). Las reacciones se hicieron como se mencionó anteriormente.

### ➤ “Western blot”

Este método consiste en transferir proteínas de un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a una membrana de nitrocelulosa y, posteriormente, detectarlas con anticuerpos específicos para las proteínas de interés. Para este experimento las bacterias se cultivaron en LB suplementado con ac. nalidixico a 37°C por toda la noche. Los cultivos se ajustaron a una DO<sub>600</sub> de 1.0 con PBS 1x, se tomó 1 ml para inocular 50 ml de DMEM y se incubaron en agitación a 37°C hasta que llegaron a una DO<sub>600</sub> de 1.0. De estos cultivos se tomaron 9 ml, se centrifugaron y las pastillas se resuspendieron en 300 µl de solución de urea pH 8.0. Después, las muestras se sonicaron con 2 ciclos de 30 seg y se les añadió regulador de corrimiento para proteínas (contiene 5 ml glicerol 100%, 2 ml SDS 20%, 1 ml β-mercaptoetanol, 2.5 ml Tris-H-Cl pH 6.8 y 0.2 g de azul de bromofenol). Las muestras se hirvieron por 5 minutos y se cargaron 20 µl de cada una en un gel de poliacrilamida al 10% (acrilamida 30%, bisacrilamida 0.8%) que se corrió a 25 mA. Posteriormente, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm de poro (Amersham) en una cámara de transferencia húmeda (BioRad) por 1 hora a 100 V. Al término, la membrana se bloqueó con leche descremada (Carnation) al 5% en regulador TBS-Tween (contiene 2.5 ml Tris-H-Cl 2 m pH 7.5, 15 ml NaCl 5 M y 250 µl Tween 20 en medio litro de agua) por al menos 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Después, se incubó con el anticuerpo primario a la dilución recomendada (Tabla 5) durante toda la noche a temperatura ambiente en agitación. Al día siguiente, la membrana se lavó 3 veces por 10 minutos con TBS-Tween y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Tabla 5) por 1 hora en agitación. Por último, la membrana se volvió a lavar 3 veces con

TBS-Tween y se reveló con el estuche comercial de quimioluminiscencia Chemi-Glow (Alpha Innotech) y se observó en el Alpha Imager.

Tabla 5. Anticuerpos primarios <sup>a</sup> y secundarios <sup>b</sup> utilizados en este trabajo.

ANTICUERPO	DILUCIÓN	FUENTE
α-EspB monoclonal <sup>a</sup>	1:5,000	De Vinney, R. et al. 2001.
α-EspC policlonal <sup>a</sup>	1:600	Navarro, F. et al. 2004.
α-Tir monoclonal <sup>a</sup>	1:10,000	De Vinney, R. et al. 2001.
α-DnaK monoclonal <sup>a</sup>	1:50,000	Invitrogen
anti-conejo-HRP* <sup>b</sup>	1:10,000	Biomeda
anti-ratón-HRP* <sup>b</sup>	1:10,000	Biomeda

\*HRP - peroxidasa de rábano.

### ➤ Ensayo de retardamiento de banda (EMSA)

Los ensayos de retardamiento de banda, o ensayos de cambio en la movilidad electroforética (“Electrophoretic Motility Shift Essay”) proveen un método simple, rápido y extremadamente sensible para detectar la secuencia de DNA específica de unión de una proteína. Las proteínas que se unen específicamente a una secuencia de DNA retardan la movilidad del fragmento durante la electroforesis, resultando en bandas discretas que corresponden a los complejos DNA-proteína (Fried y Crothers., 1981). Para la realización de estos ensayos se amplificaron los fragmentos de los plásmidos pESPC-401 y pESPC-43, por PCR ,utilizando el oligonucleótido pKK232-H3-R marcado radioactivamente con <sup>32</sup>P y el oligonucleótido pKK232-BHI-F frío. Posteriormente, se pusieron en contacto los fragmentos con 3 concentraciones crecientes de Ler o H-NS (purificadas y dializadas) en regulador de unión (HEPES 40 mM, MgCl<sub>2</sub> 8 mM, KCl 45 mM, DTT 1 mM, NP<sub>4</sub>O 0.05%, BSA 0.1 mg/ml). La reacción se incubó por 20 minutos a 4°C y, posteriormente, se cargaron las muestras en un gel de acrilamida nativa al 5% (acrilamida 30%, bisacrilamida 0.4%) y se corrieron a 130 V a 4°C en regulador de corrida TBE (0.5x). Al término, los geles se secaron al vacío a 80°C y se expusieron en una pantalla de PhosphorImager para su análisis.

## ➤ Ensayo de protección a DNasa I

Para este ensayo se utilizó el fragmento de DNA de la fusión espC-43 amplificado por PCR utilizando el oligonucleótido pKK8-H3-R marcado radioactivamente con  $^{32}\text{P}$  y el oligonucleótido pKK8-BHI-F frío. Se pusieron 4  $\mu\text{l}$  del producto de PCR en contacto con diferentes concentraciones de la proteína Ler y se incubaron a temperatura ambiente por 20 minutos en regulador de unión. Posteriormente, se adicionaron 40  $\mu\text{l}$  de una dilución  $10^{-3}$  de DNasa I (Roche, 10 U/ $\mu\text{l}$ ) en regulador de unión 2X y se incubaron por 1.5 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detuvo añadiendo 400  $\mu\text{l}$  de solución de paro (acetato de amonio 570 mM, etanol absoluto 80%, DNA de esperma de salmón 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y se agitó en Vortex por 20 segundos. La precipitación se favoreció colocando las reacciones en hielo seco e incubando después a  $-70^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Después, la mezcla se centrifugó por 30 minutos a 12,000 rpm y la pastilla se lavó primero con 800  $\mu\text{l}$  de etanol absoluto y después con 800  $\mu\text{l}$  de etanol al 70%. Las reacciones se secaron en un Savant por 15 minutos a temperatura media y se resuspendieron en 5  $\mu\text{l}$  de regulador de formamida. Los 5  $\mu\text{l}$  se cargaron en un gel de secuencia de poliacrilamida 8%- urea 7 M-TBE junto con una secuencia del fragmento de DNA usando el mismo oligonucleótido marcado. La electroforesis se llevó a cabo por 4 horas a 50 W. El gel se secó al vacío a  $80^{\circ}\text{C}$  y se expuso en una pantalla de PhosphorImager (Molecular Dynamics) y en una película fotográfica tipo X-Omat (Kodak).

## VI. RESULTADOS

### Determinación del sitio de inicio de la transcripción

Para determinar la posición del promotor e iniciar el análisis detallado de la región reguladora de *espC*, primero definimos el inicio de transcripción a partir de RNA total obtenido de la cepa E2348/69 silvestre, crecida a 37°C en DMEM, condiciones que favorecen la expresión de factores de virulencia en EPEC (Puente *et al.*, 1996; Martínez-Laguna *et al.*, 1999). De acuerdo al resultado de "primer extension" mostrado en la Figura 8A, el sitio de inicio de la transcripción corresponde a un residuo G localizado 118 nucleótidos corriente arriba del inicio de la traducción (ATG). Con base en esto, se localizaron las cajas -35 (TTGATT) y -10 (TATAAA), las cuales contienen 4 y 5 (subrayadas), respectivamente, de las 6 bases presentes en las secuencias -35 y -10 consenso para promotores dependientes de  $\sigma^{70}$  en *E. coli* y que están separadas por 17 pb.

En este experimento también se obtuvo RNA de la cepa E2348/69  $\Delta/er$ , para determinar si el promotor se expresa en ausencia de este gen. Se observó que en esta cepa la actividad del promotor de *espC* se reduce significativamente, lo que indica que requiere de la proteína Ler y corrobora lo reportado anteriormente por Elliott y colaboradores (2000). Además, se utilizó como control un oligonucleótido dirigido hacia el transcrito del gen *ompA*, el cual posee un promotor constitutivo, para demostrar que se utilizó una concentración similar de RNA en ambas reacciones.

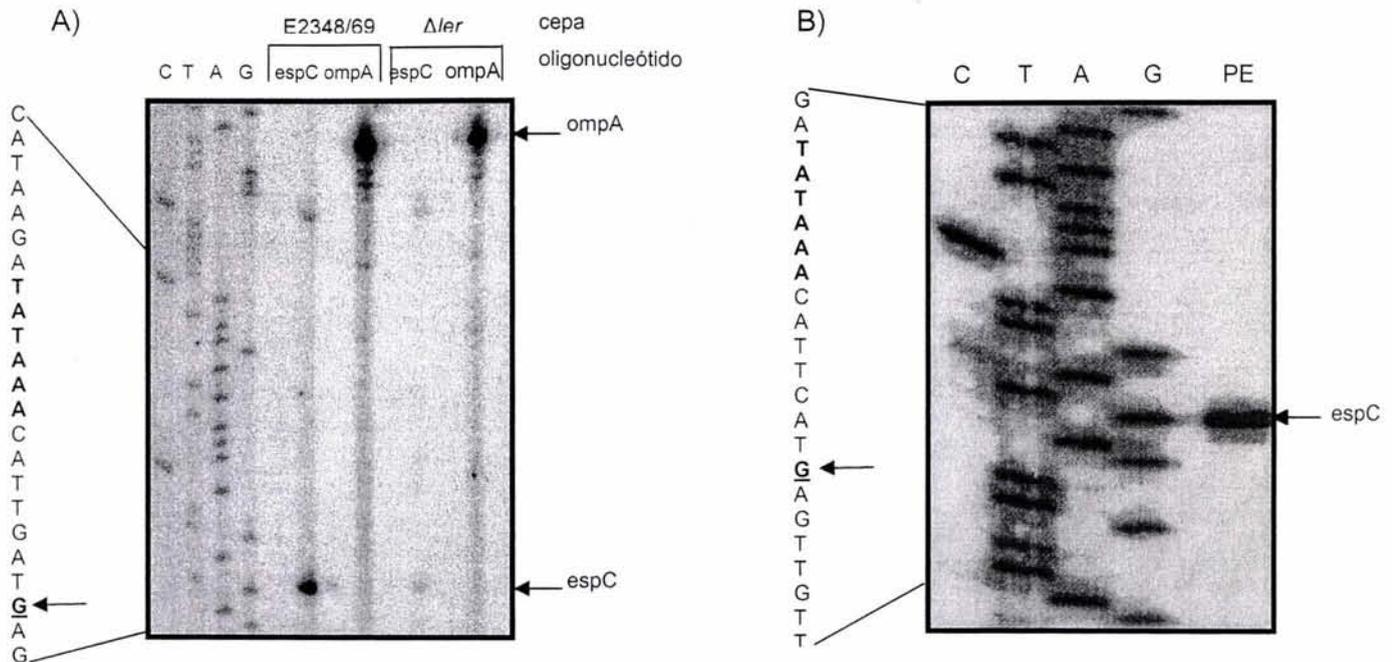


Fig. 8. Experimento de "primer extension". A) con RNA total de las cepas E2348/69 silvestre y  $\Delta ler$ , utilizando para ambas muestras los oligonucleótidos espC-crm y ompA para la reacción de transcripción reversa. B) con RNA total de la cepa silvestre transformada con la fusión más larga (espC-401). En este caso se utilizó el oligonucleótido pKK-H3-R, el cual hibrida específicamente con la secuencia del mensajero producido por la fusión. Las flechas indican el sitio de inicio de la transcripción (subrayado) y la caja -10 propuesta se indica en negritas.

