



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL
GEN *nleB2* DE *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

TOMÁS VILLASEÑOR TOLEDO

TUTOR:
DR. JUAN MAURICIO TÉLLEZ SOSA

2006





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de datos del Jurado

1. *Datos del alumno.*

Nombre: Villaseñor Toledo Tomás

Tel: 5862-1340

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

2. *Datos del tutor.*

Grado: Doctor en Ciencias Biomédicas

Nombre: Juan Mauricio Téllez Sosa

3. *Datos del sinodal 1.*

Grado: Doctor en Ciencias Biomédicas

Nombre: Ismael Hernández Lucas

4. *Datos del sinodal 2.*

Grado: Doctor en Ciencias Bioquímicas

Nombre: José Antonio Ibarra García

5. *Datos del sinodal 3.*

Grado: Maestra en Investigación Biomédica Básica

Nombre: Claudia Andrea Segal Kischinevzky

6. *Datos del sinodal 4.*

Grado: Maestra en Ciencias

Nombre: Beatriz Rodarte Murguía

7. *Datos del trabajo escrito.*

Título: **Estudio de la regulación transcripcional del gen *nleB2* de *Escherichia coli* Enterohemorrágica**

Numero de páginas: 75

Año: 2006

El presente trabajo se desarrollo en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Juan Mauricio Téllez Sosa.

El jurado de tesis estuvo integrado por:

Dr. Juan Mauricio Téllez Sosa

Dr. Ismael Hernández Lucas

Dr. José Antonio Ibarra García

M en IBB Claudia Andrea Segal Kischinevzky

M en C Beatriz Rodarte Murguía

Agradecimientos.

En primer lugar quiero agradecer a mis padres y hermanos por todo el apoyo que siempre me ha brindado, mil gracias, los quiero mucho.

Mi eterno agradecimiento a Juan por haberse arriesgado a ser mi tutor y por darme mis primeras lecciones de trabajo en el laboratorio, pero sobre todo muchas gracias por tu amistad.

Mil gracias al Dr. José Luis Puente por haberme dado la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, espero no haber fallado.

Gracias Carmen, por todo tu apoyo y amistad, por tus regaños, porque sé que esto también es importante para ti, pero sobre todo gracias por ser parte importante de mi vida.....te quiero mucho flaquita.

Gracias a todos los compañeros del laboratorio, salmonelos, epecos y los recientemente integrados rhizobios, porque de todos me llevo un bonito recuerdo.

Por supuesto que no podía dejar de agradecer a aquellas personas que me acompañaron por casi cinco años con sus alegrías, enojos, tristezas, sonrisas y llantos...mis amigos, Iriliana, Perla, Mónica, Gus (GC), Miguel (lucas) Alfredo (ardilla) y Aurelio (niño hongo), muchas gracias porque sé que si puedo llamarlos así: AMIGOS.

Este trabajo está dedicado con mucho amor a **mami** y **papi**...por darme la vida y por todo su apoyo, a **Aarón**...porque lo difícil no es caer, sino levantarse y tú lo hiciste con muchas ganas y fuerza, a **Ita**...porque en la decisión que tomes voy a estar contigo y muy en especial para **kiki**...porque la alegría que tienes hacia la vida nunca termine...te quiero mucho hermanita. A **Carmen**...porque eres lo mejor que me ha pasado. También a esas dos personas que siempre me apoyaron, como hubiese querido que estuvieran en este momento tan importante para mi, **Pablo** y **Carlos**...donde quiera que estén.

CONTENIDO

	Pag.
I. RESUMEN.....	1
II. INTRODUCCIÓN.....	2
1. Cepas patógenas de <i>Escherichia coli</i>	2
2. Familia de patógenos AE (Attaching and Effacing).....	3
3. Modelo de la generación de la lesión AE.....	4
4. Sistema de secreción tipo III (SSTT).....	5
5. Locus de destrucción del enterocito.....	7
6. Efectores codificados dentro de LEE.....	8
7. Efectores codificados fuera de LEE.....	10
8. Regulación transcripcional de la isla LEE.....	11
9. <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC).....	14
i. Patogenicidad de EHEC.....	15
ii. Factores de virulencia en EHEC.....	15
10. <i>Citrobacter rodentium</i>	16
i. Patogenicidad de <i>Citrobacter rodentium</i>	17
ii. Factores de virulencia en <i>Citrobacter rodentium</i>	17
III. ANTECEDENTES.....	19
IV. OBJETIVOS.....	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
VI. RESULTADOS.....	34
1. Generación de la fusión <i>nleB2</i>	34
2. Análisis de la región promotora de <i>nleB2</i>	35
2.1 Determinación del inicio de la transcripción e identificación del promotor 1 (P1) del gen <i>nleB2</i>	35
2.2 Análisis de los promotores identificados.....	37
2.3 Papel de la secuencia inversa repetida (SIR) en la transcripción de <i>nleB2</i>	40
2.4 Probables elementos de regulación negativa entre P1 y P2 de <i>nleB2</i>	41
2.5 Análisis de la región corriente arriba del SIR.....	41
3. El SIR es un elemento que se encuentra conservado en genes de diferentes bacterias patógenas.....	43
4. Papel de los reguladores Ler y GrlA en la regulación de <i>nleB2</i>	48
5. Expresión de la fusión <i>nleB2</i> en medio LB.....	50
6. Efecto de la sobreexpresión de Ler y GrlA en la transcripción de <i>nleB2</i>	52
7. Actividad de P2 en los fondos mutantes de <i>C. rodentium ler</i> y <i>grlA</i>	53
8. El efecto de Ler y GrlA sobre la expresión de <i>nleB2</i> es indirecto.....	54
VII DISCUSIÓN.....	56

VIII CONCLUSIONES.....	66
IX PERSPECTIVAS.....	66
X BIBLIOGRAFÍA.....	67

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Efectores y probables efectores secretados por el SSTT de <i>C. rodentium</i>	22
Tabla 2. Cepas y plásmidos empleados en este trabajo.....	24
Tabla 3. Antibióticos empleados en este trabajo.....	24
Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.....	27
Tabla 5. Reiteraciones del SIR en el genoma de <i>E. coli</i> O157:H7 EDL933.....	46
Tabla 6. Distribución del SIR en distintos genomas bacterianos.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía electrónica de las estructuras producidas por patógenos AE.....	4
Figura 2. Modelo de la generación de la lesión AE.....	4
Figura 3. Sistema de secreción tipo III (SSTT).....	6
Figura 4 Represión esquemática del SSTT en EPEC, EHEC y <i>C. rodentium</i>	7
Figura 5. Isla de patogenicidad LEE.....	8
Figura 6. Translocación de proteínas efectoras codificadas dentro y fuera de LEE hacia el citoplasma de la célula hospedante.....	11
Figura 7. Modelo de la regulación de los genes LEE.....	15
Figura 8. Efecto de la sobreexpresión de GrlA en <i>C. rodentium</i> silvestre y en las mutantes <i>sepL</i> y <i>rorf6</i>	21
Figura 9. Localización de las proteínas Nle's en el genoma de EHEC EDL933 O157:H7.....	22

