



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

ESTUDIO SOBRE EL PAPEL DE PerC Y GrIA EN LA
REGULACION DEL GEN *ler* DE *Escherichia coli*
ENTEROPATOGENA

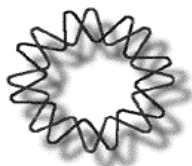
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

MIRYAM IVETTE VILLALBA VELAZQUEZ



Cuernavaca, Morelos, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. José Luis Puente García.

En el comité tutorial participaron:

Dr. Guillermo Gosset Lagarda
Dr. Ricardo Alfredo Grande Cano

El jurado de tesis estuvo integrado por:

Dr. Juan Miranda Ríos
Dr. José Luis Puente García
Dr. David Romero Camarena
Dra. Cinthia E. Nuñez López
Dra. Ma. Brenda Valderrama Blanco

Durante la realización de este trabajo fui becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (registro 185179)

Este trabajo esta dedicado para las personas que casi no me ven en casa: **mi FAMILIA**. Y para las personas con las que convivo la mayor parte del tiempo: **mis amigos y compañeros del laboratorio**

AGRADECIMIENTOS

Mi eterno agradecimiento al Dr. Victor H. Bustamante por la asesoría, críticas y sugerencias a lo largo de este proyecto.

A los investigadores Juan Mauricio Téllez S., Mario Alberto Flores V., Alejandra Vázquez, Jeannette Barba, Ismael Hernández y Julio Augusto Freyre por facilitarme información y proporcionarme sus valiosas críticas.

Al Dr. José Luis Puente por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación y por poner en mis manos un proyecto que significó un gran reto.

INDICE GENERAL

	Pág.
1. Resumen	1
2. Introducción	2
2.1 <i>E. coli</i>	2
2.2 Cepas de <i>E. coli</i> patógenas de humanos.....	3
2.3 <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC).....	6
2.4 Mecanismo de infección.....	6
2.5 Regulación transcripcional de los genes de virulencia de EPEC.....	10
3. Antecedentes y objetivos	15
3.1 Objetivo.....	17
3.2 Objetivos particulares.....	17
4. Materiales y métodos	18
5. Resultados	32
5.1 PerC activa la expresión de <i>ler</i> en <i>E. coli</i> MC4100.....	32
5.2 PerC y GrIA regulan positivamente la expresión de los genes del LEE en diferentes condiciones de crecimiento.....	33
5.3 PerC y GrIA se expresan diferencialmente.....	44
5.4 Identificación de dominios involucrados en la regulación positiva y negativa de <i>ler</i> , así como en la activación mediada por PerC y GrIA.....	47
5.5 Papel de H-NS en la regulación de <i>ler</i> mediado por PerC y GrIA.....	49
5.6 Papel de IHF en la regulación de <i>ler</i> mediada por PerC y GrIA.....	51
6. Discusión y conclusiones	54
7. Bibliografía	64
8. Apéndice	

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
FIGURA 1. Mecanismo de patogenicidad.....	7
FIGURA 2. Mecanismo de regulación.....	11
FIGURA 3. Representación esquemática de las construcciones del operón <i>per</i> y de las fusiones transcripcionales <i>ler-cat</i>	32
FIGURA 4. PerC se requiere para la expresión de <i>ler</i> en <i>E. coli</i> MC4100.....	35
FIGURA 5. Alineamiento de PerC y EpCH.....	36
FIGURA 6. PerC y GrlA regulan la expresión de los genes del LEE en diferentes condiciones de crecimiento.....	40
FIGURA 7. Expresión de las fusiones transcripcionales del <i>pTir-cat</i> y <i>pLEE2-cat</i> en diferentes condiciones de crecimiento.....	42
FIGURA 8. La expresión de <i>ler</i> en EPEC depende de PerC y GrlA en diferentes condiciones de crecimiento.....	43
FIGURA 9. PerC y GrlA activan la expresión de <i>ler</i> independientemente de la condición de crecimiento (agitación o estático).....	45
FIGURA 10. Los promotores que controlan la expresión de PerC y GrlA se expresan diferencialmente en EPEC creciendo en cultivos agitados o estáticos.....	46
FIGURA 11. Expresión de las fusiones transcripcionales de la región reguladora de <i>ler</i> en diferentes condiciones de crecimiento.....	49
FIGURA 12. Caracterización de la región reguladora de <i>ler</i> necesaria para la activación mediada por PerC y GrlA.....	50
FIGURA 13. Activación de <i>ler</i> en ausencia de H-NS.....	51
FIGURA 14. PerC y GrlA no requieren de IHF a diferentes niveles para la expresión de <i>ler</i>	52
FIGURA 15. Mecanismo de regulación propuesto para PerC y GrlA en la expresión de <i>ler</i>	59

LISTA DE TABLAS

	Pág.
TABLA 1. Cepas patógenas de <i>E. coli</i>	3
TABLA 2. Cepas bacterianas.....	18
TABLA 3. Plásmidos utilizados.....	19
TABLA 4. Oligonucleótidos.....	20
TABLA 5. Antibióticos.....	22
TABLA 6. Endonucleasas de restricción.....	22

1. Resumen

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es un bacilo Gram-negativo que se caracteriza por causar daño a las células epiteliales intestinales sin secretar ningún tipo de toxina. Es una de las causas principales de diarrea en niños menores de seis meses de edad en países en vías de desarrollo. EPEC cuenta con dos elementos genéticos involucrados en la patogenicidad. Uno de ellos es el plásmido EAF (*EPEC adherence factor*), en donde se encuentran codificados los operones *bfp*, que contiene los genes involucrados en la biogénesis de la fimbria BFP (*Bundle-forming pilus*) y *per*, que codifica para tres reguladores transcripcionales PerA, PerB y PerC. El segundo elemento es la isla de patogenicidad LEE (*Locus of enterocyte effacement*), que codifica para un sistema de secreción tipo III y para proteínas efectoras, translocadoras y chaperonas, así como para los reguladores transcripcionales positivos GrIA y Ler y el regulador negativo GrIR. Los primeros estudios realizados con GrIA en *Citrobacter rodentium* han demostrado que participa en la expresión de *ler* a través de un circuito de regulación positiva donde, a su vez, Ler regula la expresión del operón *grlRA*. PerC, por su parte, tiene homólogos en *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Trabajos realizados por otros grupos y el nuestro sugieren que PerC podría participar en la regulación de *ler*.

Este trabajo tuvo como finalidad estudiar los mecanismos mediante los cuales GrIA y PerC regulan la transcripción de *ler*. Para abordar dicho objetivo se construyeron mutantes isogénicas de la cepa silvestre de EPEC (E2348/69) en el operón *per* y en *grlA*. En dichas mutantes se observó que GrIA y PerC regulan positivamente la activación de *ler*, pero en diferentes condiciones de crecimiento. Estos resultados fueron confirmados mediante el análisis de los perfiles de secreción de proteínas de cada cepa, así como por el análisis de la expresión de proteínas codificadas en el LEE por inmunodetección. Por medio de fusiones transcripcionales que comprenden la región reguladora de *ler* se identificaron los elementos *in cis* que intervienen en la regulación negativa y positiva de la expresión de *ler* incluyendo las regiones en las cuales PerC y GrIA podrían estar actuando. Estas se encuentran localizadas entre las posiciones de -54 a +217 con respecto a su inicio de transcripción. Tanto GrIA como PerC requieren de IHF para llevar a cabo la expresión de *ler*.

2. INTRODUCCION

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo que pertenece a la familia de las enterobacterias. Es el microorganismo anaerobio facultativo más predominante de la flora colónica humana. Coloniza el tracto gastrointestinal de infantes después de algunas horas del nacimiento^{9, 30}. Este microorganismo fue descrito en un inicio por el pediatra Theobald Escherich en 1885 nombrándolo "*Bacterium coli commune*". Durante varias décadas, *E. coli* ha sido uno de los organismos más estudiados desde el punto de vista genético y bioquímico, y es utilizado también en la producción a gran escala de proteínas recombinantes. Fue en este microorganismo donde se comenzó a estudiar la maquinaria molecular que comprende a los seres vivos. Su cromosoma está formado por 4 639 221 nucleótidos, de los cuales el 90% codifica para proteínas y el 10% restante está relacionado con mecanismos de regulación. Hasta el momento se conoce aproximadamente la mitad de las funciones de su genoma; la otra mitad esta en proceso de conocerse ya que por medio de métodos experimentales y bioinformáticos se pueden predecir algunas de las funciones que aún no han sido descritas¹².

El hábitat natural de *E. coli* es el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente y humanos^{8, 18}. Es considerado como un agente comensal de la microflora intestinal. Por medio de transferencia horizontal algunas cepas de *E. coli* han adquirido una serie de genes de virulencia que le han proporcionado características de patogenicidad. Estos factores de virulencia pueden estar codificados en plásmidos, bacteriófagos o en islas de patogenicidad. Las islas son específicas de cepas patógenas, se encuentran insertadas en genes que codifican para tRNA, presentan un contenido de G+C diferente al del DNA hospedero y contienen genes que codifican para integrasas y transposasas que principalmente están asociadas a elementos móviles¹⁶.

2.2 Cepas de *E. coli* patógenas de humanos

De acuerdo con las investigaciones realizadas por la Organización Mundial de la Salud la diarrea es uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial, ya que se registran cerca de dos millones de muertes cada año por esta causa, principalmente en la población infantil menor de 5 años. Las infecciones causadas por las cepas patógenas de *E. coli* pueden limitarse a la superficie de la mucosa o pueden llegar a diseminarse por el cuerpo causando tres tipos de enfermedades: infección del tracto urinario (UTIS), enfermedades entéricas (diarrea) y sepsis/meningitis. Las cepas de *E. coli* que causan enfermedades gastrointestinales en el humano se han clasificado en las siguientes categorías: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* difusoadherente (DAEC). Sin embargo, se conocen también patógenos extraintestinales de *E. coli* como es *E. coli* uropatógena (UPEC), que causa daño en las vías urinarias y *E. coli* asociada a meningitis y sepsis (MNEC) (Tabla 1). Estas cepas se han clasificado de acuerdo a su mecanismo de patogenicidad, fenotipo de adhesión sobre células epiteliales, producción de toxinas e invasividad^{9,37,52}. A continuación se describirán algunas de las características de cada una de estas categorías.

Tabla 1. Cepas patógenas de *E. coli*

Humanos		Animales
Intestinales	Extraintestinales	Intestinales
<i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	<i>E. coli</i> uropatógena (UPEC)	REPEC*
<i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	<i>E. coli</i> asociada a meningitis y sepsis (MNEC)	REDEC-1*
<i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)*		PEPEC*
<i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)*		DEPEC*
<i>E. coli</i> difusoadherente (DAEC)		<i>Citrobacter rodentium</i> *
<i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)		

* Patógenos A/E estos patógenos desarrollan un fenotipo característico conocido como adhesión y eliminación de microvellosidades del intestino (A/E), lo cual sucede cuando la bacteria se adhiere a la superficie de la célula hospedera. Los patógenos A/E inducen la acumulación de actina y reorganización de proteínas asociadas al citoesqueleto permitiendo la formación de un pseudópodo extendido o pedestal sobre el cual la bacteria se adhiere estrechamente^{9, 18,37}.

E. coli enterotoxigénica (ETEC). Provoca diarrea acuosa, coloniza la parte proximal del intestino delgado. La colonización está mediada por varias fimbrias o por factores de colonización fibrilar (CFs). Durante el proceso de adhesión no causa cambios morfológicos en las células epiteliales del hospedero. Produce dos enterotoxinas: una termolábil (LT) y una termoestable (ST). Es la causa mayor de diarrea del viajero en adultos de países industrializados y en niños de países en vías de desarrollo. Fue en esta cepa en la cual se describieron los primeros factores de virulencia^{52, 64}.

E. coli enteroinvasiva (EIEC). Causa diarrea acuosa que puede ir acompañada de sangre y moco, en humanos causa también disentería. La diarrea acuosa que produce en ocasiones puede ser confundida con la diarrea ocasionada por otras cepas patógenas de *E. coli*. Desde el punto de vista bioquímico, genético y patológico se encuentra relacionada con *Shigella* spp. Se multiplica intracelularmente para pasar posteriormente a otra célula del epitelio. No produce toxinas^{52, 64}.

E. coli enteropatógena (EPEC). Produce diarrea severa en niños menores de seis meses de edad, puede ser mortal y va acompañada de vómito y fiebre. Se adhiere a las células del intestino delgado, y forma parte de la familia de patógenos A/E (del inglés *attaching and effacing*), los cuales causan la destrucción de las microvellosidades intestinales. EPEC fue el primer organismo donde se caracterizó que bacterias pertenecientes a esta familia poseen un gen que codifica para su propio receptor, mediante el cual se adhieren a la célula que infectan⁵².

E. coli enterohemorrágica (EHEC). Causa diarrea con sangre (colitis hemorrágica), así como el síndrome urémico hemolítico (HUS). Coloniza el intestino grueso. El reservorio principal de EHEC es el tracto intestinal bovino, por lo que el consumo de carne contaminada es el medio más común para la transmisión de la infección con esta bacteria. Produce una toxina similar a la shiga de *Shigella* (Stx). Se conocen dos tipos principales de Stx: Stx1 tiene mayor similitud con la de *Shigella* y Stx2 que presenta mayor asociación con cepas de EHEC que causan síndrome urémico hemolítico. EHEC pertenece a la familia

de patógenos A/E. La secuencia genómica de dos cepas del serotipo O157:H7, que es el más frecuente en brotes epidémicos en países desarrollados y el de mayor índice de mortalidad, muestra la presencia de varias inserciones cromosomales de grupos de genes que no están presentes en *E. coli* K12 (conocidas como islas O) que codifican para factores de virulencia⁶⁴.

E. coli enteroagregativa (EAEC). Causa diarrea persistente en niños menores de seis meses. Se adhiere a la mucosa del intestino delgado y grueso, en un patrón conocido como adherencia agregativa (AA). No causa cambios histológicos en las células. Secreta enterotoxinas que dañan la mucosa como son Pet, Pic y la enterotoxina estable al calor 1 (EAST1)^{52,64}.

E. coli difusoadherente (DAEC). No presenta una relación estrecha con la producción de diarrea como en el caso de las otras categorías patógenas de *E. coli*. Afecta principalmente a niños menores de 12 meses. En cultivos de células epiteliales se ha observado el patrón de adherencia difusa, el cual está dado por las adhesinas F1845 y AIDA-I⁶⁴.

E. coli uropatógena (UPEC). Coloniza principalmente el tracto urinario, presenta también varios tipos de pilus, los cuales le permiten adherirse de manera específica, además de brindarle la capacidad de colonizar varios sitios a lo largo del tracto urinario y otros ambientes. Algunas cepas de UPEC producen una cápsula de polisacárido ácida que le sirve de protección².

E. coli asociada a meningitis y sepsis (MNEC). Es la causa común de meningitis por bacterias Gram-negativas, puede ser mortal y causar daños neurológicos en los sobrevivientes. Esta bacteria viaja por el torrente sanguíneo y atraviesa la barrera entre la sangre y el cerebro, de esta manera afecta el sistema nervioso central³⁷.

2.3 *E. coli* enteropatógena (EPEC)

EPEC fue la primer clase de *E. coli* relacionada con brotes de diarrea infantil en los años 1940 y 1950. En 1955 Neter y colaboradores introdujeron el término *E. coli* enteropatógena (EPEC), para describir aquellas cepas patógenas de *E. coli* que raras veces se encontraban en las heces fecales de individuos sanos y estaban presentes en muestras de individuos que presentaban diarrea⁸. EPEC es uno de los causantes de diarrea infantil, provoca diarrea acuosa crónica acompañada de fiebre y vómito, coloniza el intestino delgado y no invade³⁰. EPEC se transmite vía fecal-oral, ya sea por manos o comida contaminada. En adultos la infección más común es por medio de los alimentos, el proceso de infección puede ser asintomático, mientras que en los niños la infección sucede por estar en contacto con otros niños enfermos. El periodo de incubación es de 1 a 3 días. Por medio de estudios serológicos realizados con cepas aisladas de niños enfermos de diarrea y niños saludables se pudo reconocer a EPEC como cepa patógena⁴⁸.

⁵².

Como se mencionó anteriormente EPEC es miembro de la familia de patógenos A/E, algunos son patógenos de humanos, otros son patógenos de animales como son REPEC y REDEC-1 que infectan conejos, en cerdos se ha identificado PEPEC, en perros DEPEC y en ratón a *Citrobacter rodentium* (Tabla 1). Todas estas bacterias producen su propio receptor, inducen la polimerización de actina en el sitio de adhesión y la formación del pedestal³⁰.

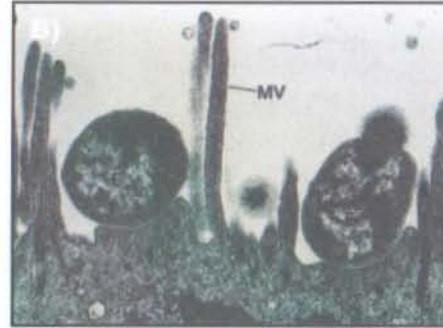
2.4 Mecanismo de infección

El proceso de infección de EPEC inicia con la formación de agregados bacterianos (microcolonias) sobre la célula hospedera. Este fenotipo se conoce como adherencia localizada⁵² y está mediado por la fimbria BFP (*Bundle-forming pilus*), la cual mantiene las interacciones entre las bacterias asociadas a la microcolonia y, probablemente, al menos en parte, su asociación a la célula (Fig. 1A)⁶⁴. Los genes que se requieren para la formación

Adherencia localizada



Adhesión y destrucción de microvellosidades



Adherencia íntima

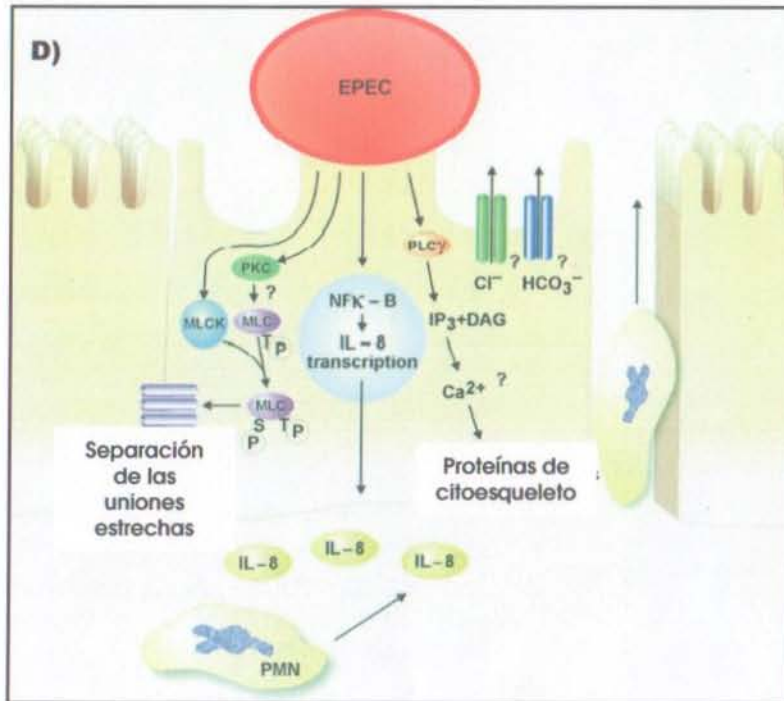
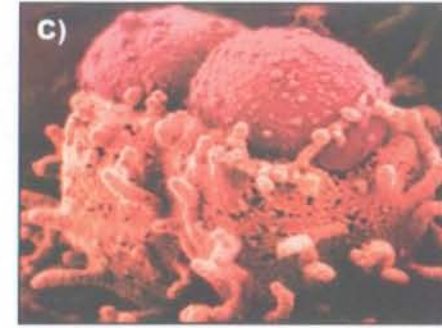


Figura 1. Mecanismo de patogenicidad de EPEC. **A)** Adherencia Localizada, primera etapa del proceso de infección, se lleva a cabo el contacto de EPEC con la célula epitelial a través del BFP. **B)** Adhesión y destrucción de microvellosidades, esta se considera la segunda etapa, por medio de un sistema de secreción tipo III se comienzan a translocar proteínas hacia la célula epitelial, las cuales se van a encargar de liberar señales de transducción. **C)** Se muestra el pedestal de actina, el cual es característico de la última etapa, en esta etapa existe un contacto más directo entre la célula y EPEC. **D)** Representación esquemática del mecanismo de patogenicidad y las diferentes señales de transducción que se liberan (Tomado de 30, 37).

de esta fimbria se encuentran en el operón *bfp* que está localizado en un plásmido de alto peso molecular llamado EAF (*EPEC adherence factor*) que es característico de las cepas de EPEC (Fig. 2)^{29,63}. En la etapa inicial de la infección participan otras proteínas que pueden estar cumpliendo un papel de adhesinas como es el caso de EspA, LifA/Efa1 (Figura 1)⁶⁴.