### Construcción de fusiones transcripcionales de la región reguladora de *espC* al gen reportero *cat*

Con el fin de determinar la región reguladora mínima del gen *espC*, así como la presencia de elementos reguladores, se construyeron siete fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* en el vector pKK232-8. Todas las fusiones contienen 24 pb (primeros 8 codones) del extremo 5' del gen estructural (Fig. 9). Las fusiones, con remociones unidireccionales fueron generadas como se describe en "Materiales y Métodos" y comprenden, en orden descendente, hasta la posición -401, -287, -210, -121, -58, -43 y -29 con respecto al inicio de la transcripción. En particular, las fusiones pESPC-58 y pESPC-43 contienen sólo 22 y 7 pb, respectivamente, corriente arriba del promotor propuesto, mientras que la fusión pESPC-29 tiene la caja -10 intacta y dos cambios en la segunda y sexta bases de la caja -35 hechos para generar el sitio de restricción *Bam*HI.

Todas las fusiones se secuenciaron para verificar que la reacción de PCR no introdujera mutaciones que pudieran alterar los resultados.

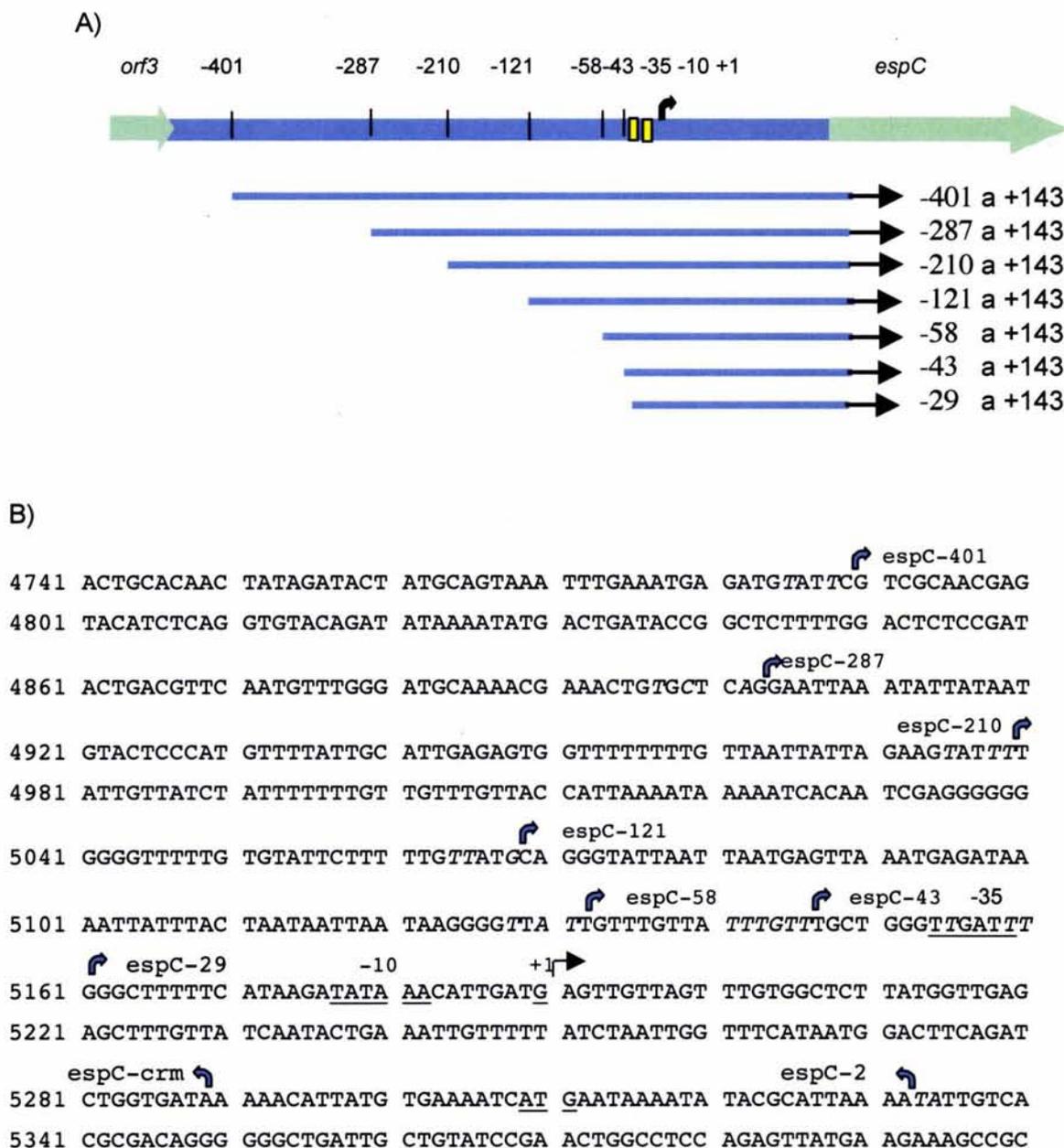


Fig. 9. A) Esquema de las fusiones construidas entre la región reguladora de *espC* y el gen reportero *cat*. Se muestra la posición relativa del sitio de inicio de la transcripción y de las cajas -10 y -35 del promotor. Se indican también las coordenadas de los fragmentos clonados con respecto al sitio de inicio de la transcripción. B) Secuencia nucleotídica de la región intergénica localizada entre los genes *orf3* y *espC*. Están subrayadas las cajas -35, -10 y el inicio de la transcripción, así como el codón de inicio de la traducción. Las flechas indican los límites de las fusiones. En cursivas se indican los cambios para generar el sitio de restricción. *espC-2*: oligonucleótido (reverso) utilizado para generar todas las fusiones, el cual corresponde al extremo 3' de cada fragmento amplificado. *espC-crm*: oligonucleótido utilizado para el "primer extension" que se muestra en la Figura 8A.

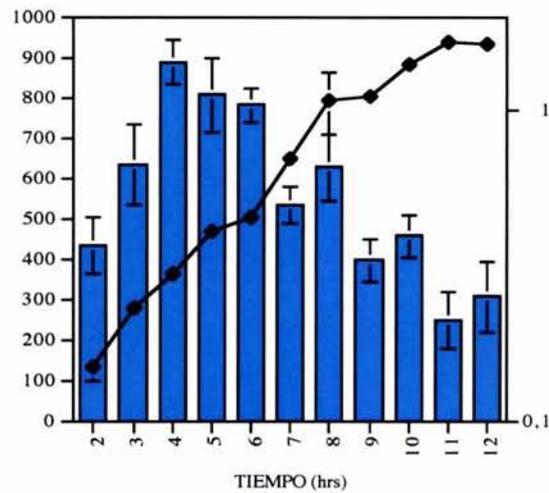
Posteriormente, para corroborar que el promotor activo en las fusiones es el mismo que el promotor del gen cromosomal y para descartar que los resultados obtenidos sean producto de una alteración del promotor en la fusión, se hizo el experimento de “primer extensión” con RNA total de la cepa E2348/69 transformada con la fusión más larga (espC-401). El resultado mostrado en la Figura 8B comprueba que el inicio de la transcripción es el mismo tanto en la fusión como en el cromosoma, por lo que el promotor es el mismo.

### **Curva de actividad**

Con el fin de determinar la cinética de expresión de *espC* y determinar si su expresión está regulada por la fase de crecimiento, se hizo una curva de actividad a lo largo de 12 horas de cultivo de las cepas EPEC E2348/69 y *E. coli* MC4100, transformadas con la fusión espC-401 (pESPC-401) y crecidas en medio de cultivo de células eucariontes DMEM en agitación a 37°C, condiciones previamente reportadas como óptimas para la expresión de los factores de virulencia (Puente *et al.*, 1996; Martínez-Laguna *et al.*, 1999). Se pudo observar que en la cepa MC4100 la fusión no se expresa (datos no mostrados), lo cual nos confirma que requiere de un factor específico de EPEC para activar su expresión y corrobora lo visto con el “primer extensión”. Por otro lado, en la cepa de EPEC la fusión sí se expresa y sus niveles de actividad se muestran en la Figura 10A.

La expresión óptima de *espC* ocurre en la fase logarítmica del crecimiento, alcanzando el pico de actividad a las cuatro horas, la cual se mantiene durante el resto de la fase exponencial. Hacia la fase estacionaria temprana ( $DO_{600}=0.8-1.0$ ) dicha actividad empieza a decaer, sugiriendo que el promotor en esta fase es inactivo.

A)



B)

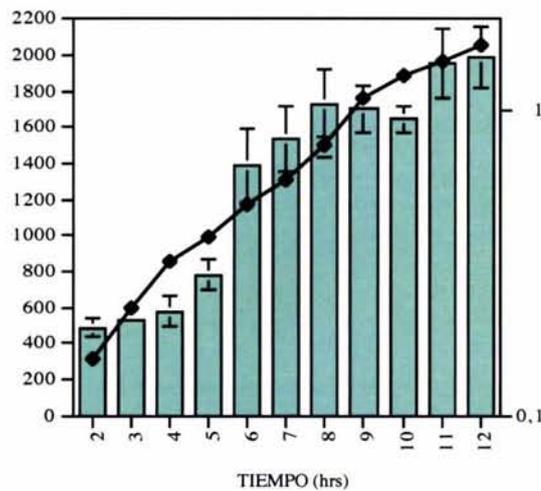


Fig. 10. Curva de actividad de la cepa EPEC E2348/69 transformada con la fusión espC-401(A) y espC-58 (B) a lo largo de 12 horas de crecimiento. Las muestras se tomaron cada hora a partir de las 2 horas. Estas gráficas son el resultado promedio de tres experimentos independientes con duplicado. Las barras representan la actividad de CAT y con cada barra se señala la desviación estándar obtenida. Los diamantes representan la curva de crecimiento medida por densidad óptica a 600 nm.

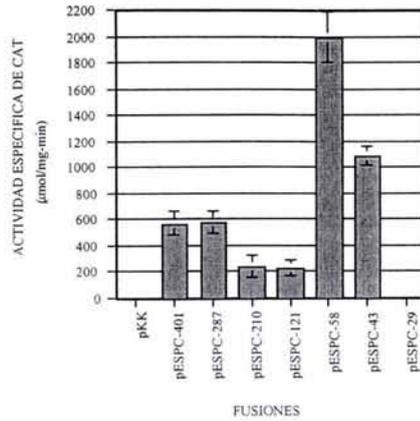
De manera paralela, se determinó la actividad de la fusión espC-58 a lo largo de la curva de crecimiento en la cepa EPEC E2348/69 (Fig. 10B). Durante las primeras 5 horas, su actividad es parecida a la de la fusión pESPC-401. Sin embargo, y a diferencia de lo que se ve con la primera, esta fusión presenta un incremento significativo de actividad hacia la fase exponencial tardía y la estacionaria temprana. Dicha actividad se mantiene a

lo largo de la fase estacionaria. Esto nos sugiere que esta fusión carece de un sitio de regulación negativa, lo que permite el aumento en su expresión a lo largo del tiempo. En su conjunto, estos datos indican que la región reguladora de *espC* posee sitios corriente arriba de la posición -58 que controlan negativamente su expresión a la entrada de la fase estacionaria (ver más adelante).