Figura 10. Organización genética de la IP O-36 de EHEC.....	22
Figura 11. Mapa del vector pKK232-8.....	26
Figura 12. Representación esquemática de la fusión <i>nleB2</i>	35
Figura 13. Identificación del inicio de la transcripción del gen <i>nleB2</i>	36
Figura 14. Alineamiento de las regiones promotoras de <i>nleH1</i> y <i>nleB2</i>	37
Figura 15. Análisis de los promotores (P1 y P2) de <i>nleB2</i>	39-40
Figura 16 Análisis de la secuencia inversa repetida (SIR) de <i>nleB2</i>	43-43
Figura 17 Alineamiento de las diferentes regiones del genoma de EHEC que contienen la secuencia inversa repetida (SIR) corriente arriba de un marco de lectura.....	45
Figura 18. Papel de Ler y GrlA en la expresión de <i>nleB2</i>	49
Figura 19. Papel del medio LB en la expresión de <i>nleB2</i>	51
Figura 20. Efecto de Ler y GrlA sobre la expresión de <i>nleB2</i>	53
Figura 21. Efecto de Ler y GrlA sobre la expresión a partir de P2.....	54
Figura 22. Efecto de Ler y GrlA sobre la expresión de <i>nleB2</i> en <i>E. coli</i> MC4100.....	55

Lista de abreviaturas.

- ADN.** Ácido desoxirribonucleico.
- AE.** Attaching and Effacing.
- ARN.** Ácido ribonucleico.
- CAT.** Cloranfenicol acetil transferasa.
- CH.** Colitis Hemorrágica.
- Cr.** *Citrobacter rodentium*.
- DMEM.** Dulbecco's Modified Eagle's Medium.
- EHEC.** *Escherichia coli* enterohemorrágica.
- EPEC.** *Escherichia coli* enteropatógena.
- GrlA.** Global regulator of Lee activator.
- IP.** Isla de Patogenicidad.
- LB.** Luria-Bertani.

LEE. Locus of Enterocyte Effacement.

Ler. Lee- encoded regulator.

Nle's. Non-Lee encoded effectors.

NleB2. Non-Lee-encoded effector B2

NleH1. Non-Lee-encoded effector H1

PCR. Polymerase Chain Reaction.

PE. Primer extension.

SIR. Secuencia inversa repetida.

SSTT. Sistema de Secreción Tipo III.

Stx. Toxina Shiga.

SUH. Síndrome Urémico Hemolítico.

Vtx. Verotoxina.

I RESUMEN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y *Citrobacter rodentium* son miembros de la familia de patógenos AE (Attaching and Effacing). La información genética necesaria para la patología AE está codificada en una isla de patogenicidad (IP) conocida como LEE (por sus siglas en inglés para Locus of Enterocyte Effacement). El LEE codifica: un sistema de secreción tipo III (SSTT), reguladores transcripcionales de genes de la misma isla (Ler, GrlA y GrlR), proteínas translocadoras y efectoras. Recientemente se reportó que *C. rodentium* posee al menos siete nuevos efectores codificados fuera del LEE (NleA, B, C, D, E, F, y G). También se confirmó que estos nuevos efectores son secretados por el SSTT. Aún se desconoce la función de estos efectores, sin embargo, sabemos que las mutantes *nleA* y *nleB* de *C. rodentium* están atenuadas en el modelo de infección murino. Homólogos de estos nuevos efectores están codificados en distintas IP en el genoma de EHEC. En algunos casos existen más de un gen codificante, por ejemplo, EHEC posee dos homólogos de NleB codificados en las islas O-36 y O-122. En este trabajo presentamos el estudio de la expresión del gen *nleB2*, localizado en la IP O-36 de EHEC, realizado mediante el empleo de fusiones transcripcionales de la región promotora de *nleB2* al gen reportero *cat*. Mediante experimentos de mapeo de transcritos, de mutaciones puntuales y de recortes de la región promotora encontramos que la transcripción de *nleB2* depende de dos promotores (P1 y P2, siendo P1 más activo que P2) localizados a 52 y 105 pb del ATG, respectivamente. El análisis de la región promotora de *nleB2* nos permitió identificar una secuencia inversa repetida (SIR) de ~30 pb localizada corriente arriba de ambos promotores. La generación de mutaciones puntuales que alteran la secuencia del SIR nos confirmaron que este elemento es indispensable para la transcripción de *nleB2*. El análisis del genoma de EHEC nos muestra que el SIR se encuentra representado en 15 regiones del cromosoma, generalmente asociado a genes relacionados con virulencia codificados en distintas IP. Secuencias idénticas al SIR también están presentes en los genomas de EPEC, *C. rodentium*, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*. Por otro lado, las fusiones generadas fueron evaluadas en diferentes fondos genéticos y en condiciones de crecimiento óptimas para la expresión de genes de virulencia codificados en el LEE. Estos experimentos nos indicaban que a diferencia de los genes del LEE, *nleB2* se expresa en DMEM pero también en LB y que su expresión no depende de los reguladores Ler y GrlA. Sin embargo, experimentos posteriores nos indicaron que la expresión multicopia de Ler o GrlA en *C. rodentium*, provoca una sobreexpresión de *nleB2*, a través de un incremento específico de la actividad transcripcional de P2. Creemos que la existencia de dos promotores ocultó en el efecto de las cepas mutantes *ler* y *grlA* de *C. rodentium* sobre la expresión de *nleB2*. Finalmente, la sobreexpresión de *nleB2* por la presencia multicopia de Ler o GrlA no se reproduce en la cepa no patógena de *E. coli*, MC4100. En conjunto estos datos nos sugieren que Ler y GrlA coordinan la expresión de *nleB2*, a través de un mecanismo indirecto y posiblemente mediado por factores exclusivos de fondos patógenos, con la expresión de los genes del LEE.

II INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es el microorganismo más estudiado. Esta bacteria ha sido utilizada como modelo para el análisis del metabolismo bacteriano, procesos de división celular, biosíntesis de pared celular, quimiotaxis, genética bacteriana y el papel fisiológico de las bacterias entéricas como parte de la microbiota normal (Deidhart, 1996). El análisis de la secuencia del genoma de la cepa K-12 muestra que aproximadamente el 2% de su DNA consiste de elementos genéticos móviles, que incluyen fagos, plásmidos y transposones (Blattner *et al.*, 1997). Al respecto, las cepas patógenas de *E. coli* parecen haber evolucionado de cepas no patógenas que adquirieron nuevos factores de virulencia por transferencia horizontal de DNA, el cual a menudo se encuentra agrupado formando islas de patogenicidad (IP) ya sea en plásmidos o en el cromosoma (Hacker *et al.*, 1997). La gran diversidad genética en el genoma de *E. coli*, esta reflejada también en la alta variación en el contenido de DNA entre diferentes cepas y por los sitios de inserción de los diferentes factores de virulencia (Rode *et al.*, 1999; Bergthorson y Ochman., 1995 y 1998).