Una vez que se ha establecido la microcolonia se desarrolla el segundo fenotipo característico conocido como adhesión y eliminación de microvellosidades (A/E) (Fig. 1B). Los genes que se requieren para este fenotipo se encuentran codificados en la isla de patogenicidad LEE (*Locus of enterocyte effacement*) (Fig. 2)^{9, 52}. Durante esta etapa hay un contacto directo entre EPEC y la célula epitelial, esto tiene como consecuencia la eliminación de las microvellosidades, lo cual sucede de forma particular en el sitio de adhesión bacteriana y no afecta grandes áreas del intestino³⁰. Para esto, EPEC secreta e inyecta a la célula epitelial una serie de proteínas a través de un sistema de secreción tipo III (SSTT) codificado en la isla de patogenicidad LEE, el cual es esencial para formar la lesión A/E. Este sistema funciona como una jeringa molecular que permite translocar desde el citoplasma bacteriano proteínas efectoras hacia el citoplasma de la célula hospedera¹⁵. En EPEC el SSTT está formado por los productos de aproximadamente 20 genes. Las proteínas que son secretadas por medio de este sistema se dividen en dos grupos: a) proteínas efectoras, las cuales son translocadas a la célula hospedera donde subvierten o modifican funciones celulares a favor de la bacteria; b) proteínas que conforman el translocón, las cuales son necesarias para que las proteínas efectoras puedan ser translocadas a la célula hospedera. La proteína EspA se encarga de formar el conducto por el cual van a viajar las proteínas efectoras. Dicho filamento presenta una longitud de 0.7 μm ; EspB y EspD forman el poro del translocón es decir, son las proteínas que van a formar la entrada hacia el interior de la célula^{15, 30}. Las proteínas efectoras que se translocan por este sistema son las proteínas de secreción Esp (*EPEC secreted proteins*), EspB, EspF, EspG, EspH, EspZ, Map (*mitochondrion-associated protein*) y Tir (*Translocated intimin receptor*)^{36,52}. Recientemente, se describió la presencia de proteínas efectoras que están codificadas fuera del LEE en diferentes organismos A/E, como son

EspFu, EspJ, Cif y Nle's, aunque aún se sabe poco de cómo actúan estas proteínas; sin embargo, su translocación depende del SSTT. La secuencia de varios patógenos A/E ha revelado la presencia de muchas islas de patogenicidad en donde se encuentran codificados otros factores de virulencia que pueden ser translocados por el SSTT¹⁵.

Tir es una proteína de 72-78 kDa, la cual es translocada por el SSTT a la célula hospedera en donde es fosforilada. Una vez que se fosforila se integra a la membrana de la célula hospedera adoptando una estructura tipo horquilla, cuyos extremos amino y carboxilo tienen dominios transmembranales y la parte central de la proteína forma un dominio extracitoplásmico que contiene la región de reconocimiento para intimina³⁰. El contacto directo entre EPEC y la célula hospedera se establece por medio de la proteína intimina, ubicada en la membrana externa de EPEC cuya función es reconocer a Tir que se inserta en la membrana externa de la célula hospedera; a este proceso se le conoce como adherencia íntima (Fig. 1C)⁵², Tir e intimina son esenciales para formar la lesión A/E. Intimina no sólo se requiere para mediar la adherencia íntima, sino que también participa en la inducción de la respuesta celular del hospedero tanto de manera dependiente como independiente de Tir¹⁵. Los dominios intracelulares de Tir interactúan con proteínas del citoesqueleto como son la actina, N-WASP, VASP, Nck, talina, ezrina y el complejo Arp2/3^{27,30}. En conjunto, estas interacciones promueven la polimerización de actina, que posteriormente da lugar a la formación del pedestal de actina debajo del sitio de contacto. Con base a esto Tir es uno de los responsables del anclaje de EPEC sobre la membrana plasmática de la célula hospedera. Este fenotipo ha sido caracterizado *in vitro* utilizando líneas celulares^{27,30}.

La formación del pedestal correlaciona con la habilidad de los organismos A/E para colonizar el intestino y causar enfermedad en el humano y otros hospederos⁶⁴. Los pedestales que forma EPEC miden alrededor de 10µm; estas estructuras no son estáticas. La movilidad del pedestal formado por EPEC está dada por la continua actividad de polimerización y despolimerización de actina³⁰.

Otros eventos importantes que se observan una vez que EPEC ha translocado las proteínas efectoras son: el cambio en el estado de fosforilación de varias proteínas de la célula hospedera, como es el caso de la cadena ligera de miosina (MLC) que fosforilada puede alterar la permeabilidad de las uniones estrechas contribuyendo así a la producción de diarrea; la inhibición del cambio de fase de G₂/M durante el ciclo celular; la muerte celular por apoptosis. Dentro de los cambios fisiológicos que suceden durante el proceso de infección es la producción de interleucina 8 y la migración de leucocitos polimorfonucleares en el sitio de infección^{27, 30}.

2.5 Regulación transcripcional de los genes de virulencia de EPEC

Los genes de virulencia se encuentran codificados en islas de patogenicidad, y su expresión se encuentra regulada frecuentemente por reguladores transcripcionales que están codificados en la isla o en plásmidos. En este proceso pueden participar también reguladores transcripcionales globales que no son únicos para las cepas patógenas, sino que están conservados incluso en cepas no patógenas, como *E. coli* K12³⁷.

EPEC cuenta con dos elementos genéticos en donde se encuentran codificados importantes factores de virulencia: uno de ellos es el plásmido EAF (pEAF) de 65 Kpb y el otro elemento es la isla de patogenicidad LEE de 35 Kpb (Fig. 2). En el pEAF se encuentra codificado el operón *bfp*, constituido por 14 genes que codifican para las proteínas involucradas en la biogénesis del BFP. Un segundo operón, conocido como *per* (*plasmid encoded regulator*), está formado por tres genes *perA*, *perB* y *perC*, conocidos también como *bfpTVW*^{29, 52, 63}. El producto de *perA* es el encargado de activar la expresión del operón *bfp*, además de regular su propia expresión^{33, 42} (Fig. 2). La expresión de *bfpA* y *perA* varía dependiendo de las condiciones ambientales, considerándose óptimas para su expresión, en condiciones de laboratorio, el crecimiento a 37°C en medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*); a temperaturas menores de 37°C se reprime la expresión de estos genes por medio del regulador transcripcional H-NS⁶⁵. La expresión de *bfpA* y *perA* también se regula negativamente en presencia de sales de amonio⁴². Se ha

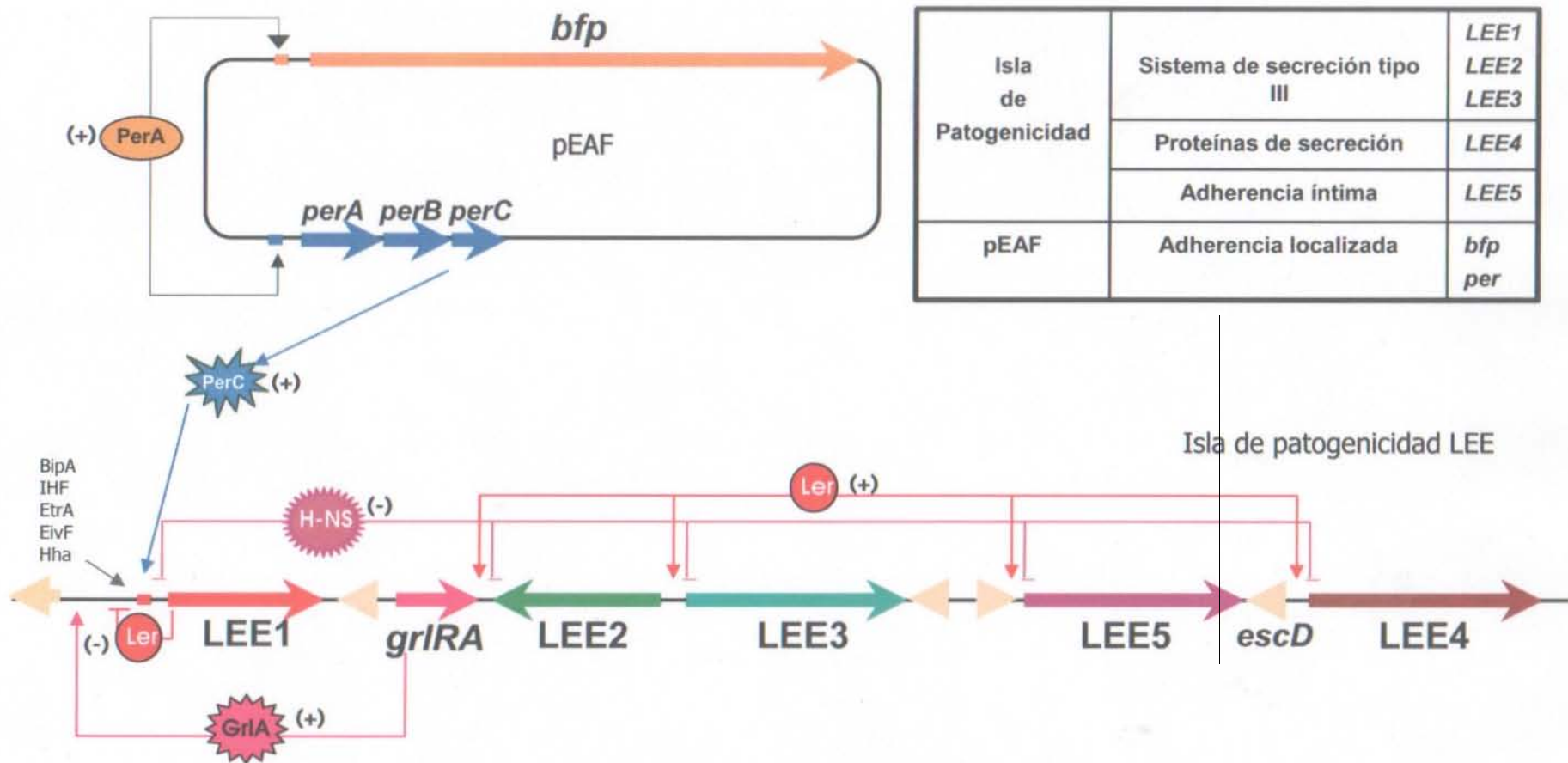


Figura 2. Esquema de regulación de factores de virulencia. En el plásmido EAF se encuentra codificado el operón *bfp*, el cual contiene los genes necesarios para la producción de la fimbria. El gen *bfpA* es el primero de este operón y codifica para la subunidad estructural de la fimbria BFP, y su expresión se encuentra controlada por la proteína PerA, codificada por el primer gen del operón *perABC*. Este, a su vez, se autoregula. Se ha propuesto que PerC se encarga de regular la expresión de Ler en la isla de patogenicidad. Los operones *LEE1*, *LEE2*, *LEE3*, *LEE4* y *LEE5* se encuentran reprimidos por el regulador global H-NS. Con excepción de *LEE1*, los operones de *LEE2* a *LEE5* y el operón *grlRA* son desreprimidos por Ler. La expresión de los genes de la isla de patogenicidad y del plásmido EAF está regulada por las condiciones ambientales.

propuesto que estas condiciones ambientales determinan el sitio de colonización de EPEC²¹. GadX es un activador transcripcional de los genes que codifican para la producción de glutamato descarboxilasa; sin embargo, en EPEC también regula negativamente la expresión de *perA*, y podría estar involucrado en la expresión de genes que se requieren para resistencia a condiciones ácidas o de otros genes de virulencia⁶⁰. Las cepas de EPEC que carecen del pEAF no sólo pierden la capacidad de adherirse a la célula hospedera, sino también se vuelven menos virulentas de acuerdo con un estudio realizado en voluntarios⁵.

Los genes necesarios para formar la lesión A/E se encuentran codificados en el cromosoma en la isla de patogenicidad LEE^{22,52}. El LEE presenta 41 marcos de lectura abierta que están dispuestos en cinco operones; sin embargo también se han identificado otras unidades de transcripción independientes de estos operones, como es el caso del operón *grlRA*^{4,17}. Al igual que *bfpA* y *per* se ha observado que la expresión óptima de los genes del LEE es en DMEM a 37°C^{6,42}.

Entre los patógenos A/E se encuentra altamente conservada la isla de patogenicidad LEE (en términos de tamaño y organización de genes), lo cual sugiere que la isla proviene de un ancestro común²⁸. Si se comparan a nivel genético se encuentran mayormente conservadas las islas de EPEC y EHEC, mientras que la isla de *C. rodentium* varía con respecto a las anteriores. Las diferencias que existen entre las islas es la disposición de los genes *rorf1* y *espG*, en EPEC y EHEC se encuentran localizados en el extremo 5' de la isla corriente arriba de *ler*, mientras que en el LEE de *C. rodentium* se encuentran en el extremo 3' corriente abajo de *espF*. Otra diferencia es el sitio en el cual se encuentran insertadas las islas, el LEE de las cepas E2348/69 de EPEC y EDL933 de EHEC se encuentra insertado en el tRNA *selC*, mientras que el LEE de *C. rodentium* se encuentra insertado cerca de un operón que codifica para un sistema de transporte ABC. Tanto en EPEC, EHEC y *C. rodentium* se conservan los factores de virulencia y los reguladores transcripcionales específicos del LEE, esto habla de su importancia en el proceso de infección^{16,28}.

El LEE codifica para una variedad de proteínas. En los operones *LEE1*, *LEE2* y *LEE3* se encuentran codificadas proteínas que forman parte del SSTT, en *LEE4* están los genes que codifican para las proteínas que forman el translocón EspA, B y D, en *LEE5* los genes que codifican para las proteínas involucradas con la adherencia íntima como son Tir e intimina y dispersos en el LEE genes que codifican para proteínas efectoras como EspH, EspF, EspZ, EspF y Map o chaperonas como CesT y CesD; sin embargo, también se encuentran codificados algunos reguladores transcripcionales como es el caso de Ler (*LEE encoded regulator*), el operón *grlRA*, el cual está formado por los genes que codifican para proteínas reguladoras identificadas como GrlR (*global regulator of LEE represor*) y GrlA (*global regulator of LEE activator*)^{6,11,17,36}.

Para que los genes de la isla de patogenicidad se expresen se requiere de Ler, codificado en el operón *LEE1*. Ler es una proteína de 15 KDa, que actúa como regulador específico de genes asociados con virulencia. Presenta un dominio de unión a DNA en el carboxilo terminal, el cual conserva 36% de similitud y 15% de identidad con la familia de proteínas de pegado a DNA H-NS/StpA³². Ler al igual que H-NS son proteínas citoplásmicas³². H-NS es un regulador global de genes *housekeeping*, se pega preferentemente a regiones curvas del DNA (usualmente ricas en A y T) causando cambios en el superenrollamiento y empaquetamiento, lo que a su vez influye en la expresión genética^{44,55}. H-NS reprime la expresión de los genes *LEE*, así como de diferentes genes de *E. coli*. El mecanismo de acción de Ler se estudió en un inicio en los operones divergentes *LEE2* y *LEE3*, en donde se observó que H-NS se pega a las secuencias silenciadoras 1 y 2 que flanquean a los promotores de los operones *LEE2* y *LEE3*, lo que permite que se forme un complejo represor de moléculas de H-NS que han multimerizado. Para eliminar esta represión, Ler se pega a la región silenciadora 1, de esta forma desestabiliza al complejo represor y por lo tanto promueve la expresión de los operones *LEE2* y *LEE3*, un mecanismo similar se observó para el operón *LEE5*^{6,32}. En una doble mutante $\Delta ler \Delta hns$, los genes del LEE se expresan constitutivamente. Basándose en los estudios anteriores se propuso que Ler actúa como desrepresor, es decir, quitando el efecto negativo ocasionado por H-NS. Ler regula también genes de virulencia que se encuentran codificados en una segunda isla de

patogenicidad identificada hasta el momento como isla de patogenicidad *espC*^{3, 6,40}.

La cascada de regulación que se ha definido para la expresión de *ler* es compleja, los diferentes reguladores han sido identificados y estudiados en EPEC, EHEC y recientemente en *C. rodentium*. Los reguladores globales que participan en la regulación de *ler* son BipA, Fis, IHF y H-NS. BipA pertenece a la superfamilia de GTPasas de pegado al ribosoma, controla la expresión de los genes del LEE de manera independiente de los reguladores del operón *per*, o de IHF y H-NS. Además, BipA regula de manera negativa los genes del flagelo de EPEC³¹. Fis (*F*actor for *i*nversion *s*timulation) es una proteína asociada al nucleoide, coordina la expresión de genes relacionados con virulencia, movimiento y de genes metabólicos que permiten la adaptación del patógeno al ambiente del intestino^{44,54,55}. IHF (*I*ntegration *H*ost *F*actor) es una proteína de pegado a DNA compuesta de dos subunidades, es considerada una proteína tipo histona, reconoce un consenso específico en el DNA en donde forma un complejo nucleoproteico. En EPEC se pega corriente arriba del promotor de *ler* y se requiere para su expresión^{26,44,55}. Hha ha sido clasificada dentro del grupo de proteínas asociadas al nucleoide, como YmoA que regula la expresión de genes de virulencia, en EHEC Hha regula de forma negativa la expresión de *ler*^{55,59}. Estudios recientes relacionados con los reguladores específicos de los patógenos A/E, señalan que Ler regula de forma negativa su propia expresión⁴. Los genes que codifican para GrIR y GrIA, el primero considerado como un regulador negativo y el segundo como activador, forman un operón en el LEE. Trabajos recientes proponen que GrIR regula negativamente la función de GrIA, mientras que GrIA regula la expresión de *ler*^{17,35}. Como se mencionó en párrafos anteriores PerC se encuentra codificado en el plásmido EAF, diversos trabajos proponen que PerC regula la expresión de *ler*^{6, 50,51}. Sin embargo, se desconoce el mecanismo y los factores involucrados para que PerC active a *ler*.

3. ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El operón bicistrónico *grlRA* se encuentra localizado en la isla de patogenicidad LEE entre los operones *LEE1* y *LEE2*. La función de los genes que integran el operón *grlRA* fue propuesta a partir de un estudio realizado en *C. rodentium*, en donde se observó que mutaciones en *orf10* y *orf11*, incrementan o reducen, respectivamente, la expresión de *ler*. Con base en estos resultados al producto de *orf10* se le denominó GrlR (*global regulator of LEE repressor*) y al de *orf11*, GrlA (*global regulator of LEE activator*). GrlA es una proteína de 16 kDa que presenta un dominio potencial de unión a DNA del tipo HTH (*Helix-Turn-Helix*) y que comparte 37% de identidad con un presunto regulador transcripcional de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y 23% con el activador transcripcional CaiF involucrado en la síntesis de carnitina en enterobacterias¹⁷. A la fecha, la función de GrlA como regulador positivo en la expresión de *ler*, no ha sido confirmada en EPEC o EHEC^{3, 17}. Por otro lado, GrlR no presenta homología con algún factor transcripcional descrito, pero es considerado un regulador negativo dada la marcada represión que ejerce sobre la expresión de los genes del LEE cuando está presente en multicopia¹⁷. Probablemente GrlR regula la expresión de los genes del LEE a través de GrlA, con quien podría establecer interacciones proteína-proteína¹¹.

Los genes que comprenden el operón *per* fueron estudiados inicialmente por Gómez-Duarte y colaboradores. Identificaron el operón *per* mediante la selección de genes que fueron capaces de activar una fusión cromosomal al gen de intimina (*eae*). Tobe y colaboradores identificaron el operón *per* utilizando una biblioteca de DNA construida a partir de DNA total o de DNA de plásmido EAF de EPEC, las cuales fueron utilizadas para buscar genes cuyos productos fueran capaces de complementar la expresión de la fusión *bfpA-cat* en una cepa de *E. coli* de laboratorio. En ambos estudios se identificó un fragmento del plásmido EAF que contenía tres marcos de lectura a los que se les denominó *perA*, *perB* y *perC*, también llamados *bfpT*, *bfpV* y *bfpW*^{29, 63}.

Estudios posteriores, demostraron que la presencia del operón *perABC* incrementaba la secreción de las proteínas EspA, EspB y Tir y favorecía la

adhesión de EPEC a células HEp-2 en cultivo²⁹. Otros estudios han indicado que una versión multicopia del operón puede activar la expresión del gen *ler* en *E. coli* K-12 o en una cepa curada del plásmido EAF⁴⁷.

Los productos del operón *per* presentan las siguientes características:

PerA es una proteína de 274 aminoácidos con un peso molecular de aproximadamente 31 kDa, que presenta 32% de similitud en su extremo carboxilo terminal con los reguladores de la familia AraC/XylS²⁹. PerA es el activador de la expresión del operón *bfp*, así como de su propia expresión^{42,63}. Para activar estos genes PerA se une a una secuencia de aproximadamente 40 pb rica en A y T, localizada corriente arriba de cada promotor³³.

PerB es una proteína de 130 aminoácidos, presenta un peso molecular aproximado de 14.8 kDa y presenta baja similitud con proteínas de pegado a DNA de organismos eucariontes²⁹. Hasta el momento la función de PerB no ha sido definida, pero es considerada como una proteína que modula negativamente la expresión de *perA* y *bfpA*⁵⁷.

PerC está constituida por 90 aminoácidos, con un peso molecular de 9.4 kDa^{29,63}. Se sabe que no se encuentra involucrada en la regulación de *bfpA* y *per* ya que cuando éste se elimina, la expresión no se afecta⁴⁹. Estudios realizados en el laboratorio mostraron que un plásmido que sólo contiene *perC* puede activar la transcripción de *ler* en *E. coli* K12, sugiriendo que PerC participa en la cascada de regulación sobre los operones del LEE⁶. Sin embargo, otros estudios contrastan con estas observaciones, ya que la expresión de los genes del LEE no se afectaron significativamente en ausencia del plásmido EAF^{6,49}. Recientemente, se describieron cinco homólogos de PerC en EHEC a los que se les denominó *pch* (*perC* *homologue*), siendo *pchA*, *pchB* y *pchC* los que tienen un efecto en la expresión de los genes de la isla de patogenicidad³⁵. Al hacer un alineamiento de PerC y las proteínas homólogas se identificó una región conservada en el extremo amino terminal que es importante para su función. De acuerdo con estas características se ha propuesto que PerC y las proteínas Pch formaran la familia *PerC-like* (proteínas

tipo PerC), siendo la proteína prototipo PerC de EPEC^{35,50}. Los miembros de esta familia son capaces de activar al promotor del operón *LEE1* tanto de EPEC como de EHEC.

Considerando que GrIA es indispensable para la activación de *ler* en *C. rodentium*, en este trabajo nos propusimos definir el papel que juegan PerC y GrIA en EPEC donde ambos están presentes y de esta manera aclarar la polémica que se ha generado por varios años alrededor de la función que tiene PerC en la expresión de los genes de la isla de patogenicidad (LEE).