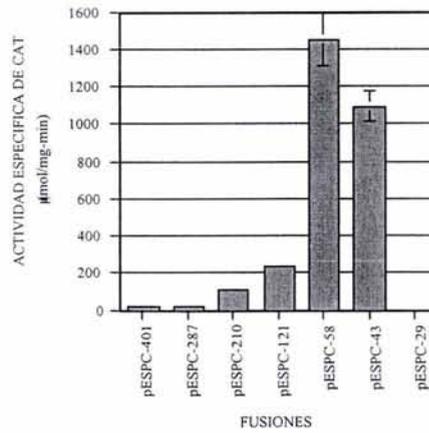
### **Determinación de la región mínima reguladora**

Para determinar la región reguladora mínima del promotor de *espC*, se hicieron ensayos de actividad de CAT de la cepa E2348/69 conteniendo todas las fusiones representadas en la Figura 9; como control negativo se utilizó el vector pKK232-8. En la Figura 11A se puede observar que las fusiones *espC*-401 y *espC*-287 se expresan de manera similar, lo cual indica que los ~130 pb que hay entre ellas no intervienen en la regulación. Por otro lado, las fusiones *espC*-210 y *espC*-121, cuya expresión es similar, se expresan aproximadamente 3 veces menos que las anteriores. Esta disminución en la actividad sugiere que en la región comprendida entre las posiciones -287 a -210 hay un sitio probable de regulación positiva.

A)



B)



C)

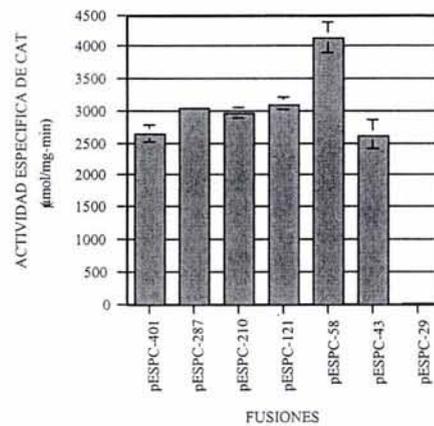


Fig. 11. Actividades de las cepas: A) EPEC E2348/69 silvestre, B) EPEC  $\Delta ler$  y C) EPEC  $\Delta hns$  transformadas con todas las fusiones y cultivadas en DMEM a 37°C con agitación. Las barras representan las actividades obtenidas a partir de muestras tomadas a una  $DO_{600}$  de 1.0 y son el resultado promedio de tres ensayos independientes con duplicado. Con cada barra se muestra la desviación estándar obtenida.

Por otro lado, la fusión espC-58 se expresa aproximadamente 3.5 veces más que las dos primeras fusiones y aproximadamente 11 veces más que espC-210 y espC-121, sugiriendo que en la región comprendida entre las posiciones -121 a -58 existe una región que juega un papel importante en la regulación negativa del gen, que estaría más expuesta que en las fusiones más largas. Por su parte, la fusión espC-43 se expresa aproximadamente 2 veces más que las fusiones más largas (espC-401 y espC-287), 5 veces más que las fusiones intermedias (espC-210 y espC-121) y 50% menos que la más activa (espC-58). La diferencia observada entre las fusiones espC-58 y espC-43 podría deberse a que la fusión espC-58 tiene 22 pb corriente arriba del promotor, lo cual permitiría un mejor pegado de la RNA polimerasa que en la fusión espC-43, que sólo tiene 7 pb corriente arriba. Finalmente, la fusión espC-29 no es activa, debido probablemente a la eliminación parcial de la caja -35 del promotor propuesto de acuerdo al inicio de transcripción.

### **Regiones de espC necesarias para la regulación por Ler**

Como ya se señaló, el regulador Ler es necesario para la expresión de *espC* (Elliott *et al.*, 2000 y Fig. 8A). Con el propósito de identificar las regiones necesarias para la activación de *espC* dependiente de Ler, fue analizada la actividad de CAT de la cepa E2348/69  $\Delta/ler$  conteniendo las distintas fusiones (Fig. 11B). Comparando las actividades obtenidas en la mutante de *ler* con las obtenidas en la cepa silvestre (Tabla 6), tenemos que para las fusiones espC-401 y espC-287 se disminuye drásticamente su actividad, mostrando por abajo del 4% de la actividad alcanzada en la cepa silvestre. Por otro lado, la fusión espC-210 se expresa en ausencia de Ler, aunque no alcanza el nivel que tiene en la cepa silvestre, ya que su actividad se reduce a aproximadamente la mitad. Las fusiones espC-121, espC-58 y espC-43 mantienen su actividad igual que en la cepa silvestre, aunque para la fusión espC-58 se observa un ligero decremento del 27% con respecto a la cepa silvestre, lo que nos indica que su expresión ya no es dependiente de Ler.

Juntos, estos resultados nos sugieren que las fusiones espC-401, espC-287 y la fusión espC-210, aunque en menor grado, contienen motivos que permiten la activación dependiente de Ler. Sin embargo, mantienen un sitio de regulación negativa. De acuerdo

a esto, es posible que Ler interactúe con una secuencia localizada arriba o alrededor de la posición -210 (Fig. 13).

### **Papel de H-NS en la regulación de *espC***

Como ya se mencionó, H-NS es una proteína que se une fuertemente al DNA de forma no específica (Atlung e Ingmer., 1997), preferentemente en secuencias intrínsecamente curvas y ricas en residuos de A's y T's. Se ha visto que esta proteína regula de manera negativa la expresión de genes de virulencia codificados en el LEE (Bustamante *et al.*, 2001; Haack *et al.*, 2003). Para determinar si H-NS reprime la expresión de *espC* e identificar la región que intervendría en la regulación ejercida por esta proteína, se analizó la actividad de las fusiones en la cepa EPEC  $\Delta hns$ .

En la figura 11C se puede ver que, en general, todas las actividades generadas por la cepa  $\Delta hns$  se incrementaron con respecto a las actividades producidas por la cepa silvestre, alcanzando niveles similares en todos los casos, salvo la fusión *espC*-29 la cual, como se esperaba, fue inactiva aún en ausencia de H-NS, corroborando que carece de un promotor funcional. Comparando con la cepa silvestre (Fig. 11A y Tabla 6), tenemos que la actividad de las fusiones *espC*-401 y *espC*-287 aumentó alrededor de 5 veces, de las fusiones *espC*-210 y *espC*-121 alrededor de 13 veces, mientras que de las fusiones *espC*-58 y *espC*-43 poco más de dos veces. Este aumento de actividad nos indica que H-NS está actuando como represor y sugiere que interactúa con dos sitios de pegado que actúan en forma cooperativa, uno localizado alrededor de las posiciones -121 a -58 y otro corriente debajo de la posición -43, ya que incluso las fusiones más cortas aumentaron moderadamente su actividad.

### **Mecanismo de acción de Ler en la regulación de *espC***

Los datos anteriores indicaron que en ausencia de posibles sitios de unión para H-NS la expresión de *espC* es Ler independiente, sugiriendo, a su vez, que Ler actúa como un desrepresor. Para corroborarlo, se cuantificó la actividad de CAT de las cepas *E. coli* MC4100 silvestre y MC4100  $\Delta hns$  transformadas con todas las fusiones. Si Ler es sólo

necesaria para eliminar la represión ejercida por H-NS, todas las fusiones deberían ser activas en la cepa MC4100  $\Delta hns$ , la cual también carece de Ler; por el contrario, si la unión de Ler a la región reguladora de *espC* fuera un requisito para su activación, entonces las fusiones deberían ser inactivas aún en ausencia de H-NS.

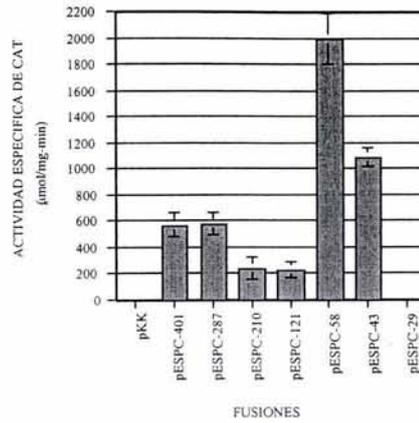
Como se puede observar en la Figura 12B, en la cepa silvestre de *E. coli* MC4100 se expresan las fusiones *espC*-121, *espC*-58 y *espC*-43, lo cual es consistente con la existencia de un motivo de regulación negativa alrededor de la posición  $-121$  y hacia arriba de la  $-58$ . Este comportamiento es similar al que se observa en los ensayos en EPEC  $\Delta ler$ , con la diferencia de que en EPEC también se expresa un poco la fusión *espC*-210. Además, los valores son menores comparados con los obtenidos en la mutante en Ler. La fusión *espC*-43 presenta una actividad aproximadamente 3 veces menor, la fusión *espC*-58 aproximadamente 2 veces, la fusión *espC*-121 aproximadamente 3 veces, mientras que la *espC*-210 no se expresa. Esto sugiere que, además de Ler, posiblemente también se necesite de otro factor presente sólo en EPEC para la óptima activación de *espC* (ver más adelante).

Consistente con lo anterior, en la cepa MC4100  $\Delta hns$  (Fig. 12C) todas las fusiones generan niveles de actividad semejantes, al igual que en la cepa EPEC  $\Delta hns$ , aunque las actividades son menores. Así, la actividad de la fusión *espC*-401 disminuye aproximadamente la mitad, la *espC*-287 aproximadamente 1 vez, la *espC*-210 y *espC*-121 mantienen sus niveles, la *espC*-58 disminuye aproximadamente 1 vez, y la *espC*-43 disminuye aproximadamente 2 veces.

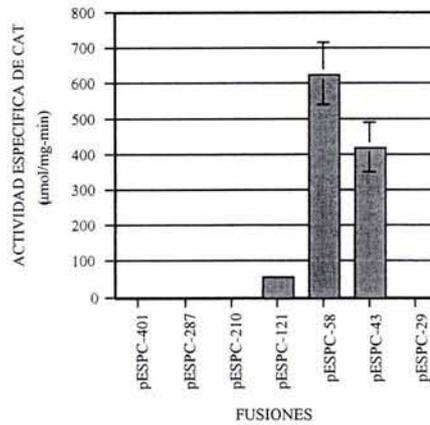
En conjunto, estos resultados nos indican que H-NS está actuando como un represor, ya que al quitarlo la expresión es independiente de Ler. Además, nos sugieren que H-NS podría pegarse en un sitio debajo de la posición  $-43$ , posiblemente sobre o adelante del promotor, ya que, aún para las fusiones que muestran actividad independiente de Ler, al quitar a H-NS la expresión aumenta significativamente.