Las variantes patógenas de *E. coli* están representadas por cepas de serogrupos específicos que poseen un grupo particular de factores de virulencia, los cuales son responsables de las diferentes manifestaciones clínicas que caracterizan a las infecciones por *E. coli*. A continuación se describen las cepas patógenas de *E. coli* que provocan diarrea en humanos.

II.1 Cepas patógenas de *E. coli*

***E. coli* enterotoxigénica (ETEC):** Agente causante de la enfermedad conocida como “diarrea del viajero”, la cual es de tipo acuosa y se adquiere al ingerir agua y alimentos contaminados. Este patógeno produce 2 tipos de enterotoxinas: termoestable y termolábil y coloniza la superficie mucosa del intestino delgado por medio de fimbrias de colonización (CFAs por sus siglas en ingles) (Black, 1990).

***E. coli* enteroinvasiva (EIEC):** Agente causal de diarrea acuosa. Los pacientes que adquieren esta cepa pueden desarrollar una enfermedad semejante a la disentería, ya que los síntomas son idénticos a los producidos por *Shigella spp.* EIEC invade el epitelio del colon y produce enterotóxicas (Menard *et al.*, 1993).

***E. coli* enteropatógena (EPEC):** Es uno de los principales agentes bacterianos que provocan diarrea a niños menores de 2 años en países subdesarrollados. Produce la lesión característica conocida como AE (“Attaching and Effacing”), descrita con detalle

mas adelante. La mayoría de las cepas de EPEC poseen el factor de adherencia de EPEC (EAF, por sus siglas en inglés) codificado en un plásmido de alto peso molecular que está involucrado en un fenotipo característico llamado adherencia localizada, y tiene un papel muy importante en la virulencia de estas cepas (Nataro y Kaper, 1998; Baldwin, 1991).

***E. coli* enterohemorrágica (EHEC):** Este patógeno provoca epidemias esporádicas en países desarrollados. EHEC causa la colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico hemolítico (SUH), a causa de la producción de una potente citotóxina tipo Shiga (Stx). Al igual que EPEC, EHEC produce la lesión conocida como AE y algunas cepas contienen un plásmido de alto peso molecular (pO157), que codifica para factores de virulencia (Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

***E. coli* enteroagregativa (EAEC):** A esta cepa se le asocia con diarrea pediátrica del tipo acuoso y en algunas ocasiones diarrea mucoide. La infección presenta un patrón de adherencia agregativa sobre las células intestinales. Esta cepa produce las enterotoxinas EAST1, Pet y una hemolisina (Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

***E. coli* adherente difusa (DAEC):** Esta cepa produce diarrea acuosa persistente en niños entre 2 y 5 años. La adherencia ocurre de manera difusa en las células epiteliales, lo que produce un daño directo sobre las microvellosidades después de su adherencia. Aparentemente, esta cepa no se le asocia la producción de alguna toxina (Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004).

II.2 Familia de patógenos AE (Attaching and Effacing)

EPEC y EHEC producen las lesiones AE formadas en la superficie mucosa del intestino del hospedero. Dichas lesiones se caracterizan por la adherencia íntima de la bacteria a las células epiteliales, la pérdida de microvellosidades absorbentes y una reorganización del citoesqueleto de actina. Los cambios tan marcados que ocurren en el citoesqueleto, incluyendo la acumulación de actina polimerizada, se observan por debajo de la bacteria adherida formando estructuras tipo copa o pedestal (Figura 1). Las estructuras tipo pedestal puede extenderse aproximadamente 10 μ m hacia la parte superior de la célula eucarionte (Moon *et al.*, 1983).

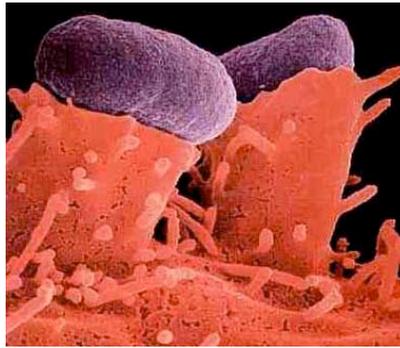


Figura 1. Micrografía electrónica que muestra las estructuras de pedestal producidas por los patógenos AE en las células del epitelio intestinal del hospedero (Tomado de Rosenshine *et al.*, 1996).

Las bacterias miembros de esta familia de patógenos son capaces de formar lesiones AE *in vivo* sobre la mucosa intestinal y sobre ciertos tejidos y cultivos celulares *in vitro*. Las bacterias pueden ser vistas sobre la superficie mucosa y pueden a menudo ser identificadas específicamente por inmunotinción (Kaper, 1998). La mayoría de bacterias AE reportadas son cepas de *E. coli*, sin embargo, la bacteria *C. rodentium*, también es capaz de producir lesiones AE en el epitelio intestinal de ratones (Luperchio *et al.*, 2000).

II.3 Modelo de la generación de la lesión AE

El modelo de la generación de lesiones AE se ha dividido en tres etapas y está basado en las observaciones hechas durante la infección por EPEC (Figura 2).

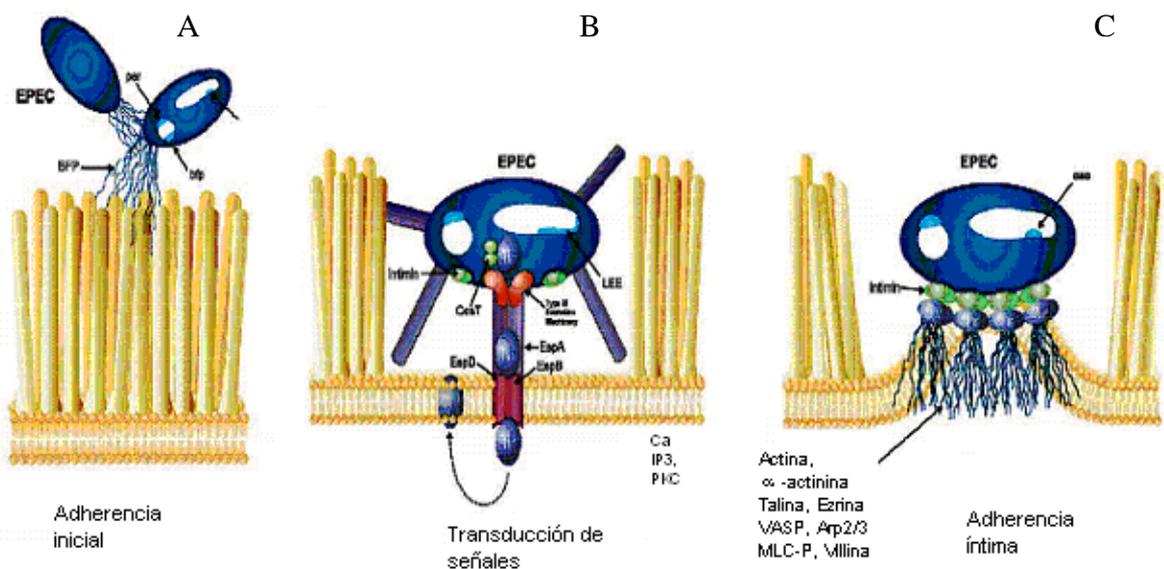


Figura 2. Modelo de la generación de la lesión AE. El modelo de la generación de lesiones AE está basado en EPEC, la cual se da en tres etapas: Adherencia localizada, Transducción de señales y Adherencia íntima (Figura tomada y modificada de Strynadka y Ness, 2002).