OBJETIVO:

Analizar el papel de PerC y GrIA en la expresión de *ler* en *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Analizar la expresión de *ler* mediante fusiones transcripcionales *ler-cat* en una cepa de *E. coli* K-12, en presencia de diferentes componentes del operón *per* o de *grIA*.
- Analizar la expresión de *ler* y de otros factores de virulencia en EPEC y en mutantes isogénicas en cada uno de los genes que integran el operón *per* o en *grIA* crecidas en diferentes condiciones.
- Definir elementos reguladores en la región reguladora de *ler* necesarios para su activación mediada por PerC o GrIA.
- Evaluar la participación de H-NS e IHF en la regulación de *ler* mediada por PerC o GrIA.

4. Materiales y métodos

Cepas y plásmidos

En la tabla siguiente se enlistan las cepas y plásmidos que se utilizaron en este trabajo, así como las características de cada una de ellas.

Tabla 2. Cepas bacterianas

CEPA	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
<i>E. coli</i> MC4100	<i>F</i> - <i>araD139</i> Δ (<i>argF-lac</i>) <i>U169 rpsL150 (Str)</i> <i>relA1 flbB5301 deoC1 ptsf25 rbsR</i>	New England Biolabs
JPMC1	MC4100 <i>hns</i> ::Km	Vázquez A. Datos no publicados.
JPMC2	MC4100 <i>himA</i> ::Km	Vázquez A. Datos no publicados.
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F</i> - <i>h s d R 1 7 thi-1 gyrA</i> Δ (<i>lacZYA-aragF</i>) <i>supE44 recA1</i> (ϕ 80d Δ <i>lacZM15</i>) <i>relA</i>	New England Biolabs
EPEC E2348/69	EAF ⁺ , <i>eae</i> ⁺ , LEE ⁺ , O127:H6 Cepa prototipo silvestre de EPEC. Stp ^R	29
JPEP1	E2348/69 <i>perA</i> ::Km Stp ^R .	Este trabajo.
JPEP2	E2348/69 <i>perB</i> ::Km Stp ^R .	Este trabajo.
JPEP3	E2348/69 <i>perC</i> ::Km Stp ^R .	Vázquez A. Datos no publicados.
JPEP4	E2348/69 <i>epcH</i> ::Km Stp ^R .	Vázquez A. Datos no publicados.
JPEP5	E2348/69 <i>ler</i> ::Km Stp ^R .	Vázquez A. Datos no publicados.
JPEP6	E2348/69 <i>grlA</i> ::Km Stp ^R .	Vázquez A. Datos no publicados.
JPEP7	EAF ⁻ , <i>eae</i> ⁺ , LEE ⁺ , O127:H6 Stp ^R Cepa curada del plásmido EAF, derivada de la cepa JPEP2	Este trabajo.
JPEP8	JPEP7 <i>epcH</i> ::Km Stm ^R .	Vázquez A, Datos no publicados.
JPEP9	JPEP7 <i>ler</i> ::Km Stm ^R .	Vázquez A. Datos no publicados.
JPEP10	JPEP7 <i>grlA</i> ::Km Stm ^R .	Vázquez A. Datos no publicados.

Tabla 3. Plásmidos utilizados

PLÁSMIDOS	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
pMPPM-K3	P15 ori, Km ^R . Vector para clonación	43
pMPPM-T3	P15 ori Tc ^R . Vector para clonación	43
pKK232-8	Derivado del pBR322 que contiene el gen <i>cat</i> (cloranfenicol acetil transferasa) sin promotor, utilizado para la construcción de fusiones transcripcionales. Ap ^R	Pharmacia Biotech
pCS-ABC	Derivado del pMPPM-K3. Presenta clonado el operón <i>per</i> en los sitios de restricción <i>Bam</i> HI-SacI. Km ^R .	57
pCS-AB	Derivado del pCS-ABC. Presenta una eliminación en fase del gen <i>perC</i> . Km ^R .	57
pCS-AC	Derivado del pCS-ABC. Presenta una eliminación en fase del gen <i>perB</i> . Km ^R .	57
pCS-BC	Derivado del pCS-ABC. Presenta una eliminación en fase del gen <i>perA</i> . Km ^R .	57
pCS-A	Derivado del pCS-ABC. Presenta una eliminación en fase de los genes <i>perB</i> y <i>perC</i> . Km ^R .	57
pCS-C	Derivado del pCS-ABC. Presenta una eliminación en fase de los genes <i>perA</i> y <i>perB</i> . Km ^R .	57
pTEP-GrlA1	Derivado del pMPPM-T3. Presenta clonado el gen <i>grlA</i> de EPEC en los sitios de restricción <i>Xho</i> I- <i>Hind</i> III. Tc ^R .	Este trabajo
pTEP-PerC1	Derivado del pMPPM-T3. Presenta clonado el gen <i>perC</i> en los sitios de restricción <i>Bam</i> HI-SacI, el inserto se tomó del plásmido pCS-C. Tc ^R .	Este trabajo.
pTEP-Ler1	Derivado del pMPPM-T3. Presenta clonado el gen <i>ler</i> en los sitios de restricción <i>Bam</i> HI-SacI, Tc ^R .	Tovar A. Datos no publicados.
pler-1179	Derivado del pKK232-8 que contiene la región reguladora de <i>ler</i> , a partir de los nucleótidos -1179 a +217, respecto al inicio de la transcripción, fusionados al gen <i>cat</i> . Fusión transcripcional <i>ler-cat</i> . Ap ^R	Bustamante et al. Datos no publicados
pler-779	Derivado del pKK232-8 que contiene la región reguladora de <i>ler</i> , a partir de los nucleótidos -779 a +217 respecto al inicio de la transcripción. Ap ^R	Bustamante et al. Datos no publicados
pler-260	Derivado del pKK232-8 que contiene la región reguladora de <i>ler</i> , a partir de los nucleótidos -260 a +217 respecto al inicio de la transcripción. Ap ^R	Bustamante et al. Datos no publicados
pler-160	Derivado del pKK232-8 que contiene la región reguladora de <i>ler</i> , a partir de los nucleótidos -160 a +217 respecto al inicio de la transcripción. Ap ^R	Bustamante et al. Datos no publicados
pler-98	Derivado del pKK232-8 que contiene la región reguladora de <i>ler</i> , a partir de los nucleótidos -98 a +217 respecto al inicio de la transcripción. Ap ^R	Bustamante et al. Datos no publicados

PLÁSMIDOS	CARACTERÍSTICAS	REFERENCIA
pler-54	Derivado del pKK232-8 que contiene la región reguladora de <i>ler</i> , a partir de los nucleótidos -54 a +217 respecto al inicio de la transcripción. Ap ^R	Bustamante et al. Datos no publicados
pler-31	Derivado del pKK232-8 que contiene la región reguladora de <i>ler</i> , a partir de los nucleótidos -31 a +217 respecto al inicio de la transcripción. Ap ^R	Bustamante et al. Datos no publicados
pCAT201	Derivado del pKK232-8 que contiene la región reguladora de <i>bfpA</i> , a partir de los nucleótidos -201 a +76 respecto al inicio de la transcripción. Ap ^R	6
pTIR394 (pTir-cat)	Derivado del pKK232-8 que contiene la región reguladora de <i>tir</i> , a partir de los nucleótidos 394 a +1 respecto al inicio de la transcripción	56
pSEPZ-11	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional de la región intergénica entre los operones <i>LEE2</i> y <i>LEE3</i> , a partir de la posición -469 a +121 respecto al inicio de la transcripción del primer gen del operón <i>LEE2</i> . Ap ^R	6
per-cat	Derivado del pKK232-8 que contiene la región reguladora de <i>per</i> , a partir de los nucleótidos -166 a +69 respecto al inicio de la transcripción	42
grlRA-cat	Derivado del pKK232-8 que contiene la región reguladora del operón <i>grlRA</i> de EPEC, a partir de los nucleótidos -366 a +143 respecto al inicio de la transcripción.	Barba J. Datos no publicados

Oligonucleótidos

Para la amplificación de los genes y secuenciación de las construcciones elaboradas se utilizaron los oligonucleótidos enlistados en la siguiente tabla.

Tabla 4. Oligonucleótidos

NOMBRE	SECUENCIA 5' → 3'	SITIO(S) DE RESTRICCIÓN	ORIGEN
_BfpT/H1-P1	acg cgc atg aag gtg gtt aat gct tac atc taa aaa aga aat gca gtg tag gct gga gct gct tcg	Ninguno	Vázquez A. Datos no publicados
_BfpT/H2-P2	atc tct aac aaa aac tta tgg caa tgt tcc ttg tgt aat agt tca tat gaa tat cct cct tag	Ninguno	Vázquez A. Datos no publicados
_BfpV/H1-P1	tat ttg caa tga gca ctc gaa atg aag aac aat ttg aga gaa gag atg tag gct gga gct gct tcg	Ninguno	Vázquez A. Datos no publicados
_BfpV/H2-P2	atc att ttt tta ctt gat aac cta tgg tgc tct ttt tga ttc aga aca tat gaa tat cct cct tag	Ninguno	Vázquez A. Datos no publicados
_BfpW/H1-P1	tac tat aaa caa agg taa tta tgg aaa taa gag ata aaa agg cga atg tag gct gga gct gct tcg	Ninguno	Vázquez A. Datos no publicados

NOMBRE	SECUENCIA 5' → 3'	SITIO(S) DE RESTRICCIÓN	ORIGEN
_BfpW/H2-P2	tag act caa tct acg tta taa ttt aat ttt cct tgt agt ttc taa aca tat gaa tat cct cct tag	Ninguno	Vázquez A. Datos no publicados
_perCC/H1-P1	gat cag gca ctg gga aaa atg gtc agg atg gta ctt att cct tgt agg ctg gag ctg ctt cg	Ninguno	Este trabajo.
_perCC/H2-P2	ata ttg tcg tga gga tta gtc ata cac cac ccc gcg aca tcc gat cat atg aat atc ctc ctt ag	Ninguno	Este trabajo.
_bfpW-A	tat tta ctg cgG AGC tca atg aaa tg	SacI	Vázquez A. Datos no publicados
_bfpW-B	gaa ctG TCG ACa aac ctc aaa acc	SaII	Vázquez A. Datos no publicados
_k1	cag tca tag ccg aat agc ct	Ninguno	10
_k2	cgg tgc cct gaa tga act gc	Ninguno	10
_kt	cgg cca cag tcg atg aat cc	Ninguno	10
_perCCP1-R	gtt CTG CAG ctc agc aat gcg	PstI	Este trabajo
_perCCH3-F	gat aAA GCT tgt gca tgg aat gct g	HindIII	Este trabajo
EPGA-XI	gcc aaa ttt cTC GAG cca tta att at	XhoI	Este trabajo
EpCiorf11R	tac taa gaA AGC Ttc gtc taa ctc tcc	HindIII	Este trabajo

Las bases modificadas para generar el sitio de restricción se indican en mayúsculas

_ Oligos utilizados para hacer el PCR mutagénico

_ Oligos utilizados para verificar la mutación

Medios de cultivo

Para el crecimiento de las cepas bacterianas en tubo, matraz o placa, se utilizó medio de cultivo LB líquido y LB agar (Luria-Bertani). A cada uno de los medios se les adicionó antibiótico para la selección de clonas. Las concentraciones usadas para cada antibiótico se indican en la tabla 5.

DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle's Medium", GIBCO BRL), se utilizó para realizar ensayos de actividad del gen reportero CAT (cloranfenicol acetil transferasa) y perfil de secreción de proteínas. La preparación de cada uno de los medios puede consultarse en el apéndice.

Tabla 5. Antibióticos

Antibiótico	Abreviatura	Concentración del "stock"	Concentración usada
Ampicilina	Ap.	100 mg/ml	100 µg/ml
Estreptomina	Stp.	100 mg/ml	100 µg/ml
Kanamicina	Km.	25 mg/ml	40 µg/ml
Tetraciclina	Tc.	12 mg/ml	12 µg/ml

Amplificación de genes por PCR

Para llevar a cabo la amplificación de genes se utilizó la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Las condiciones de alineamiento variaron en cada reacción dependiendo de la T_m de los oligos. El tiempo de amplificación y el número de ciclos dependieron del tamaño del gen. Para la reacción se utilizó el termociclador Perkin-Elmer modelo 480. A continuación se describe un ejemplo de cómo se realizó la mezcla de reacción.

Mezcla de reacción:

Amortiguador para PCR 10X	10 µL	* Deoxinucleótidos dTTP, dATP, dGTP,
MgCl ₂ 25 mM	10 µL	dCTP (New England Biolabs)
Oligo 1 (25 µM)	2 µL	
Oligo 2 (25 µM)	2 µL	
* dNTP's (1.25mM)	14 µL	
Enzima Taq polimerasa (5 U/µL)	0.5 µL	
DNA	~ 100 ng	
Agua	c.b.p.100 µL	

Enzimas de restricción

Las enzimas usadas en este trabajo se enlistan en la siguiente tabla:

Tabla 6. Endonucleasas de restricción.

ENDONUCLEASA	COMPAÑÍA
<i>Bam</i> HI	Boehringer Manheim
<i>Hind</i> III	New England Biolabs
<i>Xho</i> I	Boehringer Manheim
<i>Sac</i> I	New England Biolabs

Digestiones con enzimas de restricción

Para cada digestión se utilizaron las condiciones recomendadas por cada compañía. El volumen en el que se llevó a cabo cada reacción fue variable, así como la cantidad de enzima y de DNA que se deseaba digerir. El siguiente es un ejemplo de una digestión:

DNA a digerir (~40 ng)	15 μ L
Amortiguador 10X	5 μ L
Enzima (~5 U)	3 μ L
Agua	27 μ L
Volumen total de la reacción:	50 μ L

En el caso de digestiones dobles, se utilizó un amortiguador que fuera compatible de acuerdo a la tabla de compatibilidad de los proveedores. Para los casos en que no hubo compatibilidad, primero se digirió con una enzima, después se precipitó el DNA y, posteriormente, se hizo la siguiente digestión.

Precipitación de las digestiones

Como se mencionó en el párrafo anterior, en algunos casos fue necesario precipitar las digestiones, esto se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. A la reacción de digestión se le agregaron 350 μ L de butanol al 100%.
2. Durante 30 segundos se mezcló con el "vortex".
3. Posteriormente se centrifugó a 12,000 r.p.m. durante 5 minutos a temperatura ambiente.
4. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 500 μ L de etanol al 70%, nuevamente se centrifugó como en el paso anterior.
5. Se eliminó el sobrenadante y el DNA se secó al vacío por 10 minutos y se resuspendió en agua estéril en el volumen deseado.

Este mismo protocolo de precipitación se utilizó para las ligaciones.

Reacción de ligación

Para las reacciones de ligación se usó la proporción de 3:1 de inserto-vector. La cantidad en microlitros que se agrega a la reacción depende de la

concentración de vector e inserto. La mezcla de reacción se incubó a 16°C durante toda la noche, posteriormente, se precipitó y transformó en células competentes por cloruro de calcio o por electroporación.

A continuación se describe un ejemplo de las reacciones de ligación:

DNA inserto (~10 ng)	10 µL
DNA vector (~3 ng)	3 µL
Amortiguador 10X	3 µL
*T4 DNA ligasa (3U/µL)	0.5 µL
Agua	13.5 µL

* Se usó la enzima de la marca Promega

Preparación de células electrocompetentes

Para poder llevar a cabo la transformación de ligaciones y plásmidos fue necesario preparar células electrocompetentes. La metodología fue la siguiente:

1. La cepa se creció con su antibiótico correspondiente toda la noche en 5 mL de medio SOB.
2. Se inoculó 1 mL del cultivo anterior en un matraz con 100 mL de medio SOB o LB más antibiótico, se dejó creciendo a 37 °C hasta llegar a una $D.O_{600} = 0.6$
3. El cultivo se dejó en hielo por 10 minutos y, posteriormente, se centrifugó a 5000 r.p.m. por 10 minutos a 4 °C.
4. Las células se resuspendieron en 20 mL de agua Milli-Q estéril fría se centrifugaron como en el paso anterior. Este paso se repitió 2 veces.
5. Las células se resuspendieron en 10 mL de glicerol al 10 % (v/v) frío y se centrifugó en las condiciones ya mencionadas.
6. Las células se resuspendieron en 300 µL de glicerol al 10% frío y se hicieron alícuotas de 50 µL en tubos previamente fríos.

Una vez que se prepararon las células se llevó a cabo la transformación como sigue:

1. Las celdas de electroporación (BioRad) se enfriaron en hielo por aproximadamente 10 minutos.

2. En un tubo Eppendorf estéril se colocaron 5 μ L de la reacción de ligación, (precipitada previamente) o del plásmido, y se agregaron las células.
3. La mezcla de células y DNA se colocaron en el fondo de la celda de electroporación.
4. Se dio un pulso de 2.5 kV, durante 5 milisegundos, de acuerdo a parámetros programados en el electroporador.
5. Después se agregó 1 mL de medio SOC a la celda y se mezcló por inversión, el contenido se colocó en un tubo de ensaye y se incubó a 37 °C por 1 hora.
6. Después, las transformantes se platearon en cajas de LB agar con el antibiótico de selección y se incubaron a 37 °C toda la noche. Con este procedimiento se generan de 10^9 a 10^{10} transformantes por μ g de DNA plasmídico super enrollado.

Purificación de plásmidos (MINIPREP)

La extracción de plásmidos se llevó a cabo para verificar que se obtuvieron las construcciones necesarias. La técnica se describe a continuación:

1. La cepa se cultivó en 5 mL de medio LB toda la noche con el antibiótico correspondiente.
2. Se centrifugaron 1.5 mL del cultivo en un tubo Eppendorf durante 3 minutos a 12 000 r.p.m. a temperatura ambiente.
3. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 200 μ L de solución 1.
4. Se adicionaron 150 μ L de solución 2 y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.
5. Posteriormente, se adicionaron 200 μ L de solución 3 fría, dejando reposar en hielo por 10 minutos.
6. Se centrifugó 10 minutos a 12 000 r.p.m., se tomó el sobrenadante y se pasó a un tubo limpio.

7. El DNA se precipitó con 1 mL de etanol absoluto a -70°C durante 10 minutos. Posteriormente, se centrifugó 30 minutos a 12 000 r.p.m a 4°C .
8. El sobrenadante se eliminó, se agregó 1 mL de etanol al 70% y se mezcló por inversión.
9. Se centrifugó 8 minutos a 4°C y se dejó secar al vacío por 10 minutos para después resuspender en agua Milli-Q estéril.

La preparación de las soluciones 1, 2 y 3 para esta metodología puede consultarse en el apéndice.

Extracción de plásmido EAF

Para evaluar la presencia de este plásmido de alto peso molecular en la cepa silvestre de EPEC y en sus distintas mutantes se utilizó el siguiente protocolo:

1. La cepa se cultivó en 5 mL de LB toda la noche con el antibiótico correspondiente.
2. Se centrifugaron 3 mL de cultivo durante 3 minutos a 12,000 r.p.m.
3. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 150 μL de solución 1 (ver apéndice). Se adicionaron 15 μL de RNasa y se dejó incubando a temperatura ambiente por 5 minutos.
4. Se agregaron 300 μL de solución 2 (ver apéndice), se mezcló por inversión y posteriormente se dejó incubando en hielo por 10 minutos.
5. A la mezcla anterior se adicionaron 225 μL de acetato de potasio y nuevamente se incubó en hielo por 10 minutos.
6. Posteriormente se centrifugó a temperatura ambiente a 12,000 r.p.m. durante 10 minutos.
7. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionó 1 mL de etanol absoluto y se dejó incubando a -70°C por 10 minutos. Posteriormente se centrifugó como en el paso 6.
8. Se eliminó el sobrenadante y el DNA se lavó con 1 mL de etanol al 70% y se centrifugó como en el paso anterior.
9. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla formada se secó al vacío por 10 minutos. El DNA se resuspendió en 30 μL de agua Milli Q estéril.

10. Se corrieron 10 μ L de cada muestra en un gel de agarosa al 1%.

Ensayo de CAT (Cloranfenicol Acetil Transferasa)

1. En matraces con 50 mL de medio LB y el antibiótico correspondiente se sembraron las cepas de interés y se dejaron crecer toda la noche a 37°C a 110 r.p.m. Posteriormente, se midió la DO_{600} de cada cultivo.
2. Se tomaron 10 mL de cultivo y se centrifugaron a 10,000 r.p.m. durante 5 minutos, se tiró el sobrenadante y se adicionaron 5 mL de PBS 1X, las pastillas se resuspendieron y se centrifugaron nuevamente.
3. Se eliminó el sobrenadante y se adicionó PBS 1X para ajustar a una D.O. $600_{nm}=0.9$ ó 1.0 .
4. Matraces con 50 mL de DMEM, suplementado con 500 μ L de LB y el antibiótico correspondiente, se inocularon con 1 mL del cultivo ajustado.

La actividad de la cloranfenicol acetil transferasa se determinó de la siguiente manera:

1. Se tomaron 1.5 mL de cada uno de los cultivos una vez que alcanzaron la $DO_{600}=0.8$. Para la $DO_{600}=1.2$ se tomaron 800 μ L de cultivo.
2. Las muestras se centrifugaron a 12,000 r.p.m durante 2 minutos, se retiró el sobrenadante y las muestras se resuspendieron en 1 mL de solución de lavado TDTT (ver apéndice) y nuevamente se centrifugaron como en el paso anterior. Las pastillas se congelaron a -70°C .
3. Una vez que las muestras estuvieron descongeladas se resuspendieron en una solución de lavado. Las muestras tomadas a una $DO_{600}=1.2$ se resuspendieron en 850 μ L y las muestras tomadas a una $DO_{600}=0.8$ se resuspendieron en 700 μ L. Las muestras se incubaron en agitación por 30 minutos a 37 °C y se sonicaron con un sonicador SONIPREP utilizando pulsos de 9.9 segundos durante tres minutos.
4. Las muestras se centrifugaron a 12,000 r.p.m a temperatura ambiente por 20 minutos. El sobrenadante (extracto crudo) se transfirió enseguida a un tubo limpio.