Así mismo, indican que la función de Ler en la regulación de *espC* es parecida a la que tiene en la regulación de los operones LEE2, LEE3 y LEE5, es decir, eliminar la represión ejercida por H-NS. Pero además, nos sugieren que se necesita de otro factor presente sólo en EPEC para optimizar la expresión de *espC*.

A)



B)



C)

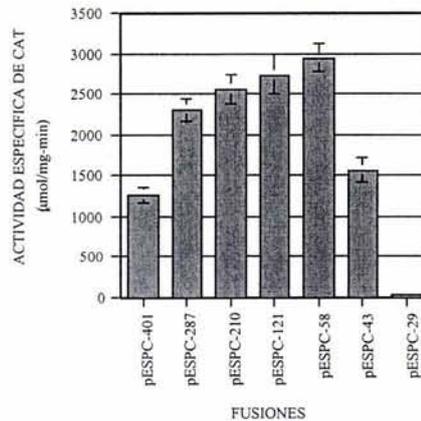


Fig. 12. Actividad de las cepas *E. coli* MC4100 (B) y *E. coli* MC4100  $\Delta hns$  (C) transformadas con todas las fusiones y cultivadas en DMEM a 37°C con agitación. Se utilizó la cepa EPEC silvestre (A) como control. Las barras representan las actividades obtenidas de muestras tomadas a una  $DO_{600}$  de 1.0 y son el resultado promedio de tres ensayos independientes con duplicado. Con cada barra se muestra la desviación estándar obtenida.

Tabla 6. Actividades de las fusiones de *espC* en las distintas cepas.

<b>CEPAS</b> <b>FUSIONES</b>	<b>EPEC</b> <b>silvestre</b>	<b>EPEC</b> <b><math>\Delta ler</math></b>	<b>EPEC</b> <b><math>\Delta hns</math></b>	<b>MC4100</b> <b>silvestre</b>	<b>MC4100</b> <b><math>\Delta hns</math></b>
<b>espC-401</b>	566.57 $\pm$ 89.51 <sup>a</sup>	20.56 $\pm$ 7.17	2662.03 $\pm$ 134.43	0 $\pm$ 0	1260.35 $\pm$ 99.21
<b>espC-287</b>	577.64 $\pm$ 88.12	23.52 $\pm$ 3.14	3038.00 $\pm$ 60.27	0 $\pm$ 0	2304.74 $\pm$ 136.23
<b>espC-210</b>	236.10 $\pm$ 83.51	112.87 $\pm$ 8.88	2979.86 $\pm$ 81.83	0 $\pm$ 0	2562.19 $\pm$ 179.66
<b>espC-121</b>	228.61 $\pm$ 59.82	242.88 $\pm$ 24.35	3107.88 $\pm$ 89.32	58.88 $\pm$ 6.86	2745.19 $\pm$ 238.36
<b>espC-58</b>	1991.04 $\pm$ 194.01	1455.13 $\pm$ 140.62	4134.31 $\pm$ 234.61	625.98 $\pm$ 86.52	2951.70 $\pm$ 174.78
<b>espC-43</b>	1083.77 $\pm$ 72.79	1092.79 $\pm$ 81.91	2630.61 $\pm$ 224.48	419.97 $\pm$ 68.77	1560.01 $\pm$ 144.48
<b>espC-29</b>	0 $\pm$ 0	0 $\pm$ 0	26.47 $\pm$ 10.09	0 $\pm$ 0	35.25 $\pm$ 14.51

a. Desviación estándar.

Hasta aquí, estos resultados nos permiten proponer un esquema de las regiones necesarias para la regulación (Fig. 13). Así tenemos que hasta la posición -287 se tienen todos los elementos requeridos para la regulación, tanto positiva como negativa, de *espC* y la actividad basal en condiciones de represión, es decir, en ausencia de Ler en EPEC. Los elementos presentes hasta la posición -58 permiten la máxima actividad del promotor en cualquier condición, probablemente favoreciendo el óptimo reconocimiento y posicionamiento de la RNA polimerasa en el promotor. De acuerdo con los resultados se puede proponer que al menos un sitio de pegado de Ler se encuentra en la región comprendida entre las posiciones -287 y -210. También es posible que en la región comprendida entre las posiciones -210 y -58 haya un sitio de pegado de un regulador negativo que, de acuerdo con nuestros datos, es H-NS.

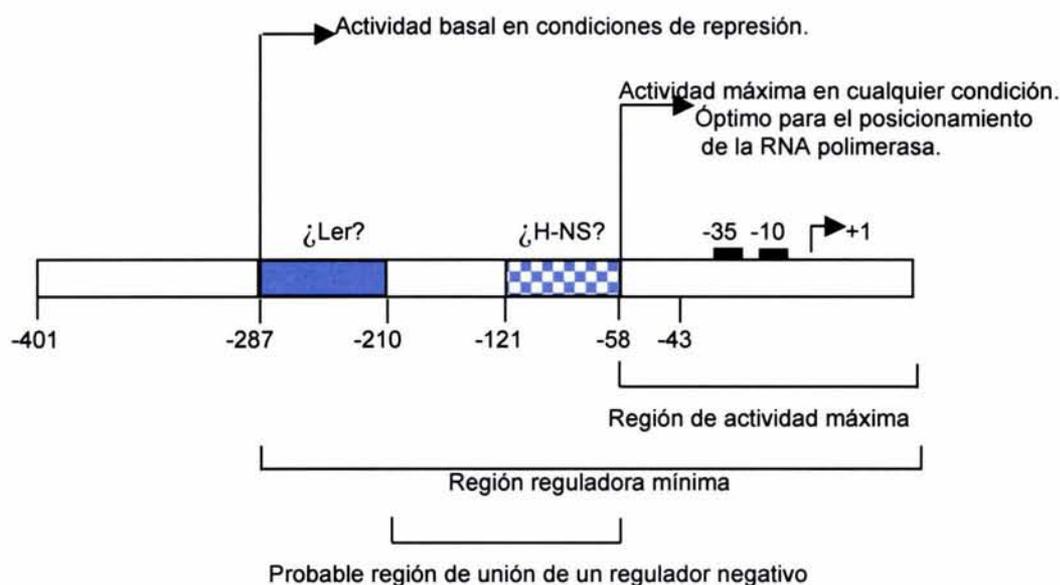


Fig. 13. Representación esquemática de las regiones necesarias para la regulación de *espC*.

## Regulación por medio de cultivo

Con el fin de determinar si, al igual que para otros genes de virulencia de EPEC, el crecimiento en LB, el cual es un medio rico, ejerce un efecto negativo para la expresión de *espC*, se llevó a cabo un ensayo utilizando las cepas silvestre,  $\Delta ler$  y  $\Delta hns$  de EPEC y silvestre y  $\Delta hns$  de *E. coli* MC4100 transformadas sólo con las fusiones *espC*-401, *espC*-121, *espC*-58 y *espC*-29. La gráfica correspondiente se muestra en la Figura 14. Se puede observar que en la cepa EPEC silvestre sólo se expresan las fusiones *espC*-401 y *espC*-58, aunque la actividad de ambas es menor que la que presentan en medio DMEM (Fig. 11A), indicando que existe represión por medio rico. En particular, para la fusión *espC*-58 la represión es de aproximadamente 10 veces. La fusión *espC*-121 no presenta actividad, aunque esto puede deberse a que hay represión por el medio, ya que en DMEM, aunque baja (aproximadamente 200 unidades) sí tiene expresión.

En la mutante en *ler* sólo se expresa la fusión *espC*-58, al mismo nivel que en la cepa silvestre, lo cual corrobora que esta actividad no depende de *Ler*; mientras que la fusión *espC*-401, como se esperaba, no se expresa en ausencia de *Ler*. La falta de actividad de la fusión *espC*-121 se atribuye a la represión por el medio que también se observa en la cepa silvestre.

En la cepa EPEC  $\Delta hns$  se observa la expresión de todas las fusiones, pero no a los mismos niveles que en DMEM, lo cual indica que la represión en LB se lleva a cabo aún en ausencia de H-NS.

En la cepa MC4100, como ya se había mencionado, no se expresa la fusión *espC*-401 ni la fusión *espC*-121. La fusión *espC*-58 se expresa a niveles bajos, lo cual ya se había visto también en medio DMEM. Como se esperaba, en la cepa MC4100  $\Delta hns$  todas las fusiones se expresan y presentan un patrón similar al que tienen en DMEM, la actividad de la fusión *espC*-401 y de la fusión *espC*-121 es menor que la que tienen en EPEC (aproximadamente 33 y 55%, respectivamente), pero la fusión *espC*-58 muestra una actividad un poco mayor en la cepa MC4100 que la que presenta en EPEC (aproximadamente 13 %). La menor actividad en las dos cepas de *E. coli* podría deberse a que la represión en LB no es un fenómeno exclusivo en EPEC, sino que también se lleva a cabo en *E. coli* MC4100 y no está, aparentemente, relacionada con H-NS.

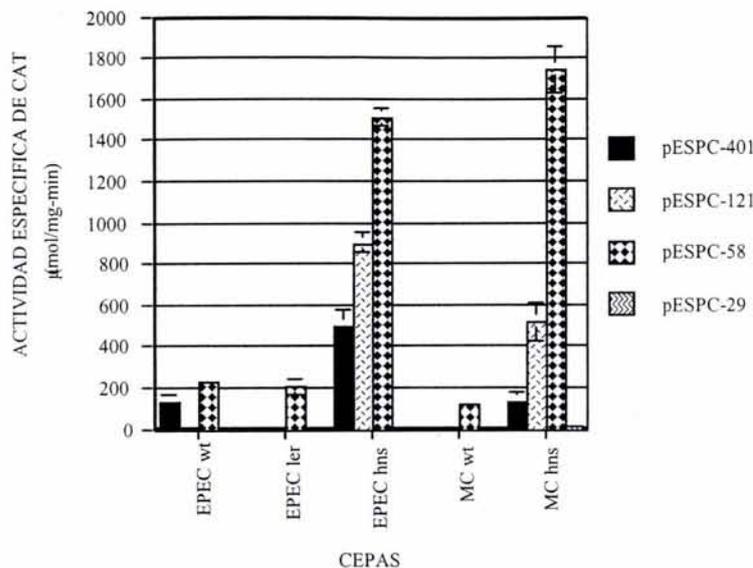


Fig. 14. Actividad de las cepas EPEC silvestre,  $\Delta ler$ ,  $\Delta hns$ , MC4100 silvestre y  $\Delta hns$  transformadas con algunas fusiones de *espC* en medio de cultivo LB: *espC*-401, *espC*-121, *espC*-58 y *espC*-29 y cultivadas a 37°C con agitación. Se muestran las actividades obtenidas de muestras tomadas a una  $DO_{600} = 1.0$  y son el resultado promedio de tres ensayos independientes por duplicado. Con cada barra se muestra la desviación estándar obtenida.