A) *Adherencia localizada*. La primera etapa involucra la adherencia inicial de la bacteria al epitelio intestinal del hospedero. En esta etapa, EPEC forma microcolonias densas que se adhieren a las células epiteliales en un patrón denominado adherencia localizada (LA, por sus siglas en inglés) (Figura 2) (Vallance y Finlay, 2000). En un trabajo realizado por Baldini y colaboradores en 1983, demostraron que la habilidad de EPEC de adherirse con este patrón depende de la presencia del plásmido EAF. La identidad del factor que media la LA fue reportada por Girón y colaboradores en 1991, quienes describieron una fimbria de 7 nm de diámetro que tiende a agregarse y formar haces, por lo que le dieron el nombre de BFP (“Bundle-Forming Pilus”).

B) *Transducción de señales*. Después del primer contacto con la célula hospedera, las bacterias se unen a la superficie de la célula y le inyecta directamente factores de virulencia a través del SSTT. Diferentes moléculas efectoras pasan a través del sistema de secreción tipo III (SSTT), descrito con detalle más adelante, hacia el citoplasma de la célula hospedera que activan vías de señalización celulares causando alteraciones en la arquitectura del citoesqueleto, lo que resulta en la pérdida de las microvellosidades y en la despolimerización de actina (Figura 2) (Campellone y Leong, 2003). Entre la variedad de vías que activan los patógenos AE, ocurre un aumento en los niveles de calcio intracelular en cultivos de células epiteliales (Baldwin *et al.*, 1991; Dytoc *et al.*, 1994; Philpott *et al.*, 1996).

C) *Adherencia íntima*. Una vez que la proteína Tir (descrita con detalle más adelante) ha sido translocada, en EPEC, dicha proteína es modificada por fosforilación de un residuo de tirosina, (Tyr474), localizada en la región C-terminal citoplasmática (Figura 2) (Campellone y Leong, 2003). EPEC y EHEC translocan Tir y aunque ambas convergen sobre la proteína neuronal del síndrome Wiskott-Aldrich (N-WASP), el proceso de reclutamiento de actina mediado por Tir en EPEC y EHEC de células en cultivo difiere, ya que EHEC carece de una tirosina equivalente y utiliza al efector TccP/EspFu (descrito posteriormente en este trabajo). Después de la translocación, TccP/EspFu juega un papel esencial en el reclutamiento de actina por debajo del sitio en donde EHEC se ha adherido, desplegando una actividad de acoplamiento. TccP/EspFu se asocia indirectamente con Tir, se une a N-WASP, y estimula la polimerización de actina de una manera independiente de Nck (Campellone *et al.*, 2004; Garmendia *et al.*, 2004).

II.4 Sistema de secreción tipo III

Una vez que se ha dado el primer contacto de la bacteria con la célula hospedera, la bacteria realiza un contacto más estrecho con la célula a través de un sistema de secreción tipo III (SSTT) (Figura 3). Dichos sistemas son codificados en islas de patogenicidad de bacterias que infectan plantas y animales, permitiéndole translocar proteínas efectoras al citosol de la célula hospedante. En el caso de EHEC, EPEC y *C. rodentium* el SSTT se encuentra codificado en la IP LEE (descrita mas adelante).

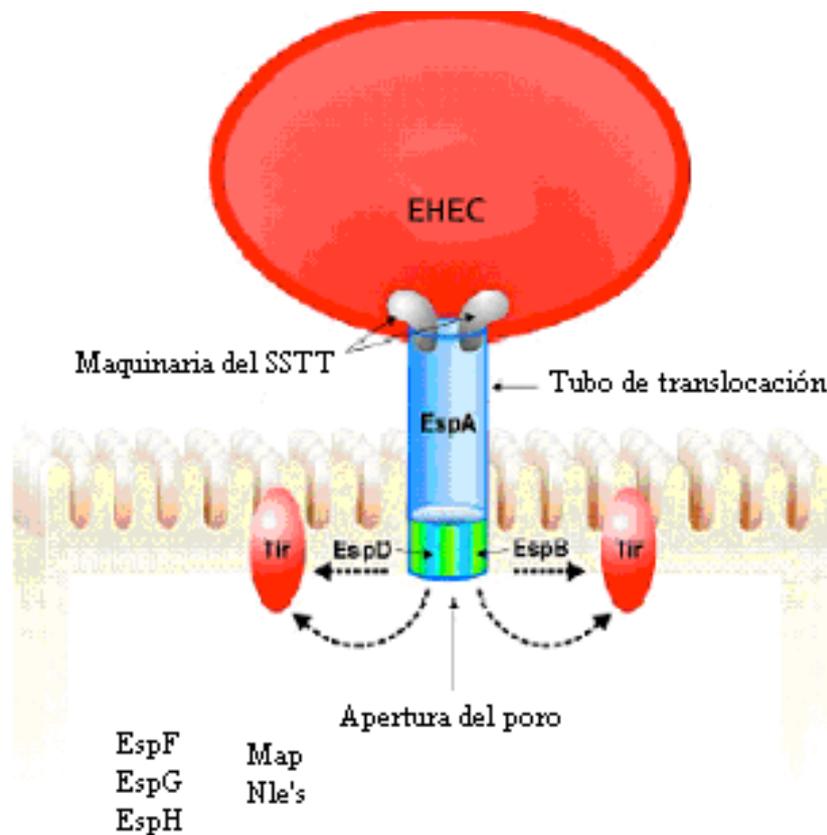


Figura 3. Sistema de Secreción Tipo III (SSTT). EspA forma un filamento hueco en la superficie bacteriana, por su parte, EspB y EspD forman un poro que se inserta en la membrana de la célula huésped. La estructura permite el paso de diferentes moléculas efectoras, tales como Tir, EspB, EspD, EspF, EspG, EspH y Map, lo que conduce a diferentes cambios en las vías de señalización de la célula huésped, tal es el caso del reordenamiento de proteínas del citoesqueleto. Tomado y modificado de Vallance y Finlay, 2000.

El SSTT está compuesto por 20 proteínas, el mayor número de estas se localizan en la membrana interna y presentan homología con el aparato de biosíntesis flagelar en bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Este sistema es independiente de otras vías de secreción (Figura 4).

En EHEC, EPEC, y en *C. rodentium*, los componentes principales del translocón son las proteínas EspA, EspB y EspD. EspA es la subunidad mayor de un filamento que se forma en la superficie bacteriana, por su parte, EspB y EspD forman un poro en la membrana celular del hospedante. En su conjunto, estas proteínas conforman una jeringa molecular a través de la cual son liberadas diversas moléculas efectoras (Figura 4).