5. Para determinar la concentración de proteína se utilizó el estuche comercial BCA (Pierce). Se colocaron 10 μ L de cada muestra por duplicado en una placa de 96 pozos. Se agregaron 200 μ L de la mezcla de reacción (25 mL de la solución A + 500 μ L de la solución B). Posteriormente, se incubó a 37°C por 30 minutos. La lectura de absorbancia se lleva a cabo a una longitud de onda de 562 nm en el lector automatizado de placas CERES 900C con el paquete computacional KC3 jr.
6. Para determinar la actividad de CAT se colocaron 5 μ L de cada muestra por duplicado en una placa de 96 pozos. Posteriormente, se agregaron 200 μ L de la mezcla de reacción (Tris-HCl 0.1M pH 7.8, DNTB (5,5'-ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico) 1 mM, acetil coenzima A 0.1 mM, cloranfenicol 0.1 mM).

La cinética de actividad se determinó a una absorbancia de 410 nm con lecturas cada 5 segundos, durante 5 minutos utilizando el paquete computacional KC3 jr en el CERES 900C.

La actividad específica de cada muestra se determinó dividiendo la actividad específica de CAT obtenida para la muestra entre la concentración de proteína.

Generación de mutantes en un solo paso

Las mutaciones en cada uno de los genes que integran el operón *per* se hicieron por medio de la técnica de mutagénesis por PCR en un solo paso desarrollada por Datsenko y Wanner¹⁴. Esta técnica consiste en reemplazar la secuencia de interés por un casete de resistencia a Kanamicina o Cloranfenicol utilizando un fragmento de PCR que contiene el gen de la resistencia flanqueado por secuencias homólogas (alrededor de 50 pb) al gen que se pretende interrumpir.

1. Para cada gen que se mutagenizó se obtuvo el fragmento de PCR correspondiente, utilizando como molde el plásmido pKD4 y oligonucleótidos identificados como H1P1 y H2P2. La secuencia 3' de estos oligos (aproximadamente 20 nucleótidos) es homóloga a la secuencias

que flanquean el gen de Kanamicina en el pKD4, mientras que la secuencia 5´ (entre 40 y 50 nucleótido) es homóloga del gen que se va a interrumpir. Todos los productos de PCR obtenidos por esta estrategia contienen, hacia el extremo 3´ del casete de Kanamicina, una secuencia correspondiente a un sitio de unión a ribosoma, acompañada corriente abajo de un codón de inicio de traducción (ATG), lo que permite construir mutaciones no polares en operones.

2. La cepa silvestre que se va a mutagenizar se debe transformar con el plásmido pKD46 el cual lleva clonado el gen para la recombinasa λ red bajo un promotor inducible por arabinosa. La selección se hizo en cajas de LB con Ampicilina a 30°C. Posteriormente, se prepararon células electrocompetentes de la cepa transformada, se crecieron en medio de cultivo SOB suplementado con 10 mL de arabinosa 1M y con Ampicilina 100 μ L/mL, se crecieron a 30°C hasta llegar a una $DO_{600}=0.5$.
3. Las células se electroporaron con el producto de PCR obtenido y la selección de las posibles mutantes se hizo en cajas de LB agar con el antibiótico correspondiente a 42°C, a esta temperatura a la cual se elimina el plásmido pKD46 ya que es termosensible.
4. La pérdida de resistencia a ampicilina de las colonias obtenidas se determinó por sensibilidad a este antibiótico. De las candidatas se extrajo el DNA cromosomal para determinar por PCR que se sustituyó el gen de interés.

Inmuno detección (*Western blot*)

1. Las cepas se cultivaron en medio LB con el antibiótico correspondiente durante toda la noche a 37°C en agitación. Posteriormente las cepas se subcultivaron en un matraz que contiene 50 mL de DMEM y el antibiótico correspondiente.
2. Se tomaron 1.5 mL de cada cultivo a una $DO_{600}=1$. Cada muestra se centrifugó a 12 000 r.p.m. durante 2 minutos y se eliminó el sobrenadante.

Las muestras se resuspendieron en 500 μ L de amortiguador de carga, posteriormente se hirvieron durante 5 minutos.

3. Las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes, a 30 mA por cada gel.
4. Para la transferencia de proteínas se utilizó una cámara de transferencia semiseca (BIORAD) y una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m de poro (Amersham). Ya que se ha corrido el gel, éste se equilibró en el amortiguador de transferencia (consultar apéndice) por 15 minutos al igual que el papel filtro y la membrana.
5. Una vez que se equilibró el gel se colocó en la cámara de transferencia. Se requirió de un voltaje de 15V por 45 minutos para llevar a cabo la transferencia.
6. Posteriormente, la membrana se bloqueó con leche descremada Carnation Clavel al 5% en TBS-Tween (consultar apéndice) por 1 hora. Después de este tiempo, se agregó el anticuerpo diluido en TBS-Tween y se dejó toda la noche en agitación. La membrana se lavó 3 veces con TBS-Tween por 10 minutos cada vez. Se agregó el segundo anticuerpo (conjugado a peroxidasa, Biomeda) diluido en TBS-Tween y se incubó 1 hora en agitación. Posteriormente, se lavó la membrana como ya se mencionó.
7. Para el revelado se utilizó el reactivo Chemi Glow (Alpha Innotech). Este se agregó a la membrana y se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 minutos en agitación. La membrana se expuso a una película fotográfica, a distintos tiempos de exposición.

Perfil de secreción

Para realizar los ensayos en la condición de estático el medio de cultivo se preincubó durante toda la noche en la estufa de CO₂ al 5%.

1. Las cepas se cultivaron en medio LB con el antibiótico correspondiente durante toda la noche a 37°C en agitación. Posteriormente las cepas se

subcultivaron en un matraz que contiene 50 mL de DMEM y el antibiótico correspondiente.

2. Para la condición de agitación se tomaron muestras de cultivo a una $DO_{600}=0.8$. En la condición de estático los matraces se dejaron incubando alrededor de 9 horas, en ambos casos se tomaron 4 alícuotas de 1.5 mL de cultivo. Las muestras se centrifugaron a 14, 000 r.p.m. durante 5 minutos.
3. Se transfirieron 1.3 mL del sobrenadante a un tubo Eppendorf limpio, posteriormente se les agregó 145 μ L de TCA (ácido tricloro acético) al 100%. Los tubos se dejaron incubando toda la noche a 4°C.
4. Las muestras se centrifugaron a 14,000 r.p.m durante 30 minutos, posteriormente se tiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla.
5. Por último, las pastillas obtenidas se resuspendieron en 25 μ l de amortiguador de carga 2X, suplementado con 1 μ L de Tris saturado para neutralizar el TCA. Las muestras se calentaron por 5 minutos y se sometieron a una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes, a 30 mA por cada gel.

5. RESULTADOS

5.1 PerC activa la expresión de *ler* en *E. coli* MC4100

Para determinar cuál de los componentes del operón *per*, formado por los genes *perA*, *perB* y *perC*, participa en la regulación de *ler*, se analizó la expresión de la fusión transcripcional *ler-cat* (*pler-1179*) (Tabla 3) en una cepa no patógena derivada de *E. coli* MC4100, en presencia de plásmidos que llevan uno o más de los genes *per*. La fusión *pler-1179* contiene todos los elementos involucrados en la expresión y regulación de *ler* fusionados al gen reportero *cat*, el cual codifica para la cloranfenicol acetil transferasa (Fig. 3B). Los plásmidos que llevan los genes *per* (Fig. 3A) fueron previamente generados mediante la remoción en fase de alguno de los genes a partir del plásmido pCS-ABC⁵⁷.

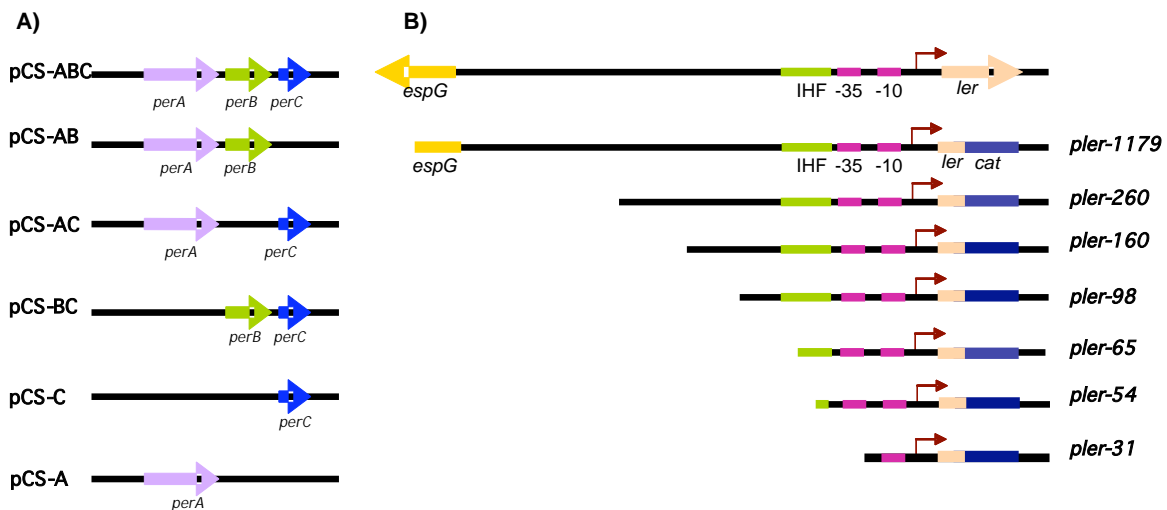


Figura 3. Representación esquemática de las construcciones del operón *per* y de las fusiones transcripcionales *ler-cat*. A) Plásmidos que contienen los genes del operón *per*. La remoción en fase de alguno de los genes se representa como línea continua. B) Esquema de la región intergénica contenida entre los genes *espG* y *ler* y de las diferentes fusiones *ler-cat*. El nombre de cada fusión va de acuerdo a la posición del extremo 5' de la región reguladora contenida en la fusión respecto al inicio de la transcripción de *ler*. En todas las fusiones el extremo 3' corresponde a la posición +216. Las cajas -35 y -10 del promotor y la secuencia de pegado a IHF están representadas. Estos esquemas no están a escala.

La actividad específica de CAT se determinó a partir de muestras obtenidas de cultivos de las diferentes cepas crecidas en DMEM a 37°C en agitación, ya que éstas son las condiciones óptimas en las cuales se expresan los genes de virulencia de EPEC^{42, 53}.

Como se puede observar en la figura 4A, en presencia del operón completo (pCS-ABC) la fusión de *ler* es tres veces más activa que en presencia únicamente del vector (pMPPM-K3). Este incremento de actividad es similar al observado en las cepas que llevan a *perC* junto con *perA* o *perB* (pCS-AC o pCS-BC). Cuando la fusión de *ler* va acompañada sólo de *perC* los niveles de actividad aumentan hasta diez veces con respecto al control. En contraste, en presencia sólo de *perA* y *perB* (pCS-AB o pCS-A), los niveles de CAT fueron similares a los de la cepa control que contiene a la fusión más el vector (pMPPM-K3). Estos resultados indican que PerC es responsable de la activación de *ler* observada en *E. coli* MC4100.

Como control del experimento se determinó la expresión de la fusión *bfpA-cat*, la cual es activada por PerA (pCS-A) y no por PerC (pCS-C), lo cual coincide con lo reportado en estudios anteriores⁴². Con estas observaciones podemos plantear que el operón *per* codifica para al menos dos activadores transcripcionales: PerA, el activador de los operones *bfp* y *per* localizados en el plásmido EAF, y PerC, que codifica para un activador del gen *ler* y, por lo tanto, de los genes de la isla de patogenicidad LEE.

5.2 PerC y GrlA regulan positivamente la expresión de los genes del LEE en diferentes condiciones de crecimiento

Es claro que en *E. coli* MC4100 la presencia de PerC induce la expresión de la fusión *pler-1179*; sin embargo, en una cepa curada del plásmido EAF, y por lo tanto carente del operón *per*, la expresión de los genes del LEE no se afecta en condiciones de crecimiento consideradas óptimas para la expresión de los genes

de esta isla ^{6, 49}. Esto podría deberse a que en el genoma de EPEC se encuentran codificados otros reguladores transcripcionales que podrían estar involucrados en la regulación positiva de los genes de la isla.

Para definir mejor el papel de PerC, se construyeron cepas mutantes mediante la remoción en fase de los genes que integran el operón *per*, a partir de la cepa prototipo de EPEC E2348/69. Además se generó una cepa que no contiene el plásmido EAF y, por lo tanto, no contiene el locus *per* (JPEP7, Tabla 2). Una vez obtenidas las mutantes se analizó la expresión de algunos de los genes del LEE mediante experimentos tipo *western blot*, tal es el caso de Tir cuya expresión es dependiente de Ler^{6, 56}. La figura 6A muestra la inmunodetección de la expresión de Tir a partir de muestras de cultivos crecidos en DMEM a 37°C en agitación (página 40). En estas condiciones se observó que la expresión de Tir no se afecta en ninguna de las mutantes del operón *per*, ni en la cepa curada del plásmido EAF, lo cual concuerda con lo reportado en trabajos previos. En contraste, la mutante en *ler*, como se esperaba, no produce Tir (Fig. 6A). Recientemente se identificaron 5 genes homólogos de PerC en el genoma de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), los cuales se encuentran codificados en el cromosoma³⁵. Este estudio reveló que los genes *pchA*, *pchB* y *pchC* (*perC* homologues) codifican para proteínas de 104 aminoácidos que cuando se expresan en multicopia individualmente aumentan la expresión de los genes del LEE, al igual que la secreción de sus productos. La eliminación de *pchA* o *pchB*, pero no de *pchC*, disminuye la secreción de proteínas Esp y afecta la adhesión de EHEC a células HEP-2 en cultivo. Los efectos más drásticos se observan cuando se hacen dobles mutantes en *pchA* y *pchB* o *pchA* y *pchC*. Los otros dos genes identificados como *pchD* y *pchE* codifican para proteínas de 89 aminoácidos, que cuando se mutan no provocan cambios significativos en la secreción y expresión de los genes del LEE. Con los resultados anteriores se propuso que *pchA*, *pchB* y *pchC* se requieren para la expresión de los genes del LEE en EHEC³⁵.

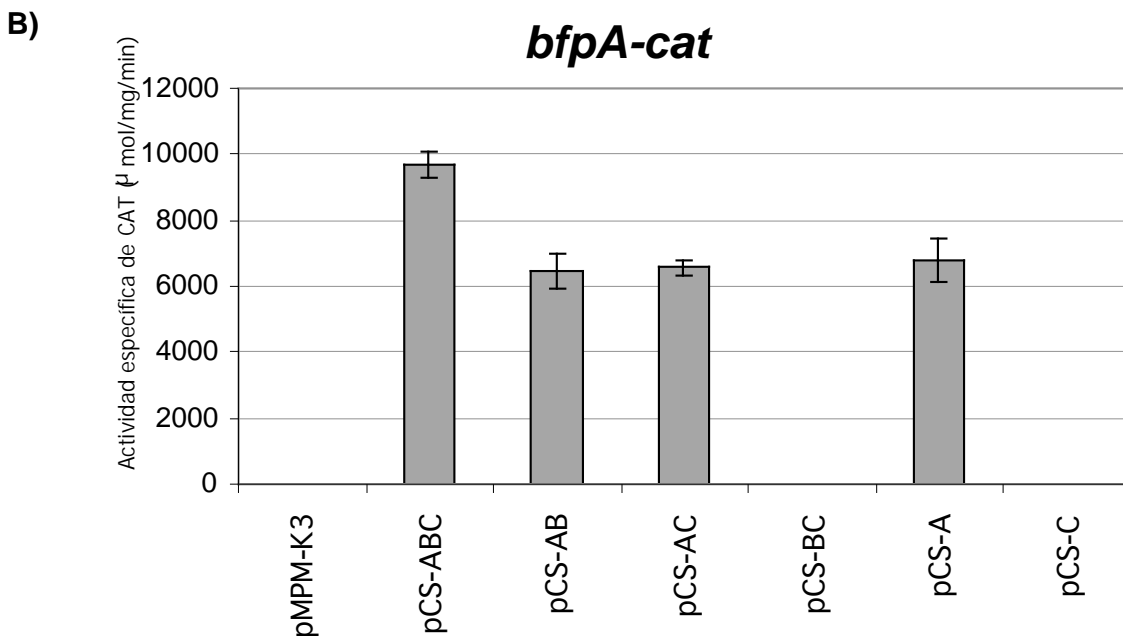
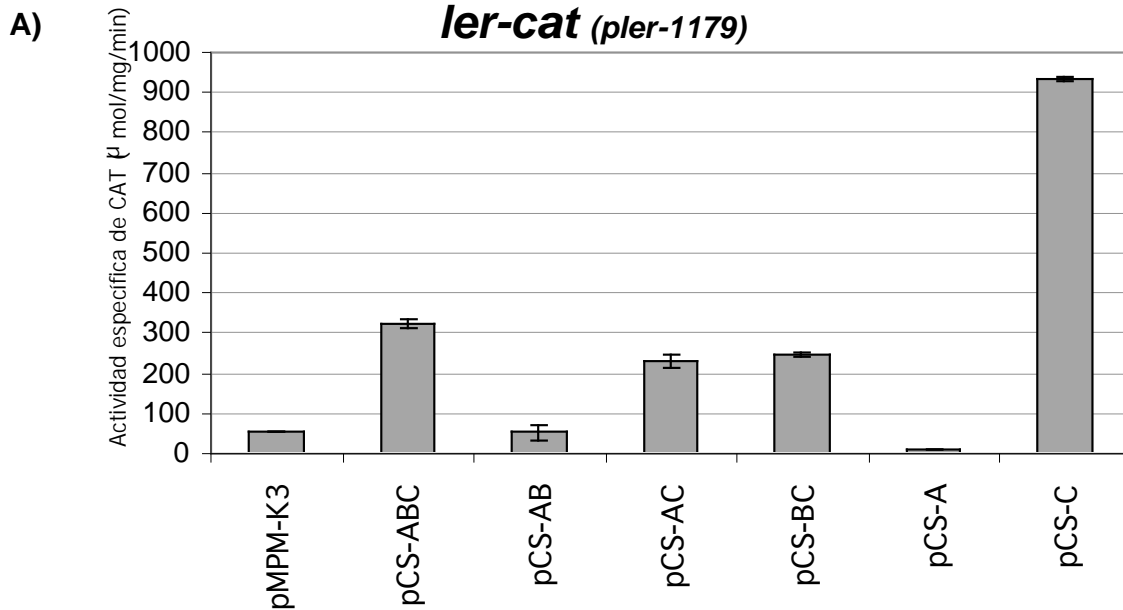


Figura 4. PerC se requiere para la expresión de *ler* en *E. coli* MC4100. A) Expresión de la fusión transcripcional *pler-1179* en presencia de los plásmidos que contienen diferentes componentes del operón *per*. B) Expresión de la fusión transcripcional *bfpA-cat* la cuál fue utilizada como control. Los plásmidos del operón *per* y las fusiones transcripcionales de la región reguladora de *ler* y *bfpA* se transformaron en la cepa de *E. coli* MC4100. La actividad específica de *cat* se determinó a partir de muestras de cultivos a una D.O.₆₀₀=1 en DMEM a 37°C en agitación.

```

PerC  ----MEIRDKKAKY-LEEKGFYRRAADRWAEIMVLLS-----SDAERKLAQKRAFC 47
EpcH  MVRMVLIPDRRFRLAVSAGGNFQRRLDPM SKLTRLEKYHLNYSQRQAASKVVAVTPAAIE 60
      : * *:: : : * ::* * ::: *           :* : :* * :
PerC  INKSLRNNLQADNY-----SDIKQGVYKAYKKMGLVNEKIFRN---YKEN----- 89
EpcH  VEKRAVERESKGQYRIAARLWLLCMDVAVGEVER-ARIAIRRDQCISKGNLRRGEYAGI 119
      ::* : :*           *: * : : : : : : :
PerC  -----
EpcH  GCRGVVYDZ 128

```

Figura 5. Alineamiento entre la secuencia de aminoácidos de PerC y EpcH. Comparten una identidad del 20% (*) y una similitud del 38% (* + :).

Tomando en consideración estos antecedentes cabe la posibilidad de que la mutación en *perC* no tuviera efecto sobre la expresión de *ler* porque existen uno o más homólogos de PerC en EPEC que estarían reemplazando su función. Por lo anterior, se hizo la búsqueda de genes homólogos a *perC* en el genoma de EPEC. La búsqueda se hizo a partir de la secuencia preensamblada del genoma de la cepa de EPEC E2348/69, depositada en la base de datos del Centro Sanger (http://www.sanger.ac.uk/Projects/Escherichia_Shigella). A partir de esta búsqueda se encontró un ORF que codifica para una proteína de 127 aminoácidos, que comparte una identidad del 20% y una similitud del 38% con PerC (Fig. 5), el cual se denominó EpcH (*EPEC perC* *homologue*). La secuencia nucleotídica de este gen se encuentra flanqueada por genes que presentan similitud con el fago Epsilon 15 y el fago Sf6 (datos no mostrados). Al parecer la secuencia del gen homólogo (*epcH*) y los genes que lo flanquean se encuentran codificados en algo que pudiera ser una isla de aproximadamente 15 Kb. Cabe señalar que homólogos equivalentes a los genes *pch* identificados en EHEC no están presentes en EPEC.

Basándonos en la información anterior se generó la mutación de *epcH* tanto en la cepa silvestre, como en la cepa curada del plásmido EAF (JPEP7) dando lugar a las cepas $\Delta epcH$ (JPEP4) y EAF- $\Delta epcH$ (JPEP8) en donde se evaluó la expresión de Tir en las condiciones de crecimiento ya mencionadas. En la cepa

JPEP4 (*epcH*) la expresión de Tir es similar a la de la cepa silvestre (Fig. 6A), al igual que en la cepa JPEP7 (EAF-) donde está presente *epcH*, pero no PerC y que en la cepa JPEP8 (EAF- Δ *epcH*) que carece tanto de *perC* como de *epcH*. Estos resultados en conjunto nos indican que la proteína EpcH no cumple algún papel en la regulación de *ler*, por lo menos en las condiciones evaluadas en este proyecto.