### Inmunodetección de EspC

Para corroborar los resultados obtenidos con los ensayos de las fusiones, es decir, que en ausencia de *Ler* no se detecta actividad de la fusión *espC*-401 y en ausencia de H-NS sí, se realizó un experimento de inmunodetección tipo "western blot". Se utilizaron muestras de extractos totales de EPEC silvestre, EPEC  $\Delta ler$ , EPEC  $\Delta escC$  (la cual tiene afectada la vía de secreción tipo III), EPEC  $\Delta espC$  y EPEC  $\Delta hns$ .

En la figura 15 se muestra el resultado de la inmunodetección en la que se reveló la membrana contra la proteína EspC, la cual se detectó en los extractos de las cepas silvestre, mutante en *escC* y mutante en *hns*. La ausencia de EspC en la cepa mutante en *ler* nos corrobora que éste es necesario para su expresión. Como controles se detectaron las proteínas Tir, EspB y DNAK. En las membranas reveladas con  $\alpha$ -Tir y  $\alpha$ -EspB se

detectaron las proteínas en todas las cepas, excepto en la mutante en *ler*. La ausencia de Tir y EspB en la  $\Delta ler$  es esperada, ya que ambas proteínas son reguladas por Ler. El control con  $\alpha$ -DNAK demuestra que en todos los carriles se cargaron cantidades similares de proteína. La cepa de EPEC mutante en *escC* se utilizó como control de otra mutante al azar en un gen que no codifica para un regulador.

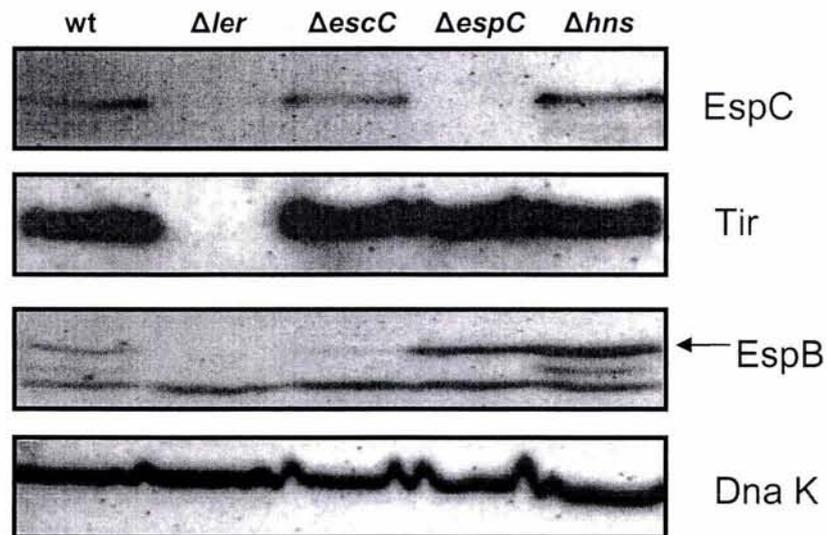


Fig. 15. "Western blot" para detectar EspC. Se utilizaron proteínas de extractos totales de bacterias cultivadas en DMEM. Las cepas utilizadas fueron: 1) E2348/69 silvestre (wt), 2) E2348/69  $\Delta ler$ , 3) E2348/69  $\Delta escC$ , 4) E2348/69  $\Delta espC$ , 5) E2348/69  $\Delta hns$ .

### Ensayos de complementación

Para determinar si Ler es el único regulador positivo necesario para la expresión de *espC*, se complementó la cepa *E. coli* MC4100 transformada con todas fusiones, excepto la fusión *espC*-29, con el plásmido pMPMT3*ler*-4, el cual tiene clonado al gen *ler* bajo el control del promotor *lac*. Con estas cepas se hicieron ensayos de actividad de CAT (Fig. 16).

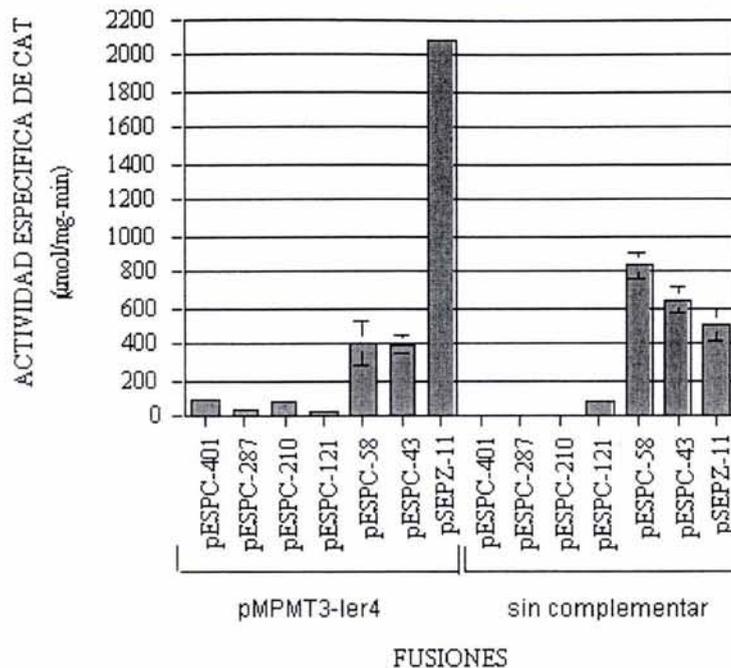


Fig. 16. Ensayo de complementación en *E. coli* MC4100. El plásmido pMPMT3-ler4 fue introducido en la cepa MC4100 conteniendo las fusiones espC-401, espC-287, espC-210, espC-121, espC-58, y espC-43. Como control se incluyeron las mismas cepas sin complementar, así como la fusión pSEPZ-11 (Bustamante *et al.*, 2001). Las barras representan las actividades obtenidas de muestras tomadas a una DO<sub>600</sub> de 1.0 y son el resultado promedio de tres experimentos independientes con duplicado. Con cada barra se muestra la desviación estándar obtenida.

En esta gráfica se observa que la producción de Ler a partir del plásmido pMPMT3-ler4 complementa la expresión de las fusiones espC-401, espC-287 y espC-210, aunque no alcanzan los niveles que tienen en la cepa silvestre de EPEC. Esto puede deberse a que, como se propuso anteriormente, además de Ler, la expresión de *espC* requiere de otro factor que se encuentra sólo en EPEC, o a que, alternativamente, en general, la eficiencia de expresión en la cepa de *E. coli* K-12 MC4100 es menor que en EPEC. Inesperadamente, la expresión de las fusiones espC-121, espC-58 y espC-43 disminuyó a aproximadamente la mitad de la expresión obtenida a partir de la cepa sin complementar, lo cual podría deberse a que la sobreexpresión de Ler tenga un efecto negativo en la expresión de fusiones cuya expresión es independiente de Ler. Como control se utilizó la fusión pSEPZ-11 (de LEE2), que previamente se había demostrado ser dependiente de Ler (Bustamante *et al.*, 2001).

## Interacción de Ler y H-NS con la región reguladora de *espC*

Para determinar si Ler y H-NS se están uniendo a la región reguladora de *espC* se realizaron ensayos de retardamiento de banda (EMSA) utilizando fragmentos de las fusiones *espC*-401 y *espC*-43 amplificados por PCR y marcados radiactivamente. Se utilizaron concentraciones crecientes de las proteínas H-NS-His6X y Ler-His6X purificadas por afinidad a níquel. Las concentraciones utilizadas fueron 0.2  $\mu$ M, 1.2  $\mu$ M y 3  $\mu$ M.

En la figura 17 se muestra el retardo con la proteína H-NS. Como se puede ver, el fragmento *espC* -43 se retarda a una concentración de 1.2  $\mu$ M, mientras que el fragmento *espC*-401 se retarda con 0.2  $\mu$ M, en ambos casos formando un solo complejo con H-NS. Estos datos van de acuerdo con la observación del papel que juega como represor de la transcripción de *espC* (Fig. 13) e indica que la represión es directa. A su vez, sugieren que la mayor afinidad relativa de H-NS por el fragmento largo, en comparación a la mostrada por el corto, podría deberse a la presencia de al menos dos sitios de interacción en el fragmento largo, estando uno de ellos localizado corriente debajo de la posición -43. Lo anterior también lo indica el resultado obtenido con la fusión *espC*-43, la cual sigue siendo reprimida parcialmente por H-NS.

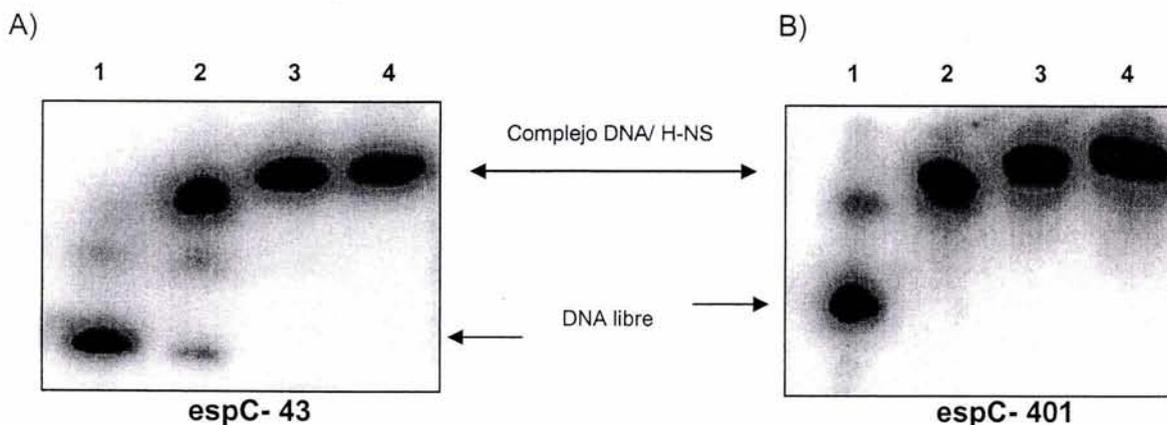


Fig. 17. Ensayo de retardamiento en gel (EMSA) de la región reguladora de *espC* con H-NS. Este ensayo se hizo con los fragmentos *espC*-43 (A) y *espC*-401 (B) colocando las siguientes concentraciones de H-NS: carril 1, 0  $\mu$ M, 2, 0.2  $\mu$ M, 3, 1.2  $\mu$ M, y 4, 3  $\mu$ M.

La figura 18 corresponde a los retardos hechos con Ler. En esta figura se puede observar que, a diferencia de lo que ocurre con H-NS, la concentración de Ler necesaria para que los fragmentos retarden es mayor, ya que a una concentración de 1.2  $\mu\text{M}$  ninguno de los fragmentos se ha retardado completamente. El retardo del fragmento espC-401 era esperado, ya que de acuerdo con los ensayos de actividad transcripcional se propone que habría un sitio de pegado de Ler entre las posiciones -287 y -210 (Fig.13). Sin embargo, el hecho de que el fragmento espC-43 se retarde, nos indica que también tiene un sitio de pegado para Ler, el cual puede estar localizado corriente abajo del promotor. El hecho de que el fragmento largo no haya sido retardado completamente aún con una concentración de 3  $\mu\text{M}$  de Ler, puede deberse a que, al ser más grande, adquiera una conformación que desestabiliza los complejos Ler-DNA, o a que, probablemente el otro factor específico de EPEC, necesario para la eficiente expresión de *espC*, también se requiera *in vitro* para hacer el pegado más eficiente.