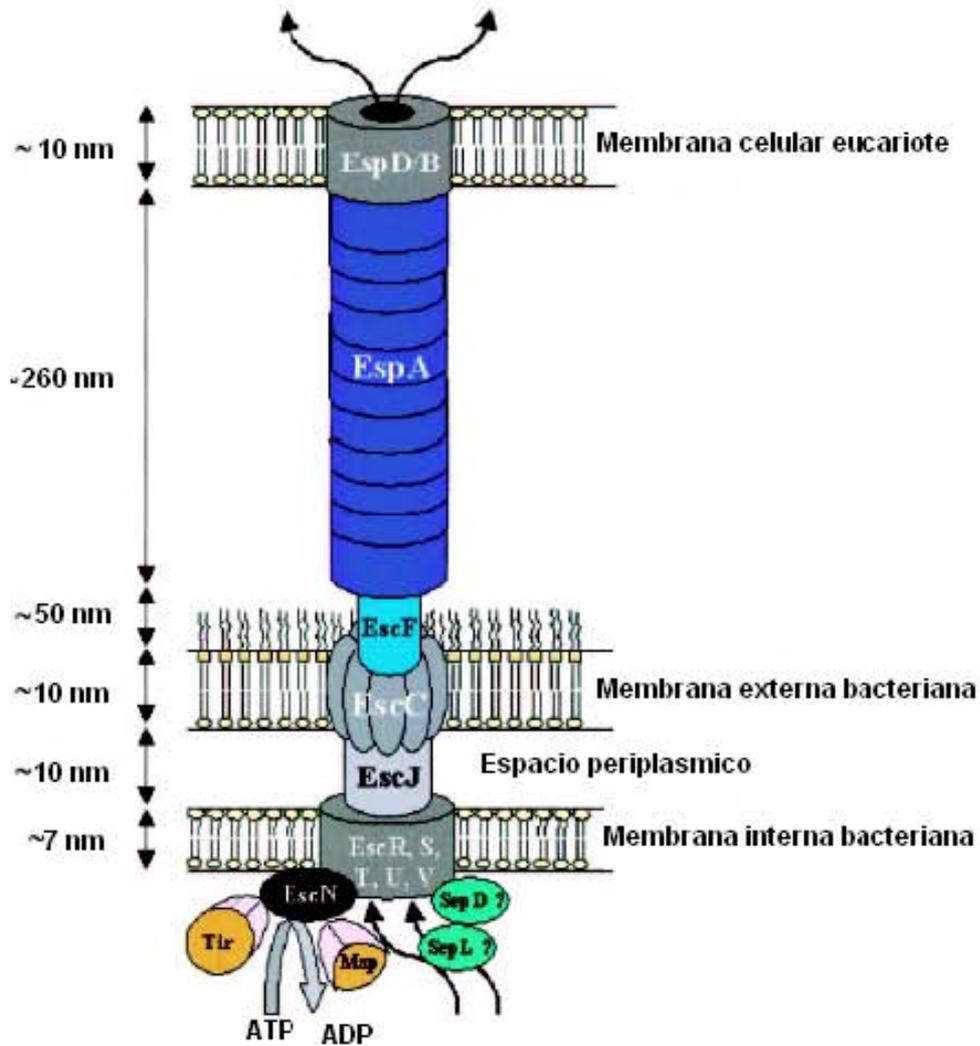


Figura 4. Representación esquemática del sistema de secreción tipo III presente en EPEC, EHEC y *C. rodentium*. El cuerpo basal del SSTT está compuesto por la secretina EspC, las proteínas de membrana interna EspR, EspS, EspT, EspU y EspV, y la lipoproteína EspJ, la cual conecta a las estructuras de anillo de la membrana interna y externa. EspF constituye la estructura de jeringa, mientras que las subunidades de EspA polimerizan para formar un filamento. EspB y EspD forman un poro de translocación en la membrana de la célula hospedadora. La ATPasa EspN proporciona la energía al sistema al hidrolizar moléculas de ATP. (Tomado y modificado de Garmendia *et al.*, 2005).

II.5 Locus de destrucción del enterocito (LEE)

Los genes necesarios para la generación de la lesión AE están codificados en el cromosoma de las distintas bacterias dentro de una IP llamada LEE. Esta isla contiene 41 genes y se ha dividido en tres regiones funcionales y en al menos cinco operones principales (Figura 5). Los operones *LEE1*, *LEE2* y *LEE3* codifican para los componentes del SSTT (mencionados anteriormente) (Figura 4), el operón *LEE5* contiene a los genes que codifican para Tir, CesT (la chaperona de Tir), y la intimina, las cuales son importantes para la adherencia íntima de la bacteria con la célula huésped. El operón *LEE4* codifica algunas proteínas secretadas a través del SSTT (Esp), incluyendo a EspA, EspB y EspD, las cuales forman el translocón de secreción (Figura 4).

En un estudio realizado por Deng y colaboradores en el 2001 se demuestra que existe gran similitud entre las islas LEE de EPEC, EHEC y *C. rodentium*. Las tres islas comparten los 41 genes, pero difieren en cuanto a la localización de los genes *rorf1* y *rorf2/espG*. El LEE de *C. rodentium* contiene numerosas secuencias de inserción (IS) y remanentes de dichas secuencias. El LEE esta flanqueado en uno de sus lados por un operón que codifica un sistema de transporte del tipo ABC y un elemento de inserción, así como secuencias homologas al plásmido R100 de *Shigella spp* (Deng *et al.*, 2001).

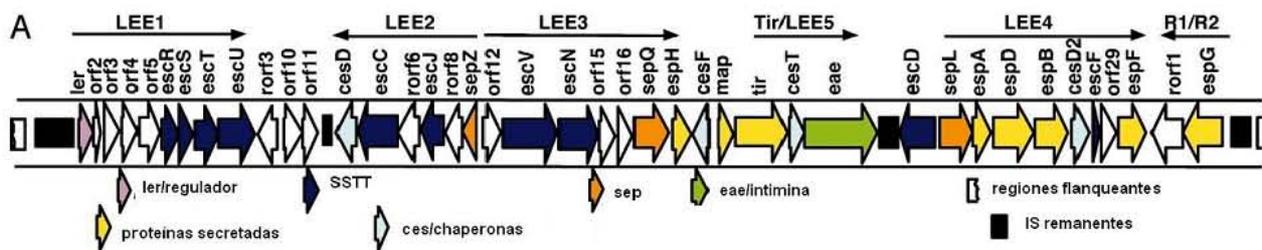


Figura 5. Isla de patogenicidad LEE. El Locus de destrucción del enterocito está compuesto de tres grandes regiones funcionales organizadas en cinco operones principales. *LEE1*, *LEE2* y *LEE3* contienen los genes que codifican para el SSTT; *LEE5* codifica a Tir, su chaperona CesT, e intimina, necesarias para la adherencia íntima; y *LEE4* codifica la mayoría de las proteínas secretadas (Tomado y modificado de Deng *et al.*, 2004).