En *C. rodentium* se describió que el regulador transcripcional GrlA, el cual se encuentra codificado en la isla de patogenicidad LEE como parte del operón *grlRA*, participa en la regulación de *ler*¹⁷. Como se mencionó anteriormente, EPEC y *C. rodentium* pertenecen a la familia de patógenos A/E, los cuales comparten al LEE. Sin embargo, *C. rodentium* no cuenta con un plásmido EAF, por lo tanto PerC no está presente y tampoco se encuentran genes cromosomales homólogos a los genes *pch* descritos en EHEC³⁵. Considerando lo anterior, es posible que en EPEC PerC y GrlA sean funcionalmente redundantes.

Para evaluar esta posibilidad, se generaron mutantes en *grlA* en la cepa silvestre de EPEC y en la cepa JPEP7 (EAF-). La expresión de Tir fue analizada a partir de muestras de cultivos de las cepas Δ *grlA* (JPEP6) y pEAF- Δ *grlA* (JPEP10) en DMEM a 37°C en agitación. Como se puede observar en la figura 6A la expresión de Tir se ve significativamente disminuida en ausencia de GrlA. Estos resultados indicaron que bajo esta condición de crecimiento GrlA, pero no PerC, es requerido para la expresión óptima de *ler* y por tanto del resto de los genes del LEE.

Al contrario de EPEC, en *C. rodentium* la expresión óptima de los genes del LEE se da en DMEM a 37°C pero sin agitación (cultivo estático)³. Para explorar la posibilidad de que PerC pudiera regular la expresión de los genes del LEE de EPEC en una condición de crecimiento diferente a la de agitación (donde la expresión de *ler* depende de GrlA), se analizó la expresión de Tir por inmunodetección a partir de muestras obtenidas de cultivos de las cepas mutantes de EPEC crecidas en DMEM sin agitación (cultivo estático).

De manera interesante, en cultivos estáticos la mutación en *perC*, y no la de *grlA*, reduce significativamente la expresión de Tir, lo cual sugiere que PerC se requiere para la transcripción de los genes de la isla en esta condición de crecimiento (Fig. 6A). Al igual que en cultivos agitados, las mutantes en *perA*, *perB* y *epcH* (JPEP1, JPEP2 y JPEP3) no muestran cambios significativos en la expresión de Tir, confirmando que no participan en la regulación de *ler*. Consistentemente con el resultado obtenido para la cepa mutante en *perC* (JPEP3), la cepa curada (JPEP7) y sus respectivas mutantes en *epcH* y *grlA* (JPEP8 y JPEP10), se ven afectadas en la expresión de Tir debido a la ausencia del plásmido EAF y por tanto de *perC*.

Para los experimentos tipo *western blot* la inmunodetección de DnaK se utilizó como control de concentración de proteínas, que además sirvió como referencia de que el efecto de las condiciones de crecimiento y de las mutaciones es específico sobre los genes de la isla de patogenicidad. Lo anterior se hizo para cada una de las mutantes evaluadas en las dos condiciones, mostrando que cada carril contiene una concentración similar de proteínas totales.

Los resultados mencionados anteriormente se corroboraron analizando el perfil de secreción de proteínas de cada una de las mutantes de EPEC crecidas en cultivos con agitación y estáticos (Fig. 6B). En los perfiles de secreción se detectan proteínas que forman parte del translocón del SSTT como son EspA, EspB y EspD, así como proteínas efectoras codificadas en el LEE, cuya expresión también depende de *Ler*. Consistentemente con lo que se observó para la expresión de Tir en la condición de agitación (Fig. 6A), las cepas carentes de PerC (JPEP3 y JPEP7) presentan un perfil de secreción de proteínas similar al de la cepa silvestre (Fig. 6B), mientras que las mutantes en *grlA* (JPEP6 y JPEP10) se encuentran afectadas en su secreción. Por el contrario, en la condición de crecimiento estático podemos ver que la secreción para la mutante en *perC* disminuye al igual que para la cepa curada y sus respectivas mutantes mientras que la secreción de la mutante en *grlA* y *epcH* no se afecta. Confirmando el papel

central de Ler en la regulación de los genes del LEE, en condiciones de crecimiento en agitación o estático la mutante en *ler* no expresa ni secreta proteínas codificadas por el LEE (Fig. 6). En su conjunto, estos resultados indican que PerC y GrlA regulan de manera independiente, pero en respuesta a diferentes estímulos ambientales (simulados aquí con condiciones de crecimiento estático o con agitación, respectivamente), la expresión de genes regulados por Ler.

Con el propósito de determinar si la regulación de los genes del LEE es mediada por PerC y GrlA a nivel transcripcional, se hizo un estudio con diferentes fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*. De la isla de patogenicidad LEE se estudió la expresión de los operones *LEE2* y *LEE5* con las fusiones transcripcionales pTIR394 (*ptir-cat*) y pSEPZ-11 (*pLEE2-cat*) (Tabla 2). Como control se incluyó también la fusión transcripcional *bfpA-cat* (Tabla 2), cuya expresión depende exclusivamente de PerA⁴². Cada cepa mutante de EPEC se transformó con las fusiones transcripcionales ya mencionadas. Las cepas resultantes se crecieron en las mismas condiciones que se utilizaron para realizar la inmunodetección y el perfil de secreción de proteínas (Fig. 6).

En la figura 7 se muestran los datos correspondientes a los ensayos realizados con las fusiones transcripcionales pTIR394 y pSEPZ-11. Para ambas fusiones se observó un comportamiento similar al ilustrado en la figura 6 relacionado con la función de PerC y GrlA. En la condición de agitación las fusiones *ptir-cat* y *pLEE2-cat* disminuyeron su expresión aproximadamente 4 veces en la mutante de *grlA* de EPEC, comparada con la cepa silvestre, pero no se afecta en la mutante en *perC* o en la cepa curada. Sin embargo, en la condición de crecimiento estático la actividad de las fusiones *ptir-cat* y *pLEE2-cat* en la mutante de *perC* de EPEC o en las cepas curadas disminuyó al menos 5 veces, pero no así en la mutante en *grlA*. Esto significa que PerC y GrlA regulan la expresión de *ler* en diferentes condiciones de crecimiento.

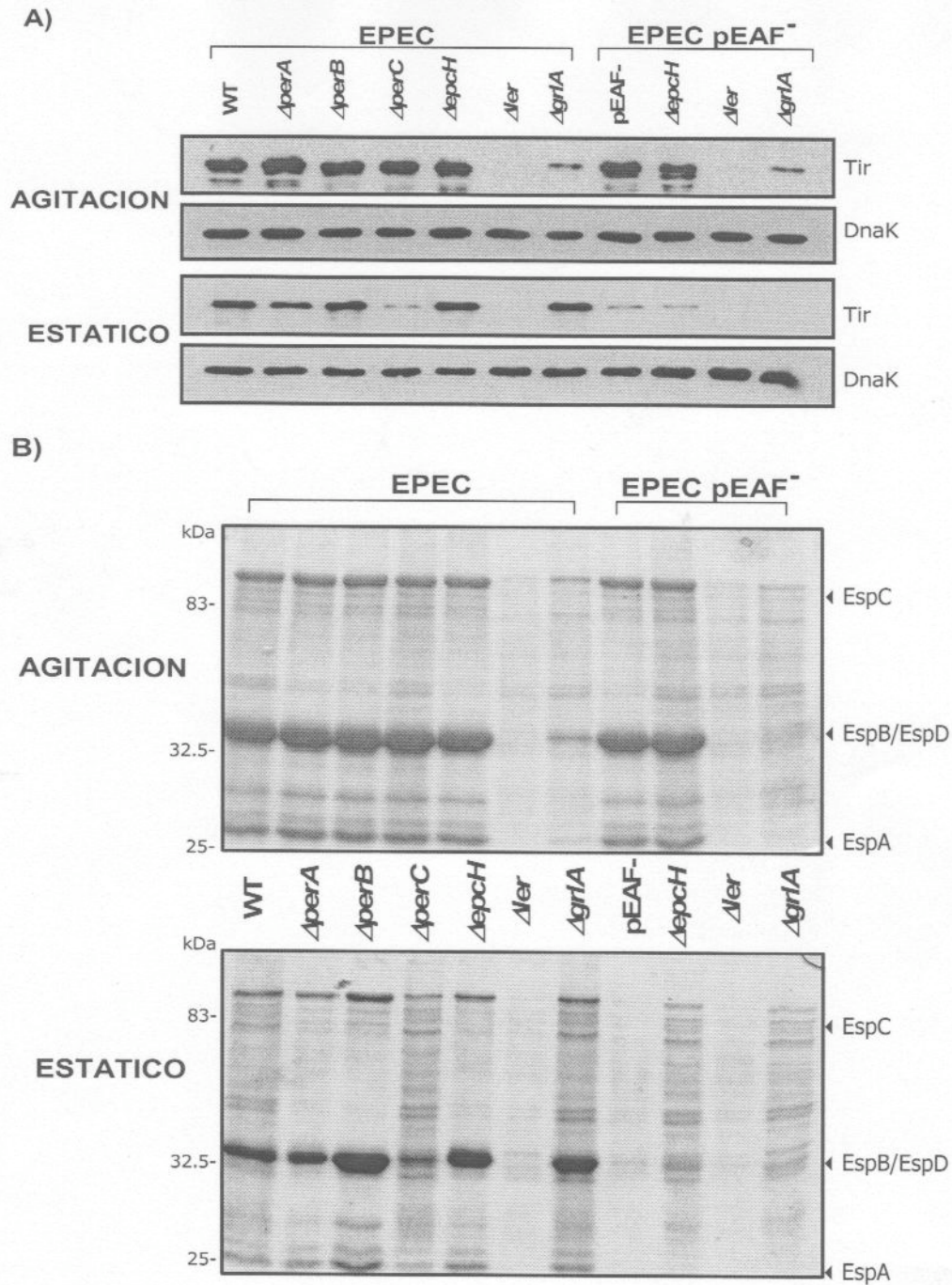


Figura 6. PerC y GrlA regulan la expresión de los genes del LEE en diferentes condiciones de crecimiento. A) Inmunodetección de Tir y DnaK en proteínas totales de las cepas analizadas. Las muestras fueron colectadas de cultivos agitados o estáticos. La detección de Tir se realizó utilizando el anticuerpo monoclonal anti-Tir a una dilución de 1:10 000. Como control de carga e integridad de las proteínas por cepa, se detectó DnaK utilizando el anticuerpo monoclonal anti-DnaK a una dilución de 1:50 000. B) Perfiles de secreción de proteínas. Los sobrenadantes de los mismos cultivos de donde se obtuvieron las proteínas totales fueron colectados para recuperar las proteínas secretadas mediante precipitación con TCA. Para A y B las muestras se tomaron a una D.O.₆₀₀=0.8 de cultivos crecidos en DMEM a 37°C en agitación, o de cultivos estáticos en una incubadora con una atmósfera de CO₂ al 5%.

Para corroborar que el efecto de PerC y GrlA en la expresión de los genes del LEE se debe al efecto directo sobre la regulación de *ler*, se evaluó la expresión de la fusión *pler-1179* (Tabla 2) en las diferentes cepas. La figura 8A muestra que los niveles de actividad en la mutante en *perC* y en la cepa curada del plásmido EAF (JPEP3 y JPEP7) en condiciones de agitación son similares a los de la cepa silvestre, es decir no se afectan. Solamente en la condición de crecimiento estático se observa el efecto de la mutación de *perC* sobre la expresión de la fusión *pler-1179*, ya que los niveles de actividad disminuyen alrededor de 3 veces respecto a la silvestre. Al igual que para las otras fusiones, en la cepa EAF- Δ *grlA* (JPEP7) se observa un efecto drástico sobre la expresión de *ler* en ambas condiciones de crecimiento ya que la actividad de la fusión *pler-1179* disminuye casi completamente, mientras que en presencia de uno de los dos reguladores la actividad de la fusión no se abate por completo. Esto sugiere que ambas proteínas pueden promover niveles basales de expresión de *ler* aun en condiciones que no son óptimas (por ejemplo, agitación para PerC o estático para GrlA); sin embargo, como lo muestran los resultados de la figura 6, dichos niveles no son suficientes para promover niveles de expresión detectables de las proteínas codificadas por el LEE. A diferencia de las fusiones *ptir-cat* y *pLEE2-cat*, la fusión *pler-1179* no se afecta en la mutante en *ler* ya que no se autorregula^{3, 4}.

En el caso de la fusión *bfpA-cat* se observa que los niveles de actividad no dependen de la condición de crecimiento, ya que en agitación y estático los niveles de actividad son similares. Las cepas Δ *perC* y Δ *grlA* presentan niveles de actividad específica similares a los de la cepa silvestre, indicando que los genes mencionados no participan en la regulación de *bfpA*. En la cepa curada del plásmido EAF y en la cepa EAF- Δ *grlA* la fusión *bfpA-cat* no fue activa, ya que en el plásmido EAF se encuentra codificada PerA, el activador transcripcional de *bfpA* (Fig. 8B).

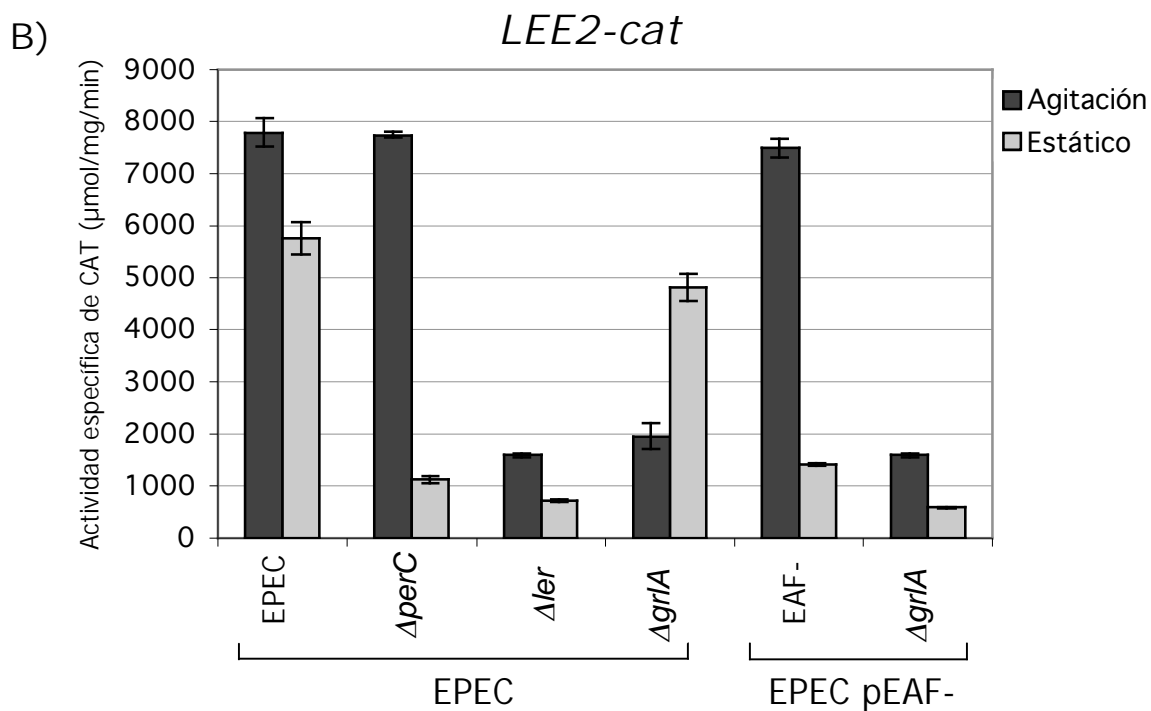
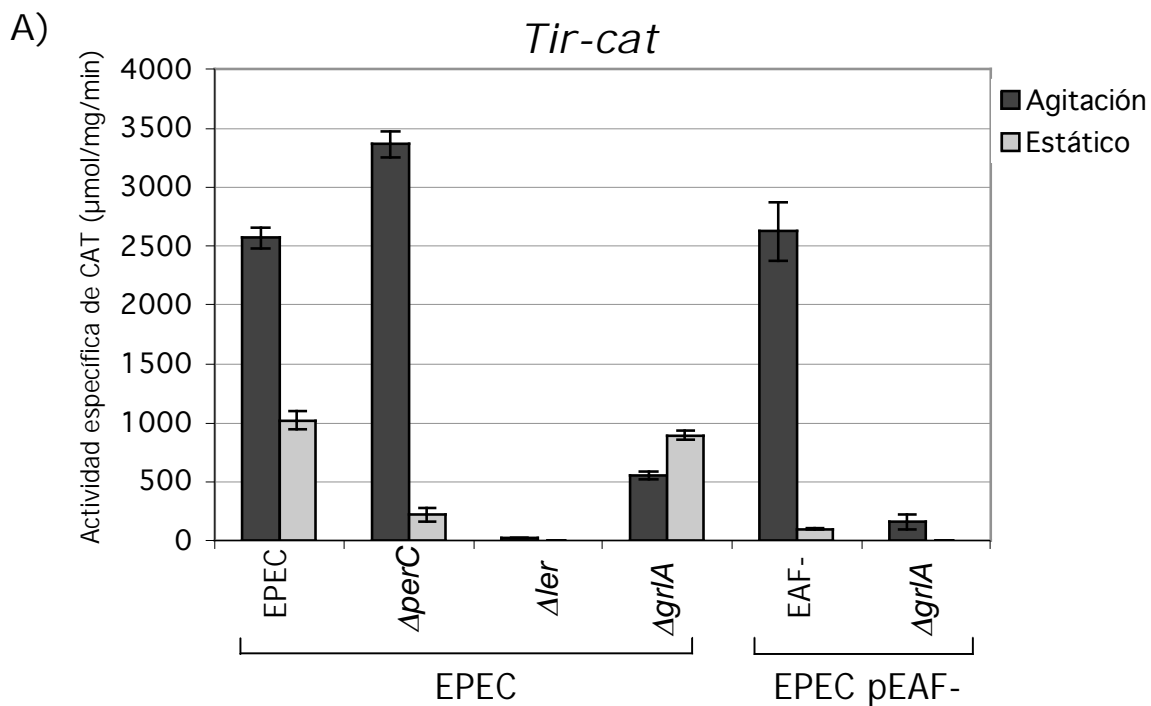


Figura 7. Expresión de las fusiones transcripcionales *pTir-cat* y *pLEE2-cat* en diferentes condiciones de crecimiento. A) *pTir-cat* (pTIR394) y B) *pLEE2-cat* (pSEPZ-11). Las fusiones transcripcionales se transformaron en la cepa silvestre de EPEC (E2348/69), las diferentes cepas mutantes de EPEC y en la cepa curada del plásmido EAF (EPEC pEAF-). Las muestras para determinar la actividad específica de *cat* se tomaron a partir de cultivos en DMEM, en agitación D.O.₆₀₀=1 o en estático a una D.O.₆₀₀=0.8.

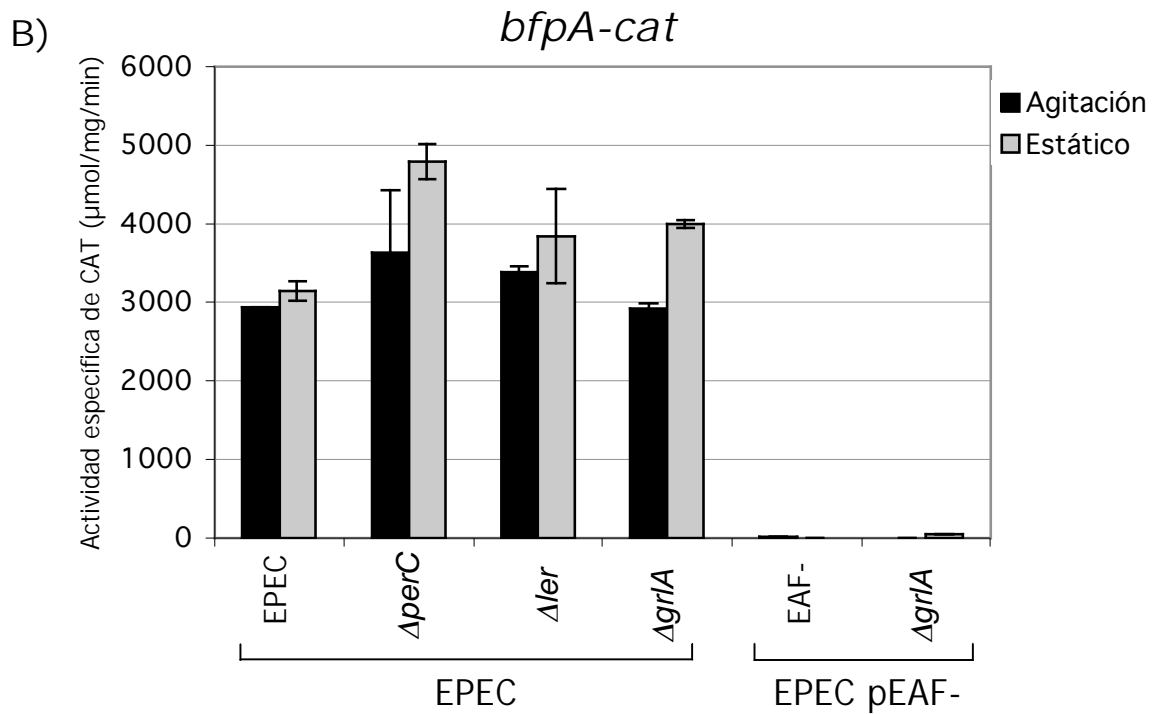
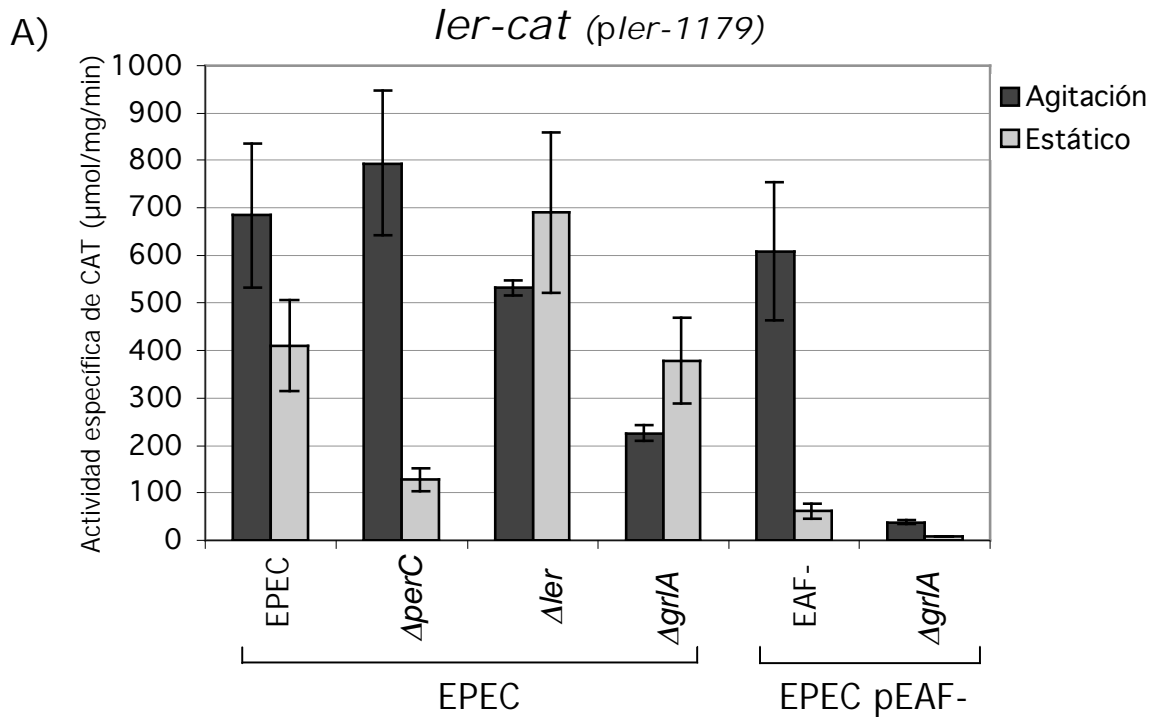


Figura 8. La expresión de *ler* en EPEC depende de PerC y GrIA en diferentes condiciones de crecimiento. A) *pler-1179* y B) *bfpA-cat* utilizada como control del experimento. La actividad específica de *cat* se determinó a partir de cultivos en DMEM, en agitación D.O.₆₀₀=1, en estático a una D.O.₆₀₀=0.8.