Comparando ambos experimentos, podemos ver que la afinidad de H-NS por los fragmentos es mayor que la de Ler, ya que se retardan con una concentración de 0.2  $\mu\text{M}$ , mientras que de Ler se requiere una concentración de 3  $\mu\text{M}$  para obtener el mismo nivel de retardo que H-NS. Juntos, estos experimentos corroboran que hay sitios de pegado para ambas proteínas corriente arriba del promotor, pero también indican que hay sitios de unión para ambas proteínas corriente abajo de éste.

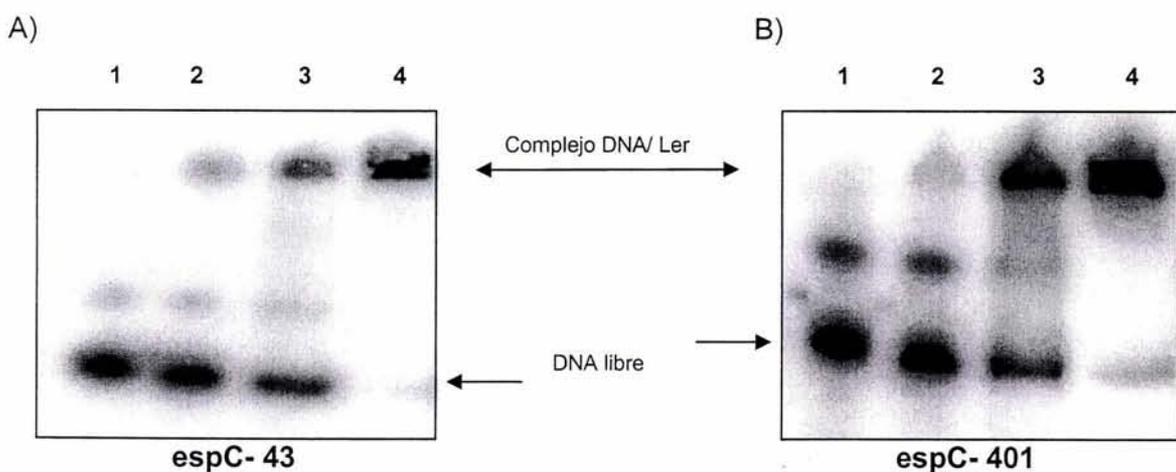


Fig. 18. Ensayo de retardamiento en gel (EMSA) de la región reguladora de *espC* con Ler. Este ensayo se hizo con los fragmentos *espC*-43 (A) y *espC*-401 (B) colocando las siguientes concentraciones de Ler: carril 1, 0  $\mu\text{M}$ , 2, 0.2  $\mu\text{M}$ , 3, 1.2  $\mu\text{M}$ , y 4, 3  $\mu\text{M}$ .

## Ensayo de protección a DNAsa I con Ler

Con los ensayos de retardamiento de banda (EMSA) se observó que incluso el fragmento más pequeño, que sólo contiene el promotor y 7 pb corriente arriba, es retardado en presencia de Ler. Con el fin de corroborar que Ler se está uniendo a esta región, se hizo un ensayo de protección a DNAsa I ("footprinting"), para el cual se utilizó el fragmento *espC*-43 y concentraciones crecientes de Ler (330.6 nM, 661.2 nM, 1305 nM, 2610 nM, 3480 nM, 4350 nM y 5220 nM).

Como se ve en la figura 19, hay una zona de protección hacia la parte inferior, la cual comprende desde la posición +83 hasta la +121. En este experimento no se pudo determinar hasta donde llega la protección, ya que el fragmento utilizado sólo abarca hasta la posición +141, únicamente 20 pb más. Sin embargo, nos sirvió para demostrar que un posible sitio de pegado de Ler se encuentra hacia abajo del promotor, abarcando una porción del gen estructural.

Sperandio y colaboradores (2000) reportaron que en la región reguladora de *LEE2*, Ler protege una región de 121 pb. Considerando que Ler abarque regiones de este tamaño, en el caso de *espC*, y dado los resultados de este estudio, es posible que el sitio de pegado de Ler se extienda hasta la posición +200.

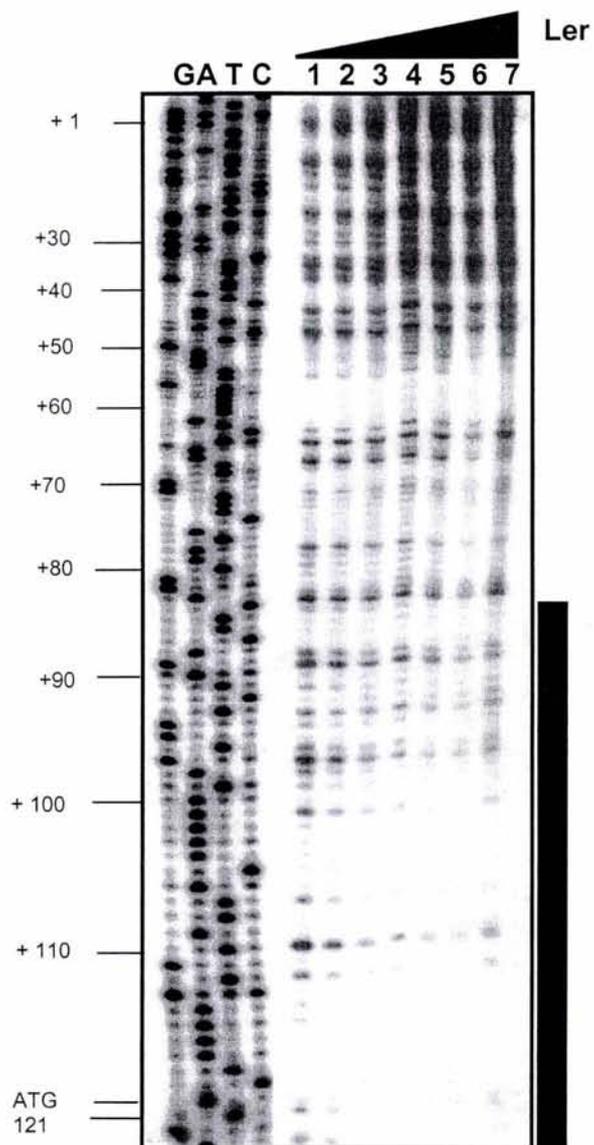


Fig. 19. Ensayo de protección a DNasa I de la región reguladora de *espC*. Se utilizaron las siguientes concentraciones de Ler: carril 1, 330.6 nM, 2, 661.2 nM, 3, 1,305 nM, 4, 2,610 nM, 5, 3,480 nM, 6, 4,350 nM y 7, 5,220 nM. En el margen izquierdo se indican las posiciones con respecto al inicio de la transcripción. La caja negra indica la región de protegida por Ler.

## VII. DISCUSIÓN

EPEC es una categoría de *E. coli* diarrogénica que provoca diarrea infantil en países en vías de desarrollo. Coloniza el epitelio intestinal, donde produce la lesión de adherencia y eliminación de microvellosidades (AE). Esta lesión está mediada por un sistema de secreción tipo III, a través del cual se secretan al medio extracelular varias proteínas efectoras. EPEC secreta al menos seis proteínas, de las cuales sólo EspC es secretada de manera independiente del sistema de secreción tipo III. A pesar de que no se ha demostrado que EspC tenga un papel en la formación de la lesión AE o en la transducción de señales mediada por EPEC (Mellies *et al.*, 2001). Se ha visto que tiene actividad enterotóxica en células en cultivo similar a la producida por la toxina Pet de EAEC (Navarro-García *et al.*, 2004), por lo que no se descarta que tenga algún papel en la virulencia de EPEC.

La regulación de los genes de virulencia es un mecanismo que evita la expresión inadecuada de los factores de virulencia, mientras que asegura su rápida expresión cuando son requeridos (Dorman y Smith, 2001). En el caso de la regulación de *espC*, se ha reportado que la proteína Ler es necesaria para su expresión y se propuso que activa al promotor de manera directa (Elliott *et al.*, 2000). Sin embargo, para los genes codificados en la isla de patogenicidad LEE, se ha visto que Ler no actúa como activador, sino como desrepresor, al eliminar la represión ejercida por la proteína H-NS (Bustamante *et al.*, 2001; Haack *et al.*, 2003). Con base en esto, se planteó como objetivo de este trabajo estudiar la regulación transcripcional de *espC*.

Para estudiar la regulación de *espC*, se determinó el sitio de inicio de la transcripción, el cual correspondió a un residuo G localizado a 118 nucleótidos corriente arriba del codón de inicio de la traducción (Stein *et al.*, 1996). Con base en esto se caracterizó el promotor, el cual tiene la secuencia consenso para promotores dependientes de  $\sigma^{70}$ . Para el reconocimiento por  $\sigma^{70}$ , las secuencias ideales para las cajas -10 y -35 son TATAAT y TTGACA, respectivamente, y el espacio ideal entre ellas es de 17 pb (Dorman y Smith, 2001).

Posteriormente, se determinó que la expresión de *espC* ocurre desde la fase logarítmica temprana de crecimiento, alcanzando el pico de actividad a una densidad óptica de aproximadamente 0.3. Dicha actividad disminuye hacia la fase estacionaria, indicando que *espC* es un gen regulado fuertemente por la fase de crecimiento y que la región necesaria para esta regulación se encuentra corriente arriba de la posición -58, ya que la fusión pESPC-58 no es regulada por la fase de crecimiento. Este resultado plantea la posibilidad de que *EspC* sea importante durante las etapas tempranas de la infección por EPEC, esto queda por definirse. Experimentos realizados con la mutante *espC* en células en cultivo no muestran ningún fenotipo en comparación con la cepa silvestre (Mellies *et al.*, 2001), aunque esto no descarta alguna función *in vivo*.

De acuerdo a lo observado con las fusiones transcripcionales que contienen distintos recortes de la región reguladora de *espC*, se puede ver que aquellas que contienen la región del promotor y unas bases más arriba (*espC*-43 y *espC*-58), se expresan independientemente de Ler, tanto en un fondo de EPEC como en un fondo de *E. coli* K12. Esto significa que *espC* posee un promotor que, en ausencia de secuencias reguladoras localizadas corriente arriba de la posición -58, puede reclutar a la RNA polimerasa eficientemente para dar lugar a la formación de complejos transcripcionales productivos. En particular, en esta fusión (*espC*-58) se eliminó la región corriente arriba del promotor, se removieron sitios de pegado de algún regulador negativo, dejando sólo la región necesaria para el pegado óptimo de la RNA polimerasa. En esta fusión el promotor puede expresarse sin ningún problema, alcanzando la máxima actividad en cualquier condición. También nos sugiere que el sitio de pegado de Ler corriente abajo del promotor ya no es necesario para la expresión.