Como se menciono antes, en el operón *LEE4* se encuentran codificadas las proteínas que son secretadas a través del SSTT, incluyendo algunas proteínas que se les

ha atribuido el papel de efector dentro de la célula eucarionte. A continuación se mencionan las proteínas efectoras y sus funciones en virulencia.

II.6 Efectores codificados dentro de LEE

Tir, el efector más estudiado; la interacción de Tir con la intimina, proteína de membrana externa bacteriana no solo se requiere para la adherencia íntima, sino también dispara en la célula eucarionte los eventos de señalización que llevan a la acumulación de proteínas del citoesqueleto por debajo de la bacteria adherente (Kenny, 2002). Así también, la interacción Tir-intimina, dispara la fosforilación de la fosfolipasa, PLC $\beta 1$, facilitando la invasión dependiente de Cdc-42 de las células no fagocíticas.

Map, presenta tres distintas e independientes funciones: A) Interviene con la capacidad de la célula para mantener el potencial de membrana mitocondrial (Kenny, 2002; Kenny y Jepson, 2000); B) Durante los estados iniciales de la infección por EPEC/EHEC, Map es responsable para la formación de estructuras tipo filopodios en los sitios de la infección bacteriana, un proceso dependiente de Cdc42 (Kenny, 2000); y C) Map es esencial para la interrupción de la barrera intestinal y la alteración de las uniones estrechas (Dean y Kenny, 2004) (Figura 6).

EspF, es una proteína rica en prolina; contiene tres repeticiones de sitios ricos de prolina en EPEC (McNamara y Donenberg, 1998), cuatro en EHEC (Viswanathan *et al.*, 2004) y cinco en *C. rodentium* (Deng *et al.*, 2004). Se ha descrito que EspF participa en el rompimiento de la función de la barrera intestinal (McNamara *et al.*, 2001). En estudios recientes se ha demostrado que EspF se dirige a la mitocondria a través de su región N-terminal y está involucrado en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (Nagai *et al.*, 2005). Además, EspF induce la liberación de la proteína citocromo C hacia el citosol, así como la proteólisis de las caspasas 9 y 3. Ambas funciones sugieren que EspF tiene un papel en el inicio de la muerte celular por la vía mitocondrial (Nagai *et al.*, 2005; Nougayrede y Donnenberg, 2004) (Figura 6).

EspG, induce la formación de fibras de estrés y la destrucción de la red de microtubulos por debajo de la bacteria adherente en fibroblastos (Matsuzawa *et al.*, 2004). EspG interactúa con las tubulinas y estimula la desestabilización de los

microtubulos *in vitro* (Matsuzawa *et al.*, 2004) y colocaliza con la tubulina durante la infección de células polarizadas Caco-2 (Matsuzawa *et al.*, 2004). EspG presenta 21% de identidad a nivel de aminoácidos con el efector VirA de *Shigella flexneri* el cual se ha demostrado que dispara la desestabilización de microtubulos culminando en una eficiente internalización bacteriana (Yoshida *et al.*, 2002) (Figura 6).

EspH, esta proteína se localiza en la membrana celular del hospedero y modula la estructura del citoesqueleto de actina afectando la formación de filopodios y pedestales (Tu *et al.*, 2003) (Figura 6).

EspZ, recientemente reportado como un efector; sin embargo, a su translocación no ha sido atribuido un fenotipo o función específica (Kanack *et al.*, 2005) (Figura 6).

EspB, además de su papel en la translocación (Wolff *et al.*, 1998), se ha reportado que EspB podría tener actividades de efector (Taylor *et al.*, 1998) ya que se localiza en la región de la unión bacteriana (Taylor *et al.*, 1998), y las células transfectadas con EspB presentan una morfología alterada con un reducido número de fibras de estrés. En EHEC, EspB se une a una molécula asociada al citoesqueleto, α -catenina, lo que coincide con un posible papel en la modulación del citoesqueleto del hospedero (Kodama, 2002) (Figura 6).

II.7 Efectores codificados fuera de LEE

Cif, fue la primera proteína efectora codificada fuera de LEE en ser identificada. *cif* codifica una molécula que actúa como una ciclomodulina. Esta proteína induce un efecto citopático, que se caracteriza por el ensamblaje de las fibras de estrés y la inhibición del ciclo celular en la fase de transición G2/M, lo que lleva a una acumulación de Cdk1 en estado fosforilado (Marches *et al.*, 2003) (Figura 6).

EspI, llamado también NleA (non-LEE-encoded effector A), se encuentra en el profago CP-933P del genoma de EHEC. EspI/NleA no se requiere para la formación de la lesión AE (Gruenheid *et al.*, 2004; Mundy *et al.*, 2004), esta proteína al ser translocada se dirige hacia el aparato de Golgi (Gruenheid *et al.*, 2004). Además, ha sido reportado que EspI/NleA tienen un papel en la virulencia en el modelo murino de *C. rodentium* (Gruenheid *et al.*, 2004; Mundy *et al.*, 2004) (Figura 6).

Tccp, esta proteína presenta 24% de identidad a nivel de aminoácidos con EspF (Garmendia *et al.*, 2004; Campellone *et al.*, 2004). Es una proteína efectora rica en prolinas que se encuentra en el fago criptico CP-933U del genoma de EHEC y que es translocada a través del SSTT. TccP juega un papel esencial en el reclutamiento de actina en el sitio donde EHEC se ha adherido pues este efector se asocia con Tir, se une a N-WASP, y da lugar a la polimerización de actina de una manera independiente de la presencia de Nck (Campellone *et al.*, 2004; Garmendia *et al.*, 2004). Experimentos recientes han demostrado que cuando TccP se expresa en EPEC, esta molécula restaura la polimerización de actina en una línea celular deficiente en Nck (Campellone *et al.*, 2004; Garmendia *et al.*, 2004).

EspJ, se localiza en el fago criptico CP-933U en el genoma de EHEC, corriente arriba del gene *TccP*. *espJ* codifica a un efector que es translocado y que no se requiere para la formación de la lesión AE (Dahan *et al.*, 2005) (Figura 6).