En conjunto, los resultados obtenidos a través del perfil de secreción de proteínas y con las fusiones transcripcionales coinciden con lo observado en la inmunodetección de Tir. De estos experimentos se puede concluir que GrlA y PerC se requieren para la expresión de *ler*. Sin embargo, cada uno de ellos activa óptimamente la expresión de *ler* en respuesta a una condición de crecimiento diferente; esto es, PerC favorece la expresión de *ler* y, por tanto, de los genes del LEE bajo condiciones de crecimiento estático, mientras que GrlA lo hace en agitación.

5.3 PerC y GrlA se expresan diferencialmente

Dos situaciones podrían explicar el papel diferencial de PerC y GrlA en la expresión de *ler*. La primera, se refiere a que probablemente cada regulador se expresa sólo en la condición donde actúa, ya sea en agitación o en estático. La segunda es que GrlA y PerC están presentes en ambas condiciones, pero su actividad es modulada por señales ambientales que se generan dependiendo de la condición de crecimiento.

Para distinguir entre estas posibilidades se diseñó un experimento que asegurara la presencia de PerC o GrlA independientemente de la condición de crecimiento. Las mutantes de EPEC en *perC*, *grlA*, *ler* y la cepa EAF- Δ *grlA* se transformaron con los plásmidos pTEP-PerC1 y pTEP-GrlA1 que expresan, respectivamente, PerC y GrlA bajo el control del promotor *lac*. Las transformantes se crecieron en condiciones de agitación y estático de donde se tomaron muestras para analizar la producción de Tir por medio de *western blot*. En la figura 9 se muestra la inmunodetección de Tir en las diferentes cepas mutantes de EPEC complementadas con GrlA y PerC. De acuerdo a los datos descritos anteriormente (Fig. 6 y 7), en la condición de agitación observamos que las mutantes en *grlA* (JPEP6) y la mutante en *grlA* curada del plásmido EAF (JPEP10) transformadas con el vector pMPM-T3, se encuentran afectadas en la expresión

de Tir, mientras que la mutante en *perC* (JPEP3) y la cepa curada del plásmido EAF (JPEP7) presentan una expresión de Tir en presencia del vector similar a la de la cepa silvestre. Con excepción de la mutante en *ler* que en ningún caso expresa Tir, en las mutantes en *grlA* y *perC* se restaura la expresión de Tir independientemente de la condición de crecimiento (agitación o estático), cuando se transforma con las construcciones que expresan GrIA (pTEP-GrIA1) o PerC (pTEP-PerC1) bajo el control de *Plac*. Como control de carga se utilizó a la proteína DnaK, que como se puede observar está aproximadamente en la misma concentración en todas las muestras. La observación anterior muestra que PerC y GrIA pueden sustituirse en forma recíproca, independientemente de la condición de crecimiento y que ésta (agitación o estático) no modula la capacidad de estas proteínas de activar a *ler*, sugiriendo que su expresión es regulada probablemente a nivel transcripcional.

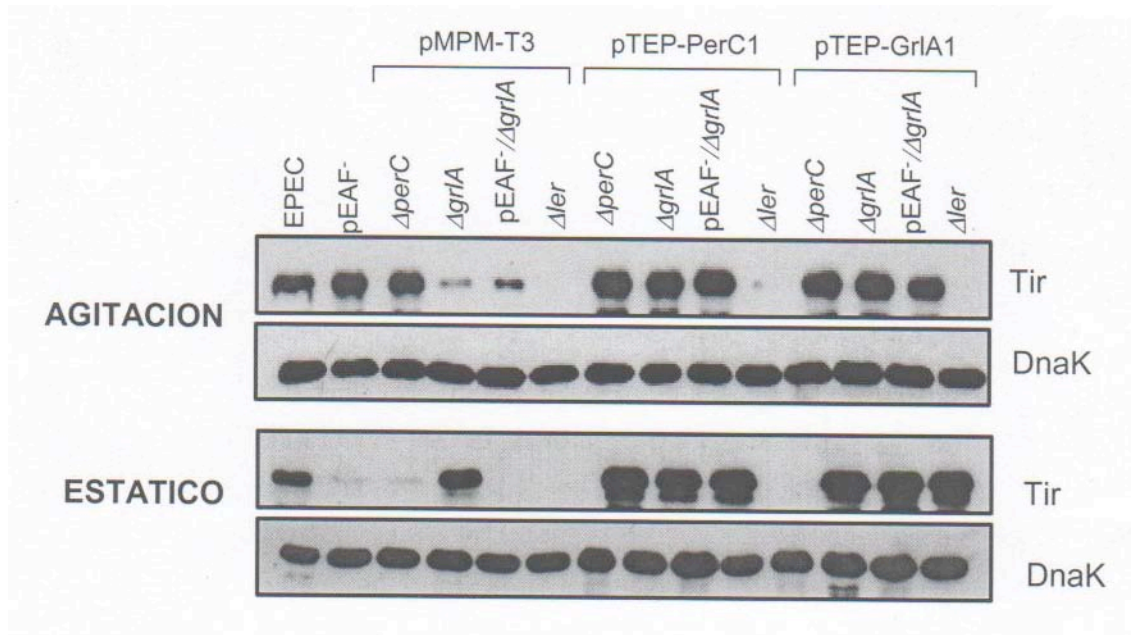


Figura 9. PerC y GrIA activan la expresión de *ler* independientemente de la condición de crecimiento (agitación o estático). Las cepas mutantes $\Delta perC$, $\Delta grlA$, Δler y pEAF-/ $\Delta grlA$ (JPEP3, 5, 6, y 7) fueron transformadas con los plásmidos que expresan PerC (pTEP-PerC1) y GrIA (pTEP-GrIA1) o con el vector pMPPM-T3. La inmunodetección se realizó a partir de proteínas totales de las cepas analizadas. La detección de Tir se realizó utilizando el anticuerpo monoclonal anti-Tir a una dilución de 1:10 000. Como control de carga e integridad de las proteínas por cepa, se detectó DnaK utilizando el anticuerpo monoclonal anti-DnaK a una dilución de 1:50 000. Las muestras se tomaron a partir de cultivos en DMEM a una D.O.₆₀₀=0.8 a 37°C en agitación o en estático.

Los resultados anteriores indican que PerC y GrIA pueden actuar tanto en agitación como en estático, lo que hace posible que su actividad dependa de cuánto se expresan en cada condición de crecimiento. Para analizar la expresión de *perC* y *grIA* en las dos condiciones de crecimiento, las fusiones transcripcionales de los promotores del operón *per* (*per-cat*), que controla la expresión de los genes *perA*, *perB* y *perC*, y del operón *grIRA* (*grIRA-cat*) (Tabla 2), se transformaron en la cepa silvestre de EPEC. Las transformantes resultantes se crecieron en condiciones de agitación y estático, de donde se tomaron muestras para determinar la actividad de las fusiones mediante ensayos de CAT. En estos experimentos observamos que la fusión *per-cat* se expresa mejor en condiciones de crecimiento estático, mientras que la expresión de la fusión *grIRA-cat* se favorece en agitación, aunque en crecimiento estático la expresión sigue siendo significativa (Fig. 10). Estos resultados indican que *perC* y *grIA* se expresan diferencialmente dependiendo de la condición de crecimiento, sugiriendo que de este control transcripcional depende la participación diferencial de PerC o GrIA en la regulación de *ler*.

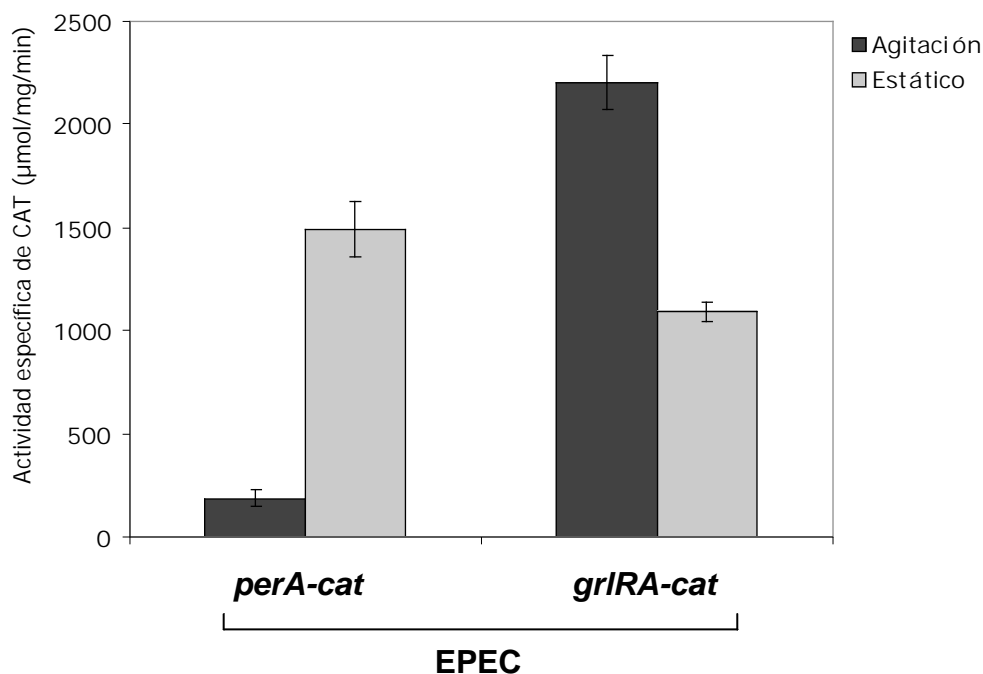


Figura 10. Los promotores que controlan la expresión de PerC y GrIA se expresan diferencialmente en EPEC creciendo en cultivos agitados o estáticos. La actividad de fusiones transcripcionales que contienen la región reguladora del operón *per* (*perA-cat*) y del operón *grIRA* (*grIRA-cat*) se monitoreó en EPEC silvestre (cepa E2348/69 Sm^R). La actividad específica se determinó a partir de cultivos en DMEM a 37°C en agitación y estático a una D.O.₆₀₀=0.8

5.4 Identificación de dominios involucrados en la regulación positiva y negativa de *ler*, así como en la activación mediada por PerC y GrlA

Ler es el producto del primer gen del operón *LEE1*, la región intergénica entre *espG* y *ler* contiene alrededor de 1000 pb. Un estudio previo realizado con fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, las cuales abarcan diferentes porciones de la región reguladora de *ler*, permitió identificar cuáles son los elementos de regulación requeridos para su expresión. Dicho análisis, que se llevó a cabo en la cepa silvestre de EPEC (E2348/69 Sm^R) crecida en condiciones óptimas de expresión para los genes del LEE, reveló que los elementos de regulación de *ler* se encuentran a partir de la posición -260 (Barba J, datos no publicados). Tomando en cuenta este antecedente, se decidió evaluar nuevamente las fusiones *ler-cat* pero en las condiciones de agitación y estático.

La actividad específica de las diferentes fusiones *ler-cat* se muestra en la figura 11. Las fusiones *pler-1179*, *pler-260* y *pler-160* presentan actividad similar. Consistentemente con lo observado anteriormente, encontramos que entre las posiciones de -160 a -98 existe una zona de regulación negativa, ya que la actividad de la fusión *pler-98* aumenta 3 veces en agitación y 8 en estático respecto a la fusión *pler-160*, lo cual sugiere que esta región puede contener un probable sitio de unión para algún represor. Entre las posiciones -98 a -65 se encuentra una zona de control positivo, ya que su remoción afecta dramáticamente la activación del promotor (*pler-98* versus *pler-65*). La fusión transcripcional que abarca hasta la posición -31 no contiene la caja -35, por esta razón no es activa (Fig. 11). Tanto en agitación como en estático no se observó una diferencia en el comportamiento de las fusiones, sugiriendo que GrlA y PerC regulan en forma similar la expresión de *ler* en agitación y estático, respectivamente.

Los resultados que se muestran en las figuras 6, 7 y 8 señalan que PerC y GrlA regulan la expresión de *ler*. Para delimitar cuál sería el área probable sobre la que PerC y GrlA podrían estar realizando su función, se analizó la expresión de las

fusiones *pler-260*, *pler-98*, *pler-65* y *pler-54*. De acuerdo con lo observado en la figura 10, la fusión *pler-260* presenta un comportamiento similar al de la fusión más larga (*pler-1179*), por lo que consideramos contiene todos los elementos necesarios para su regulación. La fusión *pler-98* carece del sitio de unión para un represor, pero contiene el sitio de unión a IHF que ha sido reportado como esencial en la activación de *ler*²⁶, mientras que *pler-65* y *pler-54* carecen de esta zona de regulación positiva, lo cual se refleja en la disminución dramática de su actividad.

Con el propósito de delimitar los sitios de acción de PerC y GrlA, las fusiones *ler-cat* descritas anteriormente, se transformaron en la cepa de *E. coli* MC4100 en presencia de las construcciones pTEP-PerC1 y pTEP-GrlA1 que expresan PerC y GrlA, respectivamente. En presencia de sólo el vector, las fusiones de *ler* no son activas en el fondo genético de *E. coli* MC4100, con excepción de la fusión *pler-98*, la cual presenta cierta actividad independiente de PerC o GrlA (Fig. 12). En presencia de PerC (pTEP-PerC1) todas las fusiones *ler-cat* son activas; la fusión *pler-98* es aproximadamente 2.5 veces más activa respecto a la fusión *pler-260*, mientras que las fusiones *pler-65* y *pler-54* son de 4 a 5 veces menos activas que *pler-98*. Por su parte, todas las fusiones complementadas con GrlA (pTEP-GrlA1) presentan niveles de actividad similares. Tomando en cuenta que la fusión *pler-54* es activada tanto por PerC como GrlA consideramos que ambas proteínas podrían estar actuando entre las posiciones -54 a +217 (Fig. 12). Sin embargo, es evidente que la presencia del sitio de pegado a IHF es importante para la activación óptima de *ler* mediada por PerC, ya que en su ausencia hay una clara disminución de la actividad en comparación con las fusiones que si lo contienen. Por el contrario, GrlA induce niveles similares de activación esté o no el sitio de IHF. Cabe aclarar que IHF es indispensable para la activación de *ler* en presencia del sitio de regulación negativa localizado corriente arriba de la posición -98. Tomando en cuenta que Ler, a su vez, regula la expresión del resto de los promotores del LEE⁶, como control también se introdujo el plásmido pTEP-Ler1 junto con las diferentes fusiones, incluyendo la fusión pSEPZ-11 (*pLEE2-cat*) que contiene un promotor regulado por Ler. Como se esperaba, Ler no es capaz de

activar la expresión de las fusiones de *ler*, pero sí la expresión de la fusión de *sepZ*, la cual no puede ser activada por GrlA o PerC (Fig. 12). Estos resultados confirman que GrlA y PerC regulan específicamente la expresión de *ler*, pero no la de otros promotores contenidos en el LEE.

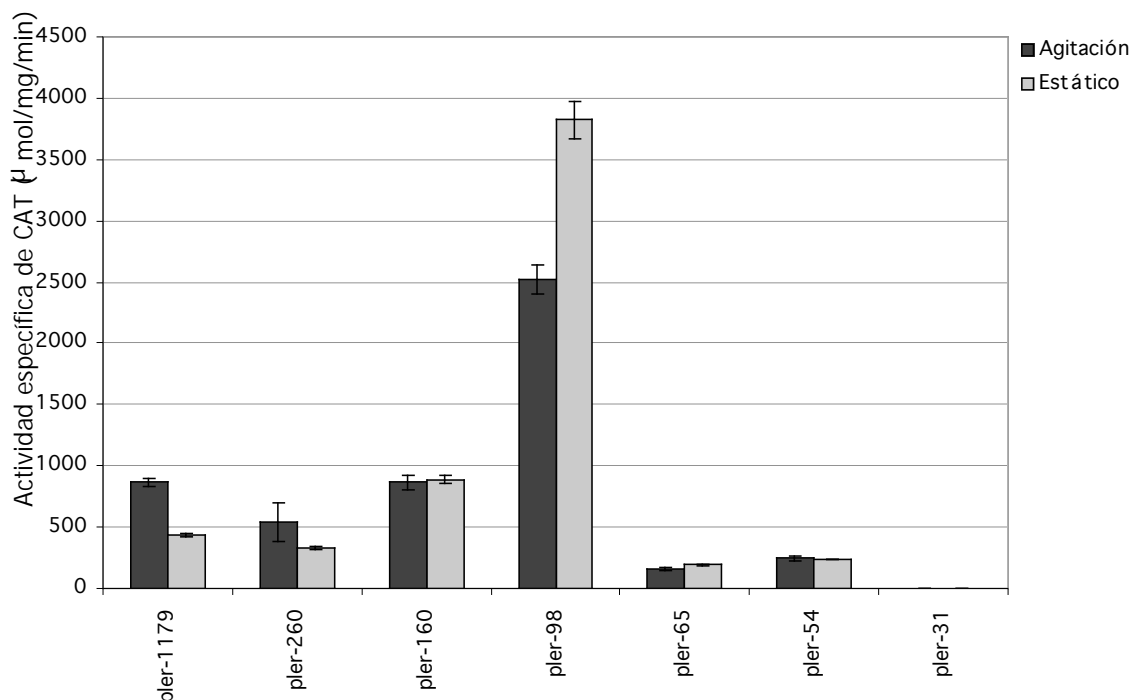


Figura 11. Expresión de las fusiones transcripcionales de la región reguladora de *ler* en diferentes condiciones de crecimiento. Las fusiones se analizaron en el fondo silvestre de EPEC (cepa E2348/69 Sm^R). La actividad específica se determinó a partir de muestras de cultivo en DMEM en agitación y estático a una D.O.₆₀₀=0.8

5.5 Papel de H-NS en la regulación de *ler* mediado por PerC y GrlA

Por estudios realizados en el laboratorio, y lo reportado por otros grupos, se sabe que la proteína H-NS actúa como represor en la regulación transcripcional de *ler* y del resto de los promotores contenidos en el LEE. Con base en estudios realizados con la región promotora de los operones *LEE2* y *LEE3* se ha propuesto que Ler desestabiliza un complejo nucleoproteico represor formado por H-NS y por tanto que actúa como desrepresor^{6, 32}. Para definir si PerC y GrlA inducen la expresión de *ler* actuando como desrepresores que antagonizan a H-NS o si son

esenciales para la activación de *ler* aun en ausencia de este represor, se analizó la expresión de las fusiones transcripcionales de la región reguladora de *ler* en la cepa mutante de *E. coli* MC4100 Δ *hns*, conteniendo o no los plásmidos que expresan PerC o GrIA (Fig. 13).