La falta de actividad de la fusión *espC*-29 apoya la localización del promotor, ya que, el límite de esta fusión está justo sobre la secuencia de la caja -35 propuesta, generando dos cambios y modificando por completo la secuencia inmediatamente antes de esta región.

Como se resume en la Figura 13, los resultados obtenidos con las fusiones transcripcionales permitieron proponer que entre las posiciones -287 y -210 existe un sitio de pegado de Ler. Esto porque las fusiones *espC*-287 y *espC*-401 no se expresan en ausencia de Ler, mientras que las fusiones *espC*-121 y *espC*-210 muestran un nivel de

activación menor pero Ler independiente. Sin embargo, la fusión espC-210 podría aún tener parte del sitio de Ler, ya que su expresión se ve parcialmente afectada en ausencia de éste. A su vez, el claro incremento en la activación de las fusiones espC-58 y espC-43, indica que entre las posiciones -58 y -121 se encuentra probablemente el sitio de unión para un regulador negativo.

Las gráficas de las cepas EPEC y MC4100 mutantes en *hns* demuestran que H-NS está actuando como un regulador negativo para la expresión de *espC*. También nos sugieren que, aunque las fusiones no necesitan de Ler para activarse en ausencia de H-NS, probablemente requieran de Ler para aumentar su expresión, ya que la actividad en EPEC es mayor que en MC4100. Para determinar si Ler por sí sola es capaz de aumentar la expresión de las fusiones en un fondo de *E. coli* K12 silvestre, se hizo el ensayo de complementación (Fig. 16). Con este ensayo se pudo ver que, aunque sí aumenta la actividad de las fusiones espC-401, espC-287 y espC-210, no alcanzan los niveles que tienen en un fondo genético de EPEC, lo cual nos sugiere que se requiere de otro factor diferente de Ler y presente sólo en EPEC para aumentar los niveles de expresión. Las gráficas de las cepas EPEC  $\Delta$ *ler* y MC4100 silvestre apoyan esta idea. Por otro lado, la actividad de las fusiones espC-121, espC-58 y espC-43 disminuye a aproximadamente la mitad, lo cual podría deberse a que la sobre producción de Ler tenga un efecto represor en estas fusiones.

El regulador positivo que, se propone, actúa junto con Ler para lograr la expresión óptima de *espC*, podría encontrarse en cualquier parte del genoma de EPEC, incluyendo el plásmido EAF, o la propia isla *espC*. Para determinar la identidad de este factor sería necesario hacer ensayos con la cepa JPN15, la cual es una derivada de la cepa E2348/69 que está curada del pEAF. O bien, se podría eliminar la isla *espC* y hacer ensayos de actividad. También se podría llevar a cabo una mutagénesis al azar para seleccionar colonias que muestren una disminución en la actividad transcripcional de *espC*. Sin embargo, es probable que el factor que ayuda a Ler a aumentar la expresión de *espC* esté codificado en el locus *per*, ya que Kenny y colaboradores (1995, 1997) mencionan que al complementar a la cepa JPN15 o la cepa silvestre con un plásmido que porta dicho operón, se aumenta la secreción de EspC. En nuestro laboratorio hemos demostrado que la expresión óptima de los genes de la isla LEE ocurre en presencia de PerC, el cual está

codificado en el plásmido EAF (Bustamante *et al.*, 2001). Es posible que PerC actúe para elevar los niveles de expresión de *espC*, aunque esto tendría que ser probado.

Anteriormente se había reportado que en ausencia de Ler no se detectaba EspC (Elliott *et al.*, 2000) y que al complementar la cepa EPEC  $\Delta ler$  se volvía a detectar, por lo que se había propuesto que Ler regula la expresión de *espC* de manera directa. La importancia de Ler en la expresión de *espC* fue corroborada y ampliamente documentada con el "primer extension" (Fig. 8A), con el ensayo de actividad en EPEC  $\Delta ler$  (Fig. 11B), con el ensayo de actividad en *E. coli* MC4100 (Fig. 12B) y con el "western blot" (Fig. 15). Sin embargo, de acuerdo a lo que se vio en este estudio con la cepa MC4100  $\Delta hns$  (la cual proporciona un fondo genético similar al de una cepa EPEC  $\Delta ler \Delta hns$ ), todas las fusiones presentan actividades con un patrón similar al observado en la cepa EPEC  $\Delta hns$ . Por lo anterior, se propone que Ler es necesaria solo para eliminar la represión ejercida por H-NS.

Los ensayos de retardamiento de DNA con H-NS y Ler (Figs. 17 y 18, respectivamente) nos confirman que ambas proteínas están interactuando con la región reguladora de *espC*. Sin embargo, para corroborar que están uniéndose a las regiones propuestas, es necesario hacer ensayos de protección a DNasa I con ambas proteínas en las regiones de pegado propuestas; o bien, hacer ensayos de retardamiento de DNA con diferentes fragmentos de la región reguladora de *espC*.

Observamos que Ler se une al fragmento de la fusión *espC*-43, por lo que se decidió hacer un ensayo de protección a DNasa I en esta región. En la figura 19 se puede apreciar que efectivamente Ler se pega a esta región y que protege una región que se encuentra hacia el gen estructural. Ler protege una región de aproximadamente 40 pb, aunque podría ser mayor. Sperandio y colaboradores (2000) reportaron que, en el operón *LEE2*, Ler protege una región de 121 pb (posiciones -221 a -100). Por su parte, Haack y colaboradores (2003) reportaron que en *LEE5*, Ler protege 117 pb, que corresponden a las posiciones -190 a -73. Para determinar si en el caso de *espC* Ler protege una región de igual tamaño, habría que generar un fragmento que abarque hasta la posición +140 y repetir el ensayo de protección a DNasa I. Además, sería interesante eliminar esta región de pegado en las fusiones transcripcionales para ver si es o no necesaria para la activación de las fusiones transcripcionales.

Los ensayos de retardamiento de banda nos permiten proponer que corriente abajo del promotor de *espC* hay un sitio de unión para Ler y H-NS, además de los sitios propuestos corriente arriba (Fig.13). De acuerdo a esto, es probable que cada proteína se una a su sitio de pegado corriente arriba del promotor, pero estarían compitiendo por el sitio de unión corriente abajo del promotor.

Por último, también se pudo apreciar que, al igual que otros genes de virulencia, *espC* presenta represión por el medio de cultivo, ya que la expresión de las fusiones probadas en LB es menor que la que presentan en DMEM. Probablemente, la región que esté interviniendo en la regulación por medio de cultivo se encuentre sobre el promotor o corriente abajo de éste, ya que la fusión *espC*-58 también tiene disminuida su actividad.

## VIII. CONCLUSIONES

El sitio de inicio de la transcripción se localiza 118 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción y la secuencia del promotor corresponde a la secuencia consenso para promotores dependientes de  $\sigma^{70}$ . Es un promotor constitutivo que no necesita de un activador para expresarse; sin embargo, corriente arriba contiene sitios que intervienen en la regulación por la fase de crecimiento y corriente abajo contiene sitios que intervienen en la regulación por el medio de cultivo. Esta regulación es independiente de H-NS. También se concluye que H-NS actúa como represor al ejercer un efecto negativo sobre la expresión de *espC* y que Ler actúa como desrepresor, ya que se requiere para eliminar la represión. A diferencia de lo que se ha reportado para *LEE2* y *LEE3*, Ler sola no es capaz de llevar a cabo este efecto, sino que requiere de otro factor presente sólo en EPEC. A su vez, se proponen posibles sitios corriente arriba del promotor donde pueden estarse pegando Ler y H-NS, así como un sitio corriente abajo.

## IX. PERSPECTIVAS

- 1) Determinar la afinidad de Ler y H-NS por sus sitios de pegado mediante ensayos de retardamiento de banda. Hacer experimentos de protección a DNAsa I ("footprinting") con Ler y H-NS para determinar exactamente la secuencia en la que se unen en *espC*. En el caso de Ler utilizando un fragmento que abarque una mayor región hacia adentro del gen estructural para determinar el límite de la unión, así como para identificar el segundo sitio.
- 2) Hacer ensayos de actividad con la cepa curada del pEAF para ver si se requiere de algún regulador codificado en el plásmido.
- 3) Eliminar la isla *espC* y hacer ensayos de actividad para determinar si se requiere de alguno de sus genes para aumentar la actividad de *espC*. Construir fusiones de la región reguladora de otros genes de la isla *espC* y probarlas en las cepas  $\Delta ler$  y  $\Delta hns$  de EPEC para determinar si se co-regulan con *espC* mediante un mecanismo similar

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Atlung, T., and H. Ingmer.** 1997. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* **24**(1): 7-17.
- Baldini, M.M., J.B. Kaper, M.M. Levine and H.W. Moon.** 1983. Molecular nature of adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Lancet.* **2**(8343):218.
- Baldwin, T.J., S.F. Brooks, S. Knutton, H.A. Manjarrez-Hernández, A. Aitken and P.H. Williams.** 1990. Protein phosphorylation by protein kinase C in HEp-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **58**: 761- 765.
- Baldwin, T.J., W. Ward, A. Aitken, S. Knutton and P.H. Williams.** 1991. Elevation of intracellular free calcium levels in HEp-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **59**: 1599- 1604.
- Bieber, D., S.W. Ramer, C.Y. Wu, W.J. Murray, T. Tobe, R. Fernandez, and G.K. Schoolnik.** 1998. Type IV Pili, Transient Bacterial Aggregates, and Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* **280**: 2114- 2118.
- Bustamante, V.H., E. Calva and J.L. Puente.** 1998. Analysis of *cis*-acting elements required for *bfpA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**(11): 3013-3016.
- Bustamante, V.H., F.J. Santana, E. Calva, and J.L. Puente.** 2001. Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol. Microbiol.* **39** (39): 664-678.
- Campellone, K.G., A. Giese, D.J. Tipper and J.M. Leong.** 2002. A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. *Mol. Microbiol.* **43**(5): 1227-1241.
- Campellone, K.G. and J.M. Leong.** 2003. Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Curr. Op. Microbiol.* **6**: 82-90.
- Clarke, S.C., R.D. Haigh, P.P.E. Freestone, and P.H. Williams.** 2003. Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a Global Pathogen. *Clinical Microbiol. Rev.* **16** (3): 365-378.
- Crane, J.K. and J.S. Oh.** 1997. Activation of host cell protein kinase C by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **65**: 3277- 3285.
- Deng, W., J.L. Puente, S. Gruenheid, Y. Li, B.A. Vallance, A. Vázquez, J. Barba, J.A. Ibarra, P. O'Donnell, P. Metalnikov, K. Ashman, S. Lee, D. Goode, T. Pawson, and B.B. Finlay.** 2004. Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**(10): 3597-3602.