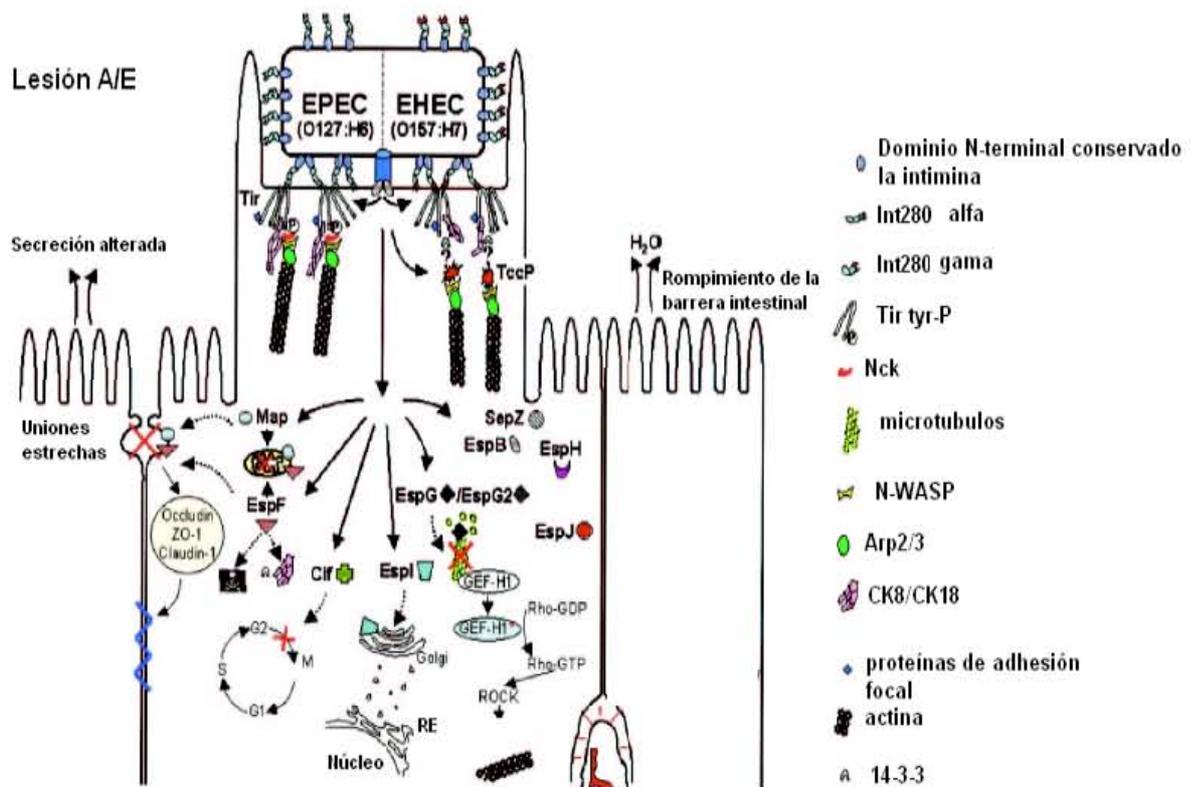


Figura 6. Translocación de proteínas efectoras codificadas dentro y fuera de LEE hacia el citoplasma de la célula hospedera. (Tomado y modificado de Garmendia *et al.*, 2005)

II.8 Regulación transcripcional de la isla LEE

La regulación de la expresión del LEE se ha enfocado principalmente en el operón *LEE1* y se ha demostrado que éste codifica a un regulador nombrado Ler (LEE-encoded regulator). Ler incrementa los niveles de expresión de otros operones del LEE desplazando a la represión ejercida por la proteína H-NS (Bustamante *et al.*, 2001; Sánchez-SanMartín *et al.*, 2001; Umanski *et al.*, 2002). La expresión de *LEE1* está controlada también por “Quorum Sensing” (QS) o detección por consenso y por señales de las células a las que se adhiere la bacteria, sin embargo, dado que la dosis de infección de EHEC (10-100 bacterias) es muy baja para hacer uso de QS, se ha propuesto un modelo en el que EHEC detecta las señales que son producidas por cepas de *E. coli* comensales y de otras bacterias presentes en el intestino grueso (Bassler, 2002). En respuesta a esta señal, la expresión de los factores de virulencia, incluyendo al LEE y Stx (Shiga toxin), se induce iniciando el proceso patogénico. Este mecanismo puede también ser activado por las hormonas del hospedante, tales como la adrenalina y la noradrenalina, en un ejemplo de “cross-talk” o comunicación cruzada entre organismos eucariontes y procariontes (Bassler, 2002).

A continuación se describen las señales y proteínas involucradas en la regulación de LEE.

Señales ambientales. A menudo los factores de virulencia están estrechamente regulados por señales ambientales, que incluyen temperatura, concentración de iones, osmolaridad, pH, disponibilidad de fuentes de carbono y niveles de oxígeno (Finlay y Falcow, 1997; Pérez, 2001) El crecimiento en medio de cultivo DME, a 37°C, provee las condiciones óptimas para la expresión de los genes de virulencia del LEE (Ebel *et al.*, 1996; Kenny *et al.*, 1997; Kenny y Finlay, 1995; Rosenshine *et al.*, 1996). El crecimiento en medio rico, como el LB, así como temperaturas por abajo o por arriba de 37°C, regulan negativamente la expresión de dichos genes (Bustamante *et al.*, 2001; Pérez, 2001; Sánchez-SanMartín *et al.*, 2001). En EPEC, el amonio juega un papel represor, no así en EHEC; más aún, la activación del promotor del operón *LEE4* es independiente de amonio, pero es inducida por alta osmolaridad y crecimiento a 37°C (Beltrametti *et al.*, 1999).

QseA (Quorum-sensing *E. coli* regulator A). Regulador positivo de *ler*, es una proteína que está involucrada en la regulación por QS (Sircili *et al.*, 2004).

Ler (*LEE-encoded regulator*). Es una proteína relacionada a miembros de la familia H-NS/StpA de unión a ADN (Atlung e Ingmer, 1997; Dorman, 2004). Ler es capaz de regular la expresión de genes de virulencia codificados dentro y fuera del LEE (Elliot *et al.*, 2000; Mellies *et al.*, 1999), es necesaria para la formación de las lesiones AE, la secreción y la translocación. El modelo actual de regulación propone que Ler actúa desestabilizando el complejo represor formado por H-NS sobre las regiones reguladoras del *LEE2* al *LEE5*, compitiendo por los sitios de unión al ADN (Bustamante *et al.*, 2001; Sánchez-SanMartín *et al.*, 2001; Umanski *et al.*, 2002). (Figura 7).

IHF (*Integration Host Factor*). Es una proteína tipo histona heterodimérica de 21.8 kDa (Freundlich *et al.*, 2000; McLeod y Jonson, 2001; Rice, 1997). IHF se une al ADN en sitios consenso altamente específicos de aproximadamente 35 pb, con lo cual induce curvaturas y permite, en la mayoría de los casos, la transcripción de genes involucrados en diversos procesos. Se ha observado que mutantes en una de las subunidades de IHF, *ihfA*, disminuyen drásticamente la producción de las proteínas Tir, intimina, EspB y EspF y no reorganizan actina en experimentos realizados *in vitro* (Friedberg *et al.*, 1999). IHF es esencial para la formación de las lesiones AE, regulando positivamente la expresión del operón LEE1 al unirse corriente arriba de la secuencia promotora (Barba *et al.*, 2005) (Figura 7), entre las posiciones -83 y -53 (Yona-Nadler *et al.*, 2003).

BipA. Es una proteína miembro de la familia de GTPasas de unión a ribosoma, se ha observado que BipA regula positivamente a *ler* (Grant *et al.*, 2003).

Fis (Factor for inversion stimulation). Regula positivamente la expresión de *ler*, y es una proteína que está asociada al nucleoide (Goldberg *et al.*, 2001).