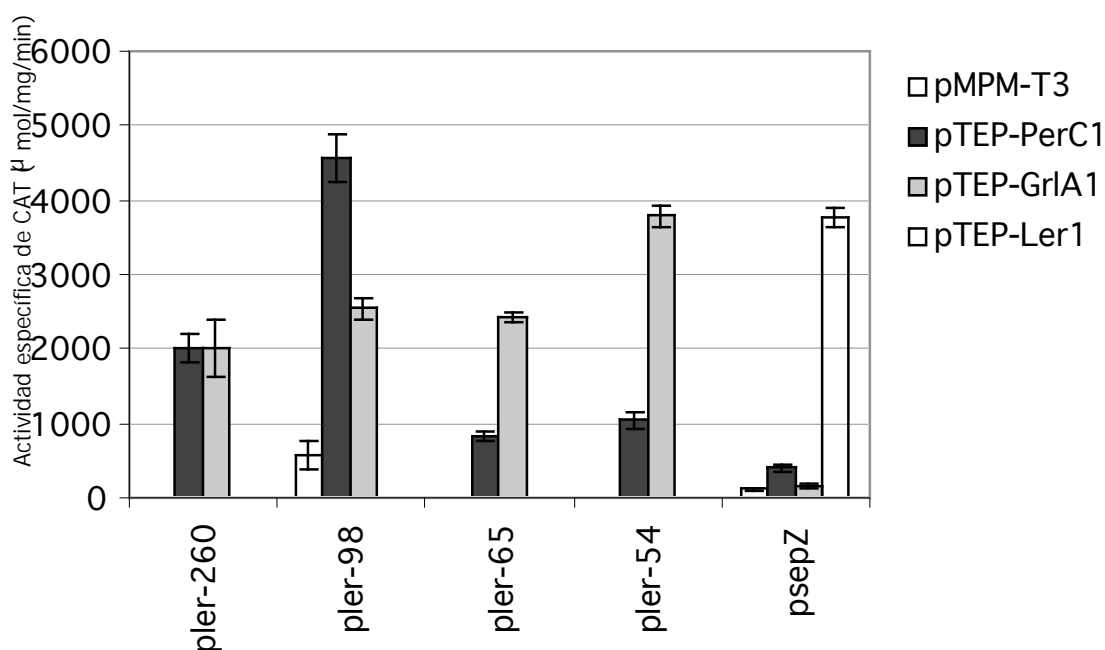


Figura 12. Caracterización de la región reguladora de *ler* necesaria para la activación mediada por PerC y GrIA. Las fusiones transcripcionales *ler-cat* se transformaron en la cepa de *E. coli* MC4100 en presencia de los plásmidos que expresan PerC (pTEP-PerC1), GrIA (pTEP-GrIA1) o Ler (pTEP-Ler1), así como del vector pMPM-T3. En este fondo genético la expresión de las fusiones fue similar tanto en agitación como en estático. La gráfica muestra los resultados obtenidos en la condición de agitación. La actividad específica se determinó a partir de muestras de cultivo en DMEM en agitación a una D.O.₆₀₀=0.8.

Los resultados de este análisis indican que las fusiones *pler-260*, *pler-98*, *pler-65* y *pler-54* son activas en ausencia de H-NS, independientemente de PerC y GrIA; lo cual confirma que H-NS reprime la expresión de *ler*, interactuando con sitios localizados en la región comprendida entre -54 y +217, posiblemente sobre el promotor. Cuando PerC o GrIA están presentes la actividad de las fusiones aumenta alrededor de 3 veces, lo cual sugiere que ambas, además de contrarrestar la represión mediada por H-NS, favorecen también la transcripción del promotor probablemente facilitando el posicionamiento de la RNA polimerasa

sobre la región promotora o, alternativamente, contrarrestando la acción de un segundo represor.

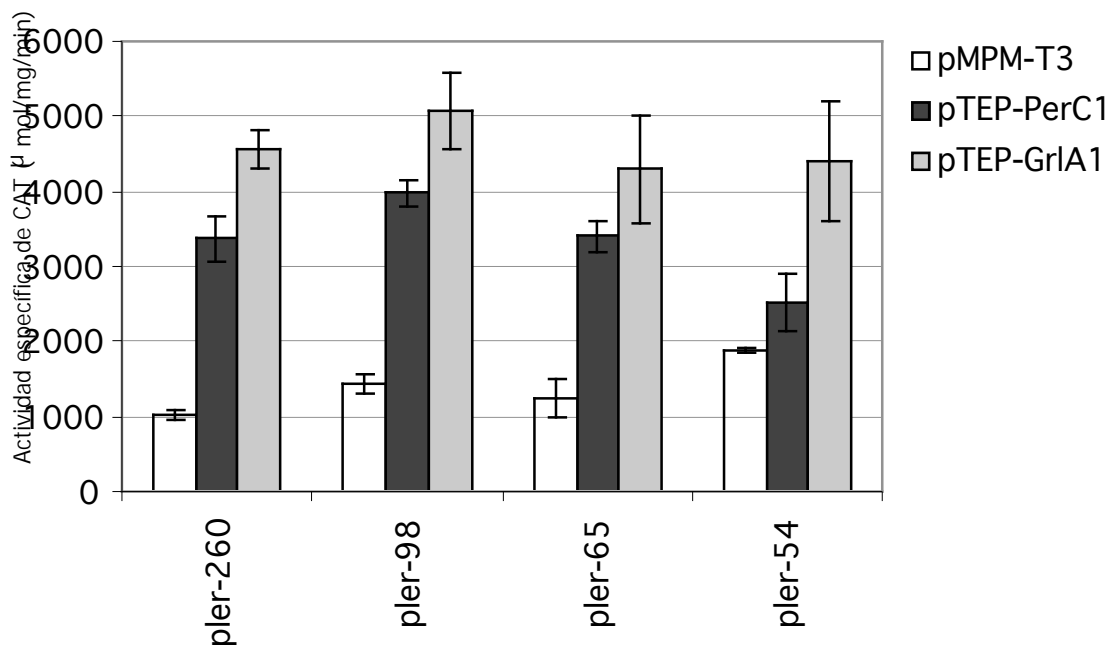


Figura 13. Activación de *ler* en ausencia de H-NS. Las fusiones transcripcionales *ler-cat* se transformaron en la cepa de *E. coli* MC4100 Δ *hns* en presencia de los plásmidos que expresan PerC (pTEP-PerC1) o GrlA (pTEP-GrlA1), o del vector pMPPM-T3. La actividad específica se determinó a partir de muestras de cultivo en DMEM en agitación a una D.O.₆₀₀=0.8.

5.6 Papel de IHF en la regulación de *ler* mediada por PerC y GrlA

El regulador global IHF se requiere para la expresión de *ler*, uniéndose a la secuencia localizada entre las posiciones -53 a -86, con respecto al inicio de transcripción²⁶. Debido a la importancia de IHF en la expresión de *ler* nos preguntamos si PerC y GrlA pueden inducir su expresión en ausencia de este activador. Para contestar esta pregunta analizamos la expresión de las fusiones transcripcionales *ler-cat* en la cepa *E. coli* MC4100 Δ *himA* en presencia de los plásmidos que expresan PerC y GrlA.

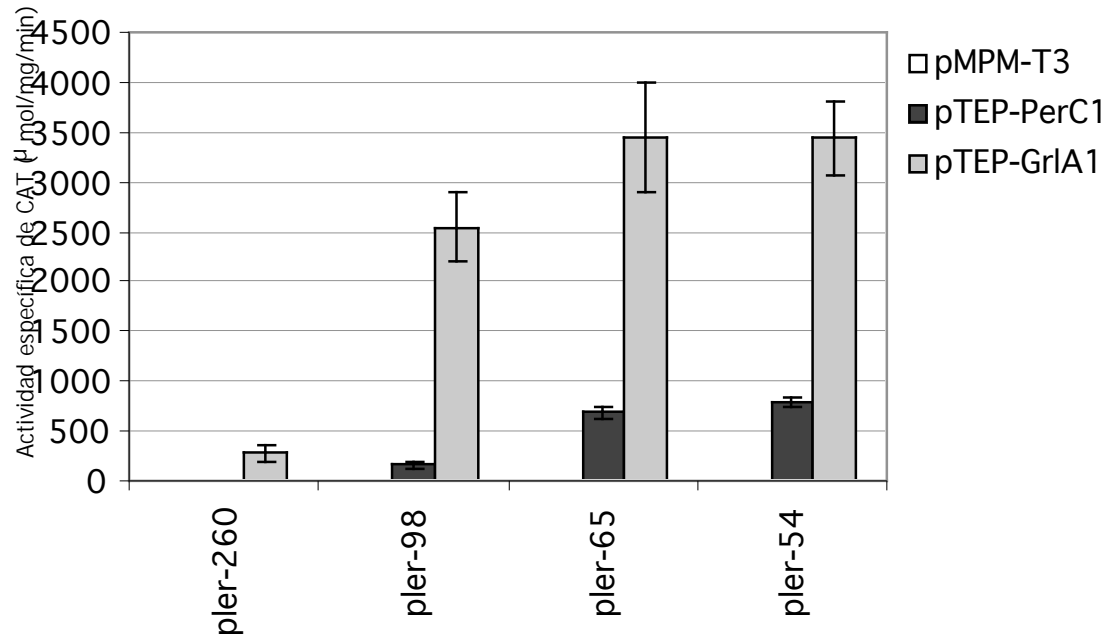


Figura 14. PerC y GrlA requieren de IHF a diferentes niveles para la expresión de *ler*. Las fusiones transcripcionales *ler-cat* se transformaron en la cepa de *E. coli* MC4100 Δ *himA* en presencia de los plásmidos que expresan PerC (pTEP-PerC1), GrlA (pTEP-GrlA1) y el vector pMPPM-T3. La actividad específica se determinó a partir de muestras de cultivo en DMEM en agitación a una D.O.₆₀₀=0.8.

Como se observa en la figura 14, en presencia del vector las fusiones de *ler* no presentan actividad en la mutante MC4100 Δ *himA*, ni aun la fusión *pler-98* que había mostrado actividad en *E. coli* MC4100 silvestre en ausencia de PerC y GrlA (ver Fig. 12). Mientras que PerC es capaz de inducir la expresión de *ler* en *E. coli* MC4100 silvestre, donde la fusión más activa fue *pler-98*, en la cepa MC4100 Δ *himA* la actividad de esta misma fusión se reduce alrededor de 20 veces. Lo anterior confirma la importancia que tiene IHF en la expresión de *ler* mediada por PerC y es consistente con los bajos niveles de activación que alcanzan las fusiones que carecen del sitio de pegado a IHF con PerC en la cepa silvestre. Interesantemente, la fusión *pler-260* no es activada por PerC en ausencia de IHF. Por su parte, en presencia de GrlA la fusión *pler-260* muestra niveles de actividad muy por debajo de los observados en la cepa silvestre. Sin embargo las fusiones *pler-98*, *pler-65* y *pler-54*, que carecen del motivo de regulación negativa localizado corriente arriba de la posición -98, aumentan su actividad

dependiente de GrlA aproximadamente 12 veces respecto a *pler-260* en MC4100 Δ *himA*. En su conjunto, estos resultados indican que tanto PerC como GrlA requieren de IHF para superar la represión que se ejerce en presencia del motivo de regulación negativa localizado corriente arriba de la posición -98. Sin embargo, PerC también la requiere para actuar adecuadamente como activador ya que sólo GrlA es capaz de inducir adecuadamente la expresión de las fusiones *pler-98*, *pler-65* y *pler-54* en ausencia de IHF. Así, IHF podría estar estructurando correctamente al DNA para dejar expuestos los sitios con los que PerC interactúa.

6. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Como parte de este trabajo se hizo un análisis detallado sobre el papel de PerC en la expresión de *ler*, con el propósito de aportar evidencias que ayudaran a aclarar la mencionada controversia y entender mejor la función de esta proteína. Los primeros resultados nos indicaron que PerC no participaba en la regulación de los genes del LEE en condiciones de crecimiento consideradas como óptimas para su expresión (medio de cultivo DMEM a 37°C en agitación)^{42,53}, ya que el perfil de secreción de proteínas y la expresión de las fusiones transcripcionales *pLEE2-cat*, *ptir-cat* y *pler-1179*, en la cepa Δ *perC* no se alteran en comparación con la cepa silvestre (Fig. 6, 7 y 8).

Para EPEC y EHEC a la fecha son pocas las condiciones de crecimiento *in vitro* reportadas en la literatura que afectan la regulación de la expresión de sus factores de virulencia. Se propone que estas condiciones simulan las encontradas por estas bacterias en el intestino durante la infección. Dichos estudios han evaluado cómo es la expresión de factores de virulencia en respuesta al crecimiento en diferentes medios de cultivo (como el LB o el M9) o a diferente temperatura, o en presencia de amonio, bicarbonato o CO₂^{1,39,42,53,62}. Para *C. rodentium* las condiciones de crecimiento consideradas como óptimas para la expresión de los genes del LEE son idénticas a las de EPEC, pero en crecimiento estático, ya que la agitación inhibe la expresión^{3,17}. Con el propósito de definir si las condiciones de crecimiento influyen en la posible función de PerC como regulador de *ler*, la mutante en *perC* y la cepa curada del plásmido EAF, con y sin fusiones, fueron crecidas en cultivos estáticos. El análisis de la secreción de proteínas, y de la expresión de las fusiones transcripcionales a partir de muestras de estos cultivos, mostró que tanto la transcripción, incluyendo la de *ler*, como la secreción de proteínas se abatían significativamente en estas cepas indicando que PerC regula positivamente a *ler* (Fig. 6, 7 y 8). Por el contrario, en una mutante en *grlA* se afecta la expresión de *ler-cat* y de *tir-cat*, así como la secreción de proteínas en cultivos crecidos en agitación, pero no en estáticos. Cabe resaltar que, al contrario de EPEC, el crecimiento estático es el que permite evidenciar la función de GrlA en *C. rodentium* donde no existe PerC^{3, 17} (Fig. 6, 7 y 8). Con

estos experimentos no sólo demostramos la importancia que tiene GrlA en EPEC, sino que también identificamos las condiciones en las que se hace evidente la función de PerC en la regulación de *ler*. Cuando analizamos la mutante en *epcH*, el homólogo cromosomal de PerC en EPEC, no se afectó la expresión de los genes del LEE (Fig. 6, 7 y 8). Esto contrasta con el fenotipo que genera la mutación de los genes *pchA* y *pchB* que codifican para homólogos de PerC en EHEC, en donde la secreción y expresión de fusiones transcripcionales se afecta significativamente³⁵. De esta manera deducimos que *EpcH* no regula la expresión de *ler* en ninguna de las condiciones de crecimiento utilizadas en este estudio.

En su conjunto estos resultados indican que PerC regula positivamente a *ler* en la condición de crecimiento estático, mientras que GrlA lo hace en la condición de agitación. ¿De qué depende que estos dos reguladores actúen diferencialmente dependiendo de la condición de crecimiento? Una posibilidad es que PerC y GrlA estén siempre presentes, pero que respondan de forma distinta a las condiciones de crecimiento de tal manera que PerC sea activa en crecimiento estático y GrlA lo sea en agitación; alternativamente, la expresión de *perC* y *grlA* podría estar regulada recíprocamente por las condiciones de crecimiento. De acuerdo con el experimento donde las mutantes en *perC* o *grlA* fueron transformadas con plásmidos que expresan a PerC o GrlA bajo un promotor constitutivo (Fig. 10), se observó que ambas proteínas son funcionales en las dos condiciones de crecimiento. Por su parte, el análisis de la expresión de los promotores de los operones *per* y *grlRA*, de los cuales depende la expresión de los genes *perC* y *grlA*, respectivamente, mostró que las condiciones de crecimiento regulan recíprocamente la expresión de PerC y GrlA (Fig. 10), sugiriendo que el control de la expresión de *ler* depende de los niveles de expresión de cada proteína bajo una condición particular (estático o agitado), los cuales se controlan a nivel transcripcional.

Consideramos que las condiciones de crecimiento (agitación y estático) utilizadas en el laboratorio podrían estar mimetizando condiciones ambientales a las que se enfrenta EPEC durante su recorrido por el intestino y en diferentes

etapas del proceso de infección, las cuales determinan la actividad diferencial de PerC y GrlA. Sin embargo, no es claro aún cuál es la señal y el mecanismo que controlan los niveles de expresión de PerC o GrlA. En un principio consideramos que el CO₂ podría estar involucrado; sin embargo, cuando analizamos la expresión de fusiones *ler-cat* en condiciones de crecimiento estático en ausencia de CO₂ observamos que los niveles de expresión son similares a cuando el CO₂ está presente (dato no mostrado). Esto nos indicó que la señal no está dada por el CO₂. Otro elemento que consideramos que podría estar involucrado es el oxígeno, ya que en la condición de crecimiento estático es de esperar que la disponibilidad de oxígeno en el cultivo sea reducida (microaerobiosis), en comparación con el crecimiento en agitación donde éste no sería una limitante (aerobiosis). En bacterias, el mecanismo que se ha descrito para la detección del oxígeno involucra al sistema de dos componentes ArcB/ArcA^{7,13}, por lo que resultaría interesante evaluar si está involucrado en el control de la expresión de PerC y GrlA. Una forma de responder esta pregunta es estudiando las fusiones transcripcionales *ler-cat*, *per-cat* y *grlA-cat* en condiciones de bajo oxígeno. Otra señal ambiental que consideramos podría estar involucrada en la regulación es el pH, ya que Este cambia a lo largo del cultivo en ambas condiciones de crecimiento. Los cultivos en agitación tienen un pH inicial de 7, pero al término del experimento su pH es de 6. En la condición de crecimiento estático el pH inicial es de 7 (al igual que en agitación), pero al cabo de 9 horas, que es el tiempo al que se tomaron las muestras, el pH disminuyó a 5. Para poder definir claramente el papel que juega el pH en la expresión de *perC* y *grlA*, así como de *ler*, será necesario analizar la actividad de diferentes fusiones transcripcionales y los perfiles de secreción de diferentes mutantes tanto en cultivos agitados como estáticos bajo diferentes pHs. Para esto se mantendrá estable un pH determinado del medio de cultivo desde un inicio, utilizando algún amortiguador como HEPES o MOPS.

En organismos patógenos y no patógenos se han descrito diferentes mecanismos de regulación en respuesta a señales ambientales, siendo uno de los más usuales la regulación a nivel transcripcional que en la mayoría de los

casos, involucra a más de una proteína con propiedades de unión a DNA^{38,41,45,62}. Al estudiar las fusiones transcripcionales *ler-cat* en la cepa silvestre de EPEC (E2348/69) (Fig. 11), encontramos que los elementos en *cis* involucrados en la regulación de *ler* están localizados entre las posiciones -160 a +217 respecto al inicio de transcripción. Las fusiones *pler-260*, *pler-98*, *pler-65* y *pler-54* se expresaron en la cepa de EPEC silvestre, mientras que en *E. coli* MC4100 solamente *pler-98* mostró cierta expresión en ausencia de cualquier regulador de EPEC (Fig. 12). Esto nos sugirió que corriente arriba de la posición -98 se encuentra un probable sitio de unión para algún represor. Todas las fusiones *ler-cat* fueron activas en *E. coli* MC4100 en presencia de PerC o GrIA, siendo la más activa *pler-98*.

En estudios anteriores se ha reportado que H-NS reprime la expresión de *ler* en EPEC⁶. De igual manera parece suceder en *E. coli* MC4100 ya que las fusiones *ler-cat* fueron activas por sí mismas en ausencia de H-NS (MC4100 Δ *hns*) (Fig. 12 y 13); sin embargo, la expresión de las fusiones no alcanza los niveles observados en presencia de PerC o GrIA. Lo anterior podría deberse a que otro represor sustituye a H-NS o actúa junto con él para regular negativamente la expresión de *ler*. Uno de los candidatos podría ser StpA, la cual es un homólogo de H-NS que también se ha involucrado en procesos de regulación negativa²⁴. Otro posible candidato podría ser Hha, una proteína asociada al nucleoide que se ha reportado reprime la expresión de *ler*⁵⁹. Para evaluar estas posibilidades se podría analizar la expresión de las fusiones *ler-cat* en una doble mutante MC4100 Δ *hns* Δ *stpA* o MC4100 Δ *hns* Δ *hha* en presencia y ausencia de PerC y GrIA. Los resultados en MC4100 Δ *hns* indican que PerC y GrIA actúan, al menos en parte, como desrepresores, ya que en ausencia de H-NS el promotor de *ler* presenta niveles significativos de expresión constitutiva. De acuerdo con lo observado en la cepa MC4100 Δ *hns* el represor H-NS actúa entre las posiciones de -54 a +217; lo anterior es consistente con lo observado en geles de retardamiento en donde H-NS se pega preferencialmente en la parte estructural de *ler* (Barba J, datos no publicados).

Las fusiones *pler-260*, *pler-98* y *pler-65* contienen el sitio de unión a IHF, el cual es esencial para la expresión de *ler*²⁶, aunque no suficiente ya que las

fusiones de *ler* no son activas en ausencia de PerC o GrlA en *E. coli* MC4100 donde IHF está presente (Fig. 12). Sin embargo, en una mutante *E. coli* MC4100 Δ *himA* observamos que PerC y GrlA requieren de IHF para eliminar la represión que se ejerce corriente arriba de la posición -98. Esto se ve reflejado en el nivel de expresión de la fusión *pler-260* en esta cepa, donde la presencia de GrlA induce niveles muy pobres de expresión (Fig. 14). Al ir recortando la región reguladora la expresión de las fusiones promovida por GrlA se recupera. Para las fusiones *pler-98*, *pler-65* y *pler-54* la situación es diferente cuando van acompañadas de PerC, ya que a pesar de que no contienen el elemento de regulación negativa los niveles de actividad resultan bajos, aun para la fusión *pler-98* que fue la más activa en *E. coli* MC4100. Llama la atención que la fusión *pler-54*, que no contiene el sitio de unión a IHF, sea activa en presencia de PerC o GrlA, lo cual sugiere que GrlA y PerC probablemente interactúan con una secuencia localizada entre las posiciones -54 a +217, la misma región que también parece contener el sitio donde interactúa H-NS (Figs. 12 y 13).

Los resultados obtenidos en las cepas MC4100, MC100 Δ *hns* y MC4100 Δ *himA* nos dan la pauta para proponer un mecanismo que permite la expresión de *ler*. Inicialmente, para la activación de *ler* dependiente tanto de PerC como de GrlA, se debe eliminar la represión mediada por el motivo de regulación negativa localizado entre las posiciones -160 a -98 y por un represor hasta ahora desconocido. Para esto es necesario IHF la cual en presencia de PerC o GrlA permite, posiblemente, la estructuración correcta del DNA para eliminar la represión antes mencionada (Fig. 15A). Esto, a su vez, parece dejar expuesto el sitio con el cual PerC interactúa para eliminar la represión que ejerce H-NS sobre o cerca del promotor. Cuando la expresión de *ler* es activada por GrlA la presencia de IHF sólo se requiere para eliminar la represión que se ejerce corriente arriba de la posición -98, pero no para contrarrestar la represión mediada por H-NS en la vecindad del promotor, ya que en ausencia de dicho motivo de regulación negativa GrlA no requiere de IHF para activar, como se observa en el caso de las fusiones más cortas (Fig. 15B). En *Vibrio cholerae*, entre otros ejemplos, se describió que para la expresión de los operones *tcp* y *tox*, ToxT desplaza a H-NS de la región promotora⁶⁷, lo cual asemeja lo observado para PerC y GrlA.