- DeVinney, R., I. Nisan, S. Ruschkowski, I. Rosenshine, and B.B. Finlay.** 2001. Tir Tyrosine Phosphorylation and Pedestal Formation Are Delayed in Enteropathogenic *Escherichia coli* *sepZ::TnpHoA* Mutant 30-5-1(3). *Infect. Immun.* **69**(1): 559- 563.
- Donato, G.M. and T.H. Kawula.** 1999. Phenotypic Analysis of Random *hns* Mutations Differentiate DNA-binding Activity from Properties of *fimA* Promoter Inversion Modulation and Bacterial Motility. *J. Bacteriol.* **181**(3): 941-948.
- Donnenberg, M.S., J.B. Kaper and B.B. Finlay.** 1997. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol.* **5**(3): 109-114.
- Dorman, C.J.** 2004. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nature Rev.* **2**: 391- 400.
- Dorman, C.J. and S.G.J. Smith.** 2001. Regulation of Virulence Gene Expression in Bacterial Pathogens. En: Principles of bacterial pathogenesis. E.A. Groissman, editor. Academic Press. pp. 75- 132.
- Dutta, P.R., R. Cappello, F. Navarro-García and J.P. Nataro.** 2002. Functional Comparison of Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae*. *Infect. Immun.* **70** (12): 7105-7113.
- Dytoc, M., L. Fedorko and P.M. Sherman.** 1994. Signal transduction in human epithelial cells infected with attaching and effacing *Escherichia coli* *in vitro*. *Gastroenterology.* **106**: 1150- 1161.
- Elliott, S.J., V. Sperandio, J.A. Girón, S. Shin, J.L. Mellies, L. Wainwright, S.W. Hutcheson, T.K. McDaniel., and J.B. Kaper.** 2000. The Locus of Enterocyte Effacement (LEE)-Encoded Regulator Controls Expression of Both LEE- and Non-LEE- Encoded Virulence Factors in Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **68**(11): 6115-6126.
- Falconi, M., M.T. Gualtieri, A. La Teana, M.A. Losso, and C.L. Pon.** 1988. Proteins from the prokaryotic nucleoid: primary and quaternary structure of the 15-kD *Escherichia coli* DNA binding protein H-NS. *Mol. Microbiol.* **2**(3): 323-329.
- Fried, M. and D.M. Crothers.** 1981. Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res.* **9**(23): 6505- 6525.
- Friedberg, D., T. Umanski, Y. Fang, and I. Rosenshine.** 1999. Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **34**(5): 941-952.
- Gauthier, A., J.L. Puente and B.B. Finlay.** 2003. Secretin of the Enteropathogenic *Escherichia coli* Type III Secretion System Requires Components of the Type III Apparatus for Assembly and Localization. *Infect. Immun.* **71**(6): 3310-3319.
- Girón, J.A., A.G. Torres, E. Freer and J.B. Kaper.** 2002. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **44**(2): 361-379.

- Girón, J.A., A.S. Ho and G.K. Schoolnik.** 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*. **254**(5032): 710-713.
- Goldberg, M.D., M. Johnson, J.C.D. Hinton and P.H. Williams.** 2001. Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **41**(3): 549-559.
- Gómez-Duarte, O.G. and J.B. Kaper.** 1995. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **63**(5): 1767-1776.
- Goosney, D.L., S. Gruenheid, and B.B. Finlay.** 2000. Gut Feelings: Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Interactions with the Host. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **16**:173-89.
- Grant, A.J., M. Farris, P. Alefounder, P.H. Williams, M.J. Woodward and C.D. O'Connor.** 2003. Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Mol. Microbiol.* **48** (2): 507-521.
- Haack, K.R., C.L. Robinson, K.J. Miller, J.W. Fowlkes, and J.L. Mellies.** 2003. Interaction of Ler at the *LEE5* (*tir*) Operon of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **71**(1): 384-392.
- Harper, J.R. and T.J. Silhavy.** 2001. Germ Warfare: The Mechanisms of Virulence Factor Delivery. En: Principles of bacterial pathogenesis. E.A. Groissman, editor. Academic Press. pp. 43-61.
- Henderson, I.R., and J.P. Nataro.** 2001. Virulence Functions of Autotransporter Proteins. *Infect. Immun.* **69**(3): 1231-1243.
- Henderson, I.R., F. Navarro-García, and J.P. Nataro.** 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol.* **6**(9): 370- 378.
- Jerse, A.E., K.G. Gicquelais and J.B. Kaper.** 1991. Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **59**(11): 3869-3875.
- Kalman, D., O.D. Weiner, D.L. Goosney, J.W. Sedat, B.B. Finlay, A. Abo and J.M. Bishop.** 1999. Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. *Nat. Cell. Biol.* **1**(6): 389-391.
- Kaper, J.B.** 1996. Defining EPEC. *Rev. Microbiol.* **27**: 130-133.
- Kaper, J.B., J.P. Nataro and H.L.T. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev. Microbiol.* **2**: 123-140.
- Kenny, B.** 2002. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) - a crafty subversive little bug. *Microbiology.* **148**: 1967-1978.
- Kenny, B., A. Abe, M. Stein and B.B. Finlay.** 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* **65**(7): 2606-2612.

- Kenny, B. and B.B. Finlay.** 1995. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**: 7991-7995.
- Knutton, S., M.M. Baldini, J.B. Kaper and A.S. McNeish.** 1987. Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Infect. Immun.* **55**(1): 78-85.
- McDaniel, T.K., K.G. Jarvis, M.S. Donnenberg, and J.B. Kaper.** 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. USA* **92**: 1664-1668.
- Manjarrez-Hernández, H.A., T.J. Baldin, P.H. Williams, R. Haigh, S. Knutton and A. Aitken.** 1996. Phosphorylation of myosin light chain at distinct sites and its association with the cytoskeleton during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect. Immun.* **64**: 2368- 2370.
- Martínez- Laguna, Y., E. Calva and J.L. Puente.** 1999. Autoactivation and environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **33**(1): 153-166.
- Mellies, J.L., S.J. Elliot, V. Sperandio, M.S. Donnenberg, and J.B. Kaper.** 1999. The Per Regulon of Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE) - encoded regulator (Ler). *Mol. Microbiol.* **33**(2), 296-306.
- Mellies, J.L., F. Navarro-García, I. Okeke, J. Frederickson, J.P. Nataro, and J.B. Kaper.** 2001. *espC* Pathogenicity Island of Enteropathogenic *Escherichia coli* Encodes an Enterotoxin. *Infect. Immun.* **69**(1): 315-324.
- Nataro, J.P., and J.B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**(1): 142-201.
- Nataro, J.P., I.C.A. Scaletsky, J.B. Kaper, M.M. Levine, and L.R. Trabulsi.** 1985. Plasmid-Mediated Factors Conferring Diffuse and Localized Adherence of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **48**(2): 378-383.
- Nataro, J.P., K.O. Maher, P. Mackie, and J.B. Kaper.** 1987. Characterization of Plasmids Encoding the Adherence Factor of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **55**(10): 2370-2377.
- Navarro-García, F., A. Canizalez-Román, B.O. Sui, J.P. Nataro, and Y. Azamar.** 2004. The serine protease motif of EspC from enteropathogenic *Escherichia coli* produces epithelial damage by a mechanism different from that of Pet toxin from enteroaggregative *E. coli*. *Infect. Immun.* **72**(6): 3609- 3621.
- Nougayrède, J.P., P.J. Fernandez, and M.S. Donnenberg.** 2003. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell. Microbiol.* **5**(6): 359-372.

- Philpott, D.J., D.M. McKay, P.M. Sherman and M.H. Perdue.** 1996. Infection of T84 cells with enteropathogenic *Escherichia coli* alters barrier and transport functions. *Am. J. Physiol.* **270**: G634- G645.
- Puente, J.L. and B.B. Finlay.** 2001. Pathogenic *Escherichia coli*. En: Principles of bacterial pathogenesis. E.A. Groissman, editor. Academic Press. pp. 388-390, 398-408.
- Puente, J.L, D. Bieber, S.W. Ramer, W. Murria and G.K. Schoolnik.** 1996. The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol. Microbiol.* **20**(1):87-100.
- Ross, W., K.K. Gosink, J. Salomon, K. Igarashi, C. Zou, A. Ishihama, K. Severinov and R.L. Gourse.** 1993. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science.* **262**: 1407- 1413.
- Sánchez-SanMartín, C., V.H. Bustamante, E. Calva and J.L. Puente.** 2001. Transcriptional regulation of the *orf19* gene and the *tir-cesT-eae* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**(9): 2823-2833.
- Sekiya, K., M. Ohishi, T. Ogino, K. Tamano, C. Sasakawa, and A. Abe.** 2001. Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**(20): 11638-11643.
- Shin S., M.P. Castanie-Cornet, J.W. Foster, J.A. Crawford, C. Brinkley and J.B. Kaper.** 2001. An activator of glutamate decarboxylase genes regulates the expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator, Per. *Mol. Microbiol.* **41**(5): 1133- 1150.
- Sircili, M.P., M. Walters, L.R. Trabulsi, and Vanessa Sperandio.** 2004. Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. *Infect. Immun.* **72**(4): 2329-2337.
- Sohel, I., J.L. Puente, S.W. Ramer, D. Bieber, C.Y. Wu and G.K. Schoolnik.** 1996. Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J. Bacteriol.* **178**(9): 2613–2628.
- Sperandio, V., J.L. Mellies, R.M. Delahay, G. Frankel, A. Crawford, W. Nguyen, and J.B. Kaper.** 2000. Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) *LEE2* and *LEE3* operons by Ler. *Mol. Microbiol.* **38**(4):781-793.
- Stein, M., B. Kenny, M.A. Stein, and B.B. Finlay.** 1996. Characterization of EspC, a 110-kilodalton Protein Secreted by Enteropathogenic *Escherichia coli* Which Is Homologous to Members of the Immunoglobulin A Protease-Like Family of Secreted Proteins. *J. Bacteriol.* **178**(22): 6546-6554.
- Tobe, T., G.K. Schoolnik, I. Sohel, V.H. Bustamante, and J.L. Puente.** 1996. Cloning and characterization of *bfp* *TVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**(5): 963-975.

**Touzé, T., R.D. Hayward, J. Eswaran, J.M. Leong, and V. Koronakis.** 2004. Self-association of EPEC intimin mediated by the  $\beta$ -barrel-containing anchor domain: a role in clustering of the Tir receptor. *Mol. Microbiol.* **51**(1): 73-87.

**Trabulsi, L.R., R. Keller and T.A. Tardelli Gomes.** 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* **8**(5): 508-513.

**Umanski, T., I. Rosenshine and D. Friedberg.** 2002. Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**: 2735-2744.

**Vallance, B.A., and B.B. Finlay.** 2000. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**(16): 8799-8806.

**Veiga, E., E. Sugawara, H. Nikaido, V. de Lorenzo and L.A. Fernández.** 2002. Export of autotransported proteins proceeds through an oligomeric ring shaped by C-terminal domains. *EMBO J.* **21**(9): 2122-2131.

**Yona-Nadler, C., T. Umanski, S. Aizawa, D. Friedberg and I. Rosenshine.** 2003. Integration Host Factor (IHF) mediates repression of flagella in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiol.* **149**: 877-884.