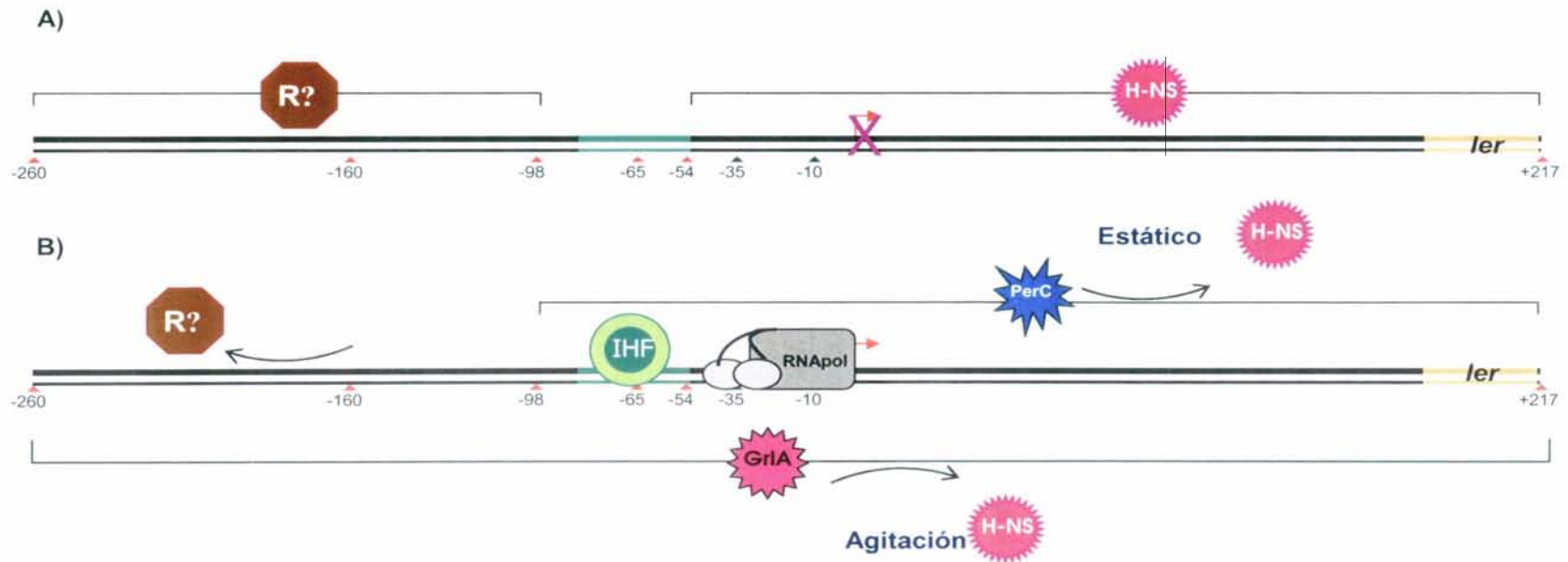


Figura 15. Mecanismo de regulación propuesto para PerC y GrIA en la expresión de *ler*. La regulación negativa mediada por H-NS se ubica entre los sitios -54 a +217 respecto al inicio de transcripción. La región en la cual actúa el represor desconocido (R?) esta entre las posiciones -98 a -260, en verde se marca el sitio de unión de IHF, **A**). Una vez que IHF reconoce su sitio causa cambios en la estructuración del ADN, ocasionando que la represión causada corriente arriba de -98 se elimine, a su vez se deja expuesta la región en la cual PerC desplaza a H-NS (-98 a +217). GrIA por su parte induce la expresión de *ler* (desplazando a H-NS) aún cuando está presente la represión corriente arriba de -98, **B**). El mecanismo anterior ocurre en cada una de las condiciones de crecimiento correspondientes para cada regulador, agitación para GrIA y estático para PerC. Este esquema se propone de acuerdo con lo observado en las fusiones transcripcionales *ler-cat* en los diferentes fondos genéticos

Independientemente de su posible papel como antirepresores, tanto GrlA como PerC parecen facilitar la interacción productiva de la RNA polimerasa sobre la región promotora de *ler*.

Como mencionamos en la introducción la isla LEE se encuentra altamente conservada entre los patógenos A/E; sin embargo, pensamos que la regulación del LEE varía dependiendo del patógeno, lo cual puede deberse a la presencia de reguladores transcripcionales adicionales. En EPEC y EHEC las proteínas tipo PerC se encuentran conservadas, además se ha demostrado que son capaces de inducir la expresión del LEE^{35,50}, mientras que en *C. rodentium* no se han identificado proteínas de este tipo; sin embargo, cuando se complementa con PerC una mutante en *grlA* de *C. rodentium* se restaura la secreción de proteínas en agitación y estático (Barba J, dato no mostrado), indicando que los elementos en *cis*, involucrados en la regulación de *ler*, están muy conservados entre los patógenos A/E. Es interesante que GrlA en *C. rodentium* solamente actúe en la condición de crecimiento estático, ya que en agitación la expresión de los genes del LEE se reprime, caso contrario a lo que observamos en EPEC en donde actúa en agitación^{3,17}. Queda por saber qué es lo que sucede en EHEC.

EPEC al infectar a un hospedero se enfrenta a condiciones ambientales distintas a las que puede encontrar como organismo de vida libre. Durante su tránsito por el hospedero, la bacteria se enfrenta a cambios ambientales drásticos generados, por ejemplo, por la temperatura corporal, la acidez del estómago o las concentraciones cambiantes de ciertos compuestos como el amonio o la fuente de carbono, entre otras moléculas que hay en el intestino. Por lo anterior, la expresión de sus genes tendrá que ser regulada en diferentes formas, en respuesta a las distintas señales^{39,45,60,62}. Pensando en el recorrido anterior, los factores de virulencia codificados fuera y dentro del LEE, al igual que los codificados en el plásmido EAF, no podrían estarse expresando siempre, por lo que su expresión tendría que ser temporal dependiendo de la situación y la condición ambiental. Por ejemplo, GadX ayudaría a expresar genes de resistencia ácida que le permitan a EPEC sobrevivir en el trayecto del tracto gastrointestinal donde las condiciones de acidez varían⁶⁰. A su vez,

estaría reprimiendo la expresión del operón *per*, por lo que no podría expresarse la fimbria BFP y la expresión del LEE por medio de PerC tampoco se llevaría a cabo. Otros reguladores transcripcionales descritos podrían contribuir en la adaptación e identificación de condiciones ambientales adecuadas para la colonización. Cuando las condiciones son ideales para colonizar, los operones *per* y *bfp* comenzarían a expresarse. Una vez que PerC ha sido producido se comenzaría a inducir la expresión de *ler*, cuyo producto (Ler), a su vez, activaría la del resto de los genes de virulencia. Por otro lado, GrlA se encargaría de mantener la expresión de *ler* en las siguientes etapas del proceso de infección. La capacidad de responder a diferentes condiciones ambientales para asegurar la expresión de los genes del LEE, mediante la actividad de dos reguladores transcripcionales que funcionalmente son muy parecidos, sin duda ha dado a EPEC una ventaja evolutiva.

Nuestro trabajo genera nuevas preguntas. ¿Qué mecanismo permite la activación diferencial de *perC* y *grlA*, y, por tanto, la de *ler* en respuesta a las diferentes condiciones de crecimiento? ¿Cómo activan y/o desreprimen PerC y GrlA la expresión de *ler*? ¿Qué otros represores están involucrados en la regulación negativa de *ler*? ¿Cómo participa IHF para eliminar la represión ejercida sobre el motivo localizado corriente arriba de la posición -98? Entre otras.

Para conocer con más detalle el mecanismo que siguen PerC y GrlA en la expresión de *ler* se han planteado las siguientes perspectivas:

- Etiquetar las proteínas PerC y GrlA para saber cuál es la concentración de cada una de ellas en las diferentes condiciones de crecimiento.
- Estudiar en EPEC la expresión de los operones *per*, *grlA* y *ler* en condiciones de bajo oxígeno.
- Estudiar en EPEC y en las cepas mutantes de *perC* y *grlA* el efecto del pH sobre la expresión de fusiones transcripcionales *ler-cat*.

- Construir las mutantes en *hhA* y *stpA* para saber si alguno de los dos actúa como represor corriente arriba de la posición -98.
- Construir la doble mutante *hns/himA* en *E. coli* MC4100 para saber si en ausencia de estos dos reguladores PerC y GrlA son capaces de inducir la expresión de las fusiones *ler-cat*.
- Purificar las Proteínas PerC y GrlA fusionadas a histidinas o con alguna otra etiqueta que facilite su purificación. De esta manera se podrían hacer ensayos de retardamiento o de protección a DNasa y saber si PerC o GrlA se unen a DNA o si interactúan con la RNA polimerasa.
- Definir el papel de PerB en la regulación del operón *per* y si está involucrado con la regulación de genes de virulencia.

7. BIBLIOGRAFIA

1. Abe, H., I. Tatsuno, T. Tobe, A. Okutani, and C. Sasakawa. 2002. Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 70:3500-9.
2. Anderson, G. G., K. W. Dodson, T. M. Hooton, and S. J. Hultgren. 2004. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends Microbiol* 12:424-30.
3. Barba, J., V. H. Bustamante, M. A. Flores-Valdez, W. Deng, B. B. Finlay, and J. L. Puente. 2005. A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrIA. *J Bacteriol* 187:7918-30.
4. Berdichevsky, T., D. Friedberg, C. Nadler, A. Rokney, A. Oppenheim, and I. Rosenshine. 2005. Ler is a negative autoregulator of the *LEE1* operon in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187:349-357.
5. 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* 280:2114-8.
6. 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* 39:664-78.
7. Chao, G., J. Shen, C. P. Tseng, S.J. Park, and R. P. Gunsalus. 1997. Aerobic regulation of isocitrate dehydrogenase gene (*icd*) expression in *Escherichia coli* by the *arcA* and *fnr* gene products. *J Bacteriol* 179:4299-4304.
8. Chen, H. D., and G. Frankel. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* 29:83-98.
9. Clarke, S. C., R. D. Haigh, P. P. Freestone, and P. H. Williams. 2003. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* 16:365-78.
10. Cleary, J., L. C. Lai, R. K. Shaw, A. Straatman-Iwanowska, M. S. Sonnenberg, G. Frankel, and S. Knutton. 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* 150:527-38.
11. Creasey, E. A., R. M. Delahay, S. J. Daniell, and G. Frankel. 2003. Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 149:2093-106.

12. Collado-Vides, J y F. Blattner. 1999. El genoma de *E. coli* al desnudo. *Investigación y ciencia*, Marzo 44-45.
13. Cunningham, L., M. J. Gruer, and J. R. Guest. 1997. Transcriptional regulation of the aconitase genes (*acnA* and *acnB*) of *Escherichia coli*. *Microbiology* 143:3795–3805.
14. Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640-6645.
15. Dean, P., M. Maresca, and B. Kenny. 2005. EPEC's weapons of mass subversion. *Curr Opin Microbiol* 8:28-34.
16. Deng, W., Y. Li, B. A. Vallance, and B. B. Finlay. 2001. Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. *Infect Immun* 69:6323-35.
17. Deng, W., J. L. Puente, S. Gruenheid, Y. Li, B. A. Vallance, A. Vazquez, J. Barba, J. A. Ibarra, P. O'Donnell, P. Metalnikov, K. Ashman, S. Lee, D. Goode, T. Pawson, and B. B. Finlay. 2004. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3597-602.
18. Donnenberg, M. S., and T. S. Whittam. 2001. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Invest* 107:539-48.
19. Dorman, C. J. 2004. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol* 2:391-400.
20. Dorman, C. J., and P. Deighan. 2003. Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr Opin Genet Dev* 13:179-84.
21. Edwards, R. A., and J. L. Puente. 1998. Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *Trends Microbiol* 6:282-287.
22. Elliott, S. J., V. Sperandio, J. A. Giron, 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* 68:6115-26.
23. Elliott, S. J., L. A. Wainwright, T. K. McDaniel, K. G. Jarvis, Y. K. Deng, L. C. Lai, B. P. McNamara, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* 28:1-4.

24. Free, A., M. E. Porter, P. Deighan, and C. J. Dorman. 2001. Requirement for the molecular adapter function of StpA at the *Escherichia coli* *bgl* promoter depends upon the level of truncated H-NS protein. *Mol Microbiol* 42: 903–918.
25. Freundlich, M., N. Ramani, E. Mathew, A. Sirko, and P. Tsui. 1992. The role of integration host factor in gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 6:2557-63.
26. 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* 34:941-52.
27. Garmendia, J., G. Frankel, and V. F. Crepin. 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* 73:2573-85.
28. Gartner, J. F., and M. A. Schmidt. 2004. Comparative analysis of locus of enterocyte effacement pathogenicity islands of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 72:6722-8.
29. Gomez-Duarte, O. G., and J. B. Kaper. 1995. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 63:1767-76.
30. 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.
31. 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* 48:507-21.
32. 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* 71:384-92.
33. Ibarra, J. A., M. I. Villalba, and J. L. Puente. 2003. Identification of the DNA binding sites of PerA, the transcriptional activator of the *bfp* and *per* operons in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185:2835-47.
34. Iyoda, S., and H. Watanabe. 2005. ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187:4086-94.
35. Iyoda, S., and H. Watanabe. 2004. Positive effects of multiple *pch* genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 to HEp-2 cells. *Microbiology* 150:2357-571.

36. Kanack, K. J., J. A. Crawford, I. Tatsuno, M. A. Karmali, and J. B. Kaper. 2005. SepZ/EspZ is secreted and translocated into HeLa cells by the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system. *Infect Immun* 73:4327-4337.
37. Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2:123-40.
38. Kaper, J. B., and V. Sperandio. 2005. Bacterial cell-to-cell signaling in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 73:3197-209.
39. 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* 65:2606-12.
40. Li, M., I. Rosenshine, S. L. Tung, X. H. Wang, D. Friedberg, C. L. Hew, and K. Y. Leung. 2004. Comparative proteomic analysis of extracellular proteins of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* strains and their *ihf* and *ler* mutants. *Appl Environ Microbiol* 70:5274-5282.
41. Martinez-Antonio, A., and J. Collado-Vides. 2003. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 6:482-9.
42. Martinez-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* 33:153-66.
43. Mayer, M. P. 1995. A new set useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* 163:41-46.
44. McLeod, S. M., and R. C. Johnson. 2001. Control of transcription by nucleoid proteins. *Curr Opin Microbiol* 4:152-9.
45. Mekalanos, J. J. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* 174:1-7.
46. Mellies, J. L., F. Navarro-Garcia, I. Okeke, J. Frederickson, J. P. Nataro, and J. B. Kaper. 2001. *espC* pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. *Infect Immun* 69:315-24.
47. Mellies, J. L., S. J. Elliott, 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* 33:296-306.
48. Nougayrede, J. P., P. J. Fernandes, and M. S. Donnenberg. 2003. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol* 5:359-72.

49. Pérez Pérez, M. G. 2001. Estudio de la expresión del gen *ler* de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). Tesis Licenciatura. Universidad Autónoma del estado de Morelos, Cuernavaca, Mor.
50. Porter, M. E., P. Mitchell, A. Free, D. G. Smith, and D. L. Gally. 2005. The *LEE1* promoters from both enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* can be activated by PerC-Like proteins from either organism. *J Bacteriol* 187:458-472.
51. Porter, M. E., P. Mitchell, A. J. Roe, A. Free, D. G. Smith, and D. L. Gally. 2004. Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, PerA from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 54:1117-33.
52. Puente J.L., and B.B. Finlay. 2001. Pathogenic *Escherichia coli*. In E. A. Groisman (ed.), *Principles of bacterial Pathogenesis*. Academic Press. Pp. 387-456.
53. Puente, J. L., D. Bieber, S. W. Ramer, W. Murray, and G. K. Schoolnik. 1996. The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol* 20:87-100.
54. Rhen, M., and C. J. Dorman. 2005. Hierarchical gene regulators adapt *Salmonella enterica* to its host milieus. *Int J Med Microbiol* 294:487-502.
55. Rice, P. A. 1997. Making DNA do a U-turn: IHF and related proteins. *Curr Opin Struct Biol* 7:86-93.
56. Sanchez-SanMartin, 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* 183:2823-33.
57. Sánchez San Martín, C. 2001. Estudio sobre la regulación de los genes *orf19*, *tir*, *cesT* y *eae* de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). Tesis Doctoral. Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Mor.
58. Salyers A.A. and D.D. Whitt. 2001. *Bacterial pathogenesis a molecular approach*. ASM Press. Pp. 407-418.
59. Sharma, V.K, S. A. Carlson, and T. A Casey. 2005. Hyperadherence of an *hha* mutant of *Escherichia coli* O157:H7 is correlated with enhanced expression of LEE-encoded adherence genes. *FEMS Microbiol Lett* 243:189-196.
60. 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* 41:1133-1150.

61. Sosa Macias, M. G. 1999. Regulación transcripcional y traduccional del locus *bfpTVW* de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). Tesis Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México., Cuernavaca, Mor.
62. Stretton, S., and A. E. Goodman. 1998. Carbon dioxide as a regulator of gene expression in microorganisms. *Antonie van Leeuwenhoek* 73:79-85.
63. Tobe, T., G. K. Schoolnik, I. Sohel, V. H. Bustamante, and J. L. Puente. 1996. Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 21:963-75.
64. Torres, A. G., X. Zhou, and J. B. Kaper. 2005. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun* 73:18-29.
65. Umanski, T., I. Rosenshine, and D. Friedberg. 2002. Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 148:2735-44.
66. Yoh, M., Z. Bi, J. Matsuyama, K. Nagayama, and T. Honda. 2003. Effect of environmental conditions on proteins secreted by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11. *Microbiol Immunol* 47:1-6.
67. Yu, R. R., and V. J. DiRita. 2002. Regulation of gene expression in *Vibrio cholerae* by ToxT involves both antirepression and RNA polymerase stimulation. *Mol Microbiol* 43:119-134.
68. Zhang, L., R. R. Chaudhuri, C. Constantinidou, J. L. Hobman, M. D. Patel, A. C. Jones, D. Sarti, A. J. Roe, I. Vlisidou, R. K. Shaw, F. Falciani, M. P. Stevens, D. L. Gally, S. Knutton, G. Frankel, C. W. Penn, and M. J. Pallen. 2004. Regulators encoded in the *Escherichia coli* type III secretion system 2 gene cluster influence expression of genes within the locus for enterocyte effacement in enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Infect Immun* 72:7282-7293.

8. Apéndice

Medios de cultivo

Luria Bertani (LB) *

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g

Aforar a 1 L con agua bidestilada y ajustar pH 7.5

Agar LB *

A 250 mL de LB se le agregaron 3.75 g de agar (1.5% de agar, concentración final)

Medio SOB *

Bacto triptona	10 g
Extracto de levadura	2.5 g
NaCl	0.292 g
KCl	0.093 g

Aforar a 500 mL con agua bidestilada y ajustar el pH a 7.0

Medio SOC *

Bacto triptona	2 g
Extracto de levadura	2.5 g
NaCl 5 M	0.2 mL
KCl 1 M	0.25 mL
MgSO ₄ 1 M	1 mL
MgCl ₂	1 mL
Glucosa	0.360 g

Aforar a 100 mL y ajustar el pH a 7.5

Medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Gibco BRL) *

Un sobre de medio DMEM se disuelve en 1 L de agua. Se agrega 3.7 g de bicarbonato de sodio y 100 µL de fosfato de piridoxal (40 mg/mL). Dejar en agitación hasta que esté bien disuelto.

Esterilizar por filtración y guardar en frasco ámbar estéril a 4 °C.

Soluciones

Soluciones para la extracción de plásmidos

Solución 1 *

Glucosa 50 mM

EDTA 10 mM

Tris-HCl 25 mM pH 8.0

Solución 2

Na OH 0.2 N

SDS 1%

Solución 3 *

Acetato de potasio 5M pH 7.8

Soluciones para la extracción de plásmido EAF

Solución 1

Tris HCl 1M pH 7.8

EDTA 50mM

Glucosa 20%

Lisozima

Solución 2

Na OH 0.2 N

SDS 1%

Solución 3 *

Acetato de potasio 5M pH 7.8

Soluciones para ensayo de actividad de CAT

Solución de lavado

Tris H-Cl pH 7.8 1M 2.5 mL

DTT (Ditrio Treitol) 1M 1.2 μ L

Cantidad para 50 mL

Regulador Tris glicina 4X[∞]

Glicina 57.6 g

Trisma base 12.0 g

Aforar a 1 L con agua Milli-Q y filtrar, guardar en refrigeración. Se diluye 1:4 y se le adiciona SDS 1%

Regulador para transferencia

	p/ 1 L	Concentración final
Tris Base	5.82 g	48 mM
Glicina	2.93 g	39 mM
SDS 10%	3.75 mL	0.375%
Metanol	200 mL	20%

TBS Tween

	p/500 mL	Concentración final
Tris HCl pH 7.5 1 M	5 mL	10 mM
NaCl 5 M	15 mL	150 mM
Tween 20 (BioRad)	250 µL	0.05 %

Regulador de fosfato (PBS) 10X *

NaCl	80 g
Na ₂ HPO ₄	6.1 g
KH ₂ PO ₄	2.0 g
KCl	2.0 g

Ajustar el pH a 7.4 y aforar a 1 L con agua Milli-Q.

* Medios y soluciones que se esterilizan en autoclave 15 minutos/ 121 °C

∞ Medios y soluciones que se esterilizan por filtración