Hha. Al igual que H-NS, se une directamente a la región reguladora de *ler* y tiene un papel en la regulación negativa (Sharma y Zuerner, 2004; Umanski *et al.*, 2002).

H-NS (*Histone-like nucleoid-structuring protein*). Es una proteína de 15.6 kDa, miembro de la familia de proteínas tipo histona que se une al ADN generalmente hacia

secuencias curvadas y ricas en AT (Atlung e Ingmer, 1997; Dorman, 2004). H-NS regula de manera negativa la expresión de genes involucrados en la virulencia, en respuesta a señales ambientales como la temperatura (Atlung e Ingmer, 1997; Dorman, 2004). H-NS causa el silenciamiento de los promotores *LEE2* y *LEE3* por unión preferencial a las regiones SRS1 y SRS2 en ausencia de Ler, evitando que la ARN polimerasa reconozca el promotor (Figura 7) (Bustamante *et al.*, 2001; Sperandio *et al.*, 2000; Umanski *et al.*, 2002). H-NS, regula al *LEE4*, *LEE5* y *espG* (Figura 7) (Haack *et al.*, 2003; Sánchez-SanMartín *et al.*, 2001; Bustamante *et al.*, 2001)

GrlA y GrIR (Global regulator of LEE activator y Global regulator of LEE repressor). Recientemente, se encontraron dos marcos abiertos de lectura, correspondientes a *orf10* y *orf11*, entre los operones *LEE1* y *LEE2* actualmente son conocidos como *grlR* y *grlA*, respectivamente (Deng *et al.*, 2004). Estos genes codifican para dos nuevos reguladores de la expresión de *ler* y de otros genes del LEE. GrIR actúa como un regulador negativo, ya que la sobreexpresión de este gen disminuye la expresión de *ler*. GrlA, por su parte, se ha propuesto como un activador dado que una mutante en *grlA* abate la expresión de *ler*. GrlA actúa corriente arriba de Ler en la cascada de regulación, ya que una doble mutante en *ler* y *grlA*, al ser complementada con *ler*, recupera el fenotipo silvestre; pero la misma mutante complementada con *grlA* no lo hace (Figura 7) (Deng *et al.*, 2004).

PerC. Es un regulador específico de EPEC, es el producto del tercer gen del locus *per* localizado en el plásmido EAF, activa directamente la expresión de *ler* (Bustamante *et al.*, 2001; Mellies *et al.*, 1999; Porter *et al.*, 2005; Porter *et al.*, 2004). Proteínas tipo PerC se han identificado también en EHEC y están involucradas en la expresión de *ler* (Iyoda y Watanabe, 2004).

GadX. Regula la expresión del operón *perABC*, regulado entonces de manera indirecta la expresión de *ler* (Shin *et al.*, 2001).

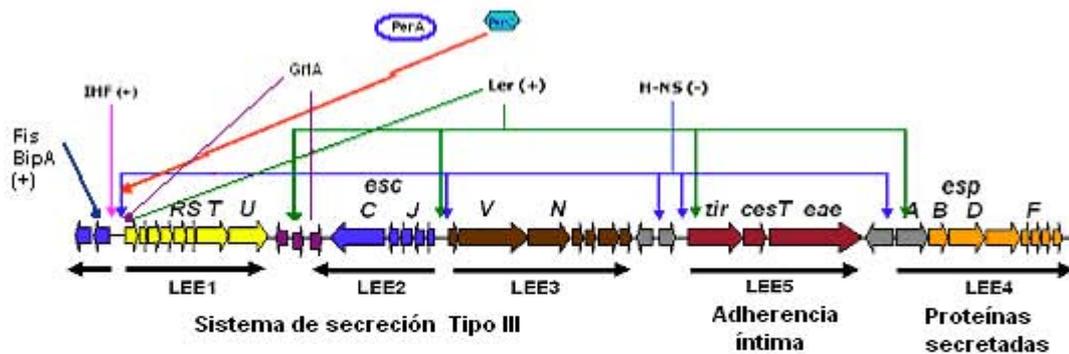


Figura 7. Modelo de regulación de los genes LEE. Ler es el regulador positivo del LEE, éste quita el efecto represor ejercido por el regulador H-NS y activa la transcripción de los operones LEE2 y LEE3, compitiendo por los sitios de unión a DNA, activando también a los operones LEE4 y LEE5. Ler a su vez es regulado positivamente por IHF (Modificado de Bustamante *et al.*, 2001).

Para la realización de este trabajo se utilizaron dos de los modelos experimentales que se estudian en nuestro laboratorio, EHEC y *C. rodentium*. A continuación se describen de manera detallada las características, la patogenicidad y los factores de virulencia asociados a estos microorganismos.

II.9 *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICA

EHEC forma parte de un subgrupo de *E. coli* también llamado STEC (“Shiga-Toxin producing *E. coli*”), reconocida como causa de enfermedades humanas en 1982 (Paton y Paton, 1998). EHEC provoca diarrea con sangre (colitis hemorrágica), diarrea sin sangre y síndrome urémico hemolítico (SUH) (Mead, 1998; Nataro y Kaper, 2004; Paton y Paton, 1998). El reservorio principal de EHEC es el tracto intestinal de bovinos. Los brotes iniciales de la infección fueron asociados a carne de hamburguesas mal cocinada (enfermedad de las hamburguesas). La infección por EHEC es producida a través de alimentos contaminados o mal cocinados, en particular los de origen bovino, su dosis infectiva es de 10-100 organismos, con un alto grado de incidencia en países desarrollados como Estados Unidos, Reino Unido y Japón. Las infecciones son esporádicas, afectando principalmente a niños y adultos mayores quienes son los más susceptibles a la infección y a desarrollar el SUH (Kaper, 1996).

II.9.i Patogenicidad de EHEC

Después de la ingestión de alimentos o agua contaminada con EHEC, hay un periodo de incubación de 3 a 4 días. El inicio de la enfermedad se manifiesta con una diarrea acuosa sin sangre, dolor abdominal y fiebre. Conforme la enfermedad avanza, el

dolor abdominal incrementa y la diarrea con sangre comienza. En el 10-20% de los casos pediátricos y geriátricos, la infección por EHEC puede llevar al desarrollo de serias complicaciones tales como el síndrome urémico hemolítico (SUH) y posteriormente falla renal (Paton y Paton, 1998). Hasta el momento, se han identificado probables factores de adhesión en EHEC codificados en la isla de patogenicidad *LEE* o incluso fuera de ella. Un ejemplo claro está dado por un plásmido de alto peso molecular llamado pO157, al cual se le ha relacionado con la expresión de fimbrias y con adherencia. En un trabajo publicado en el año 2002 (Torres *et al.*, 2002) se caracterizó en el cromosoma de EHEC un operón que codifica para una fimbria. Dicho operón mostró gran similitud con el operón de la fimbria polar de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Una de las contribuciones más importantes del trabajo es que proponen que éste operón facilita la adherencia de EHEC, favoreciendo la formación de microcolonias (Torres *et al.*, 2002). Por otro lado, la porina OmpA, una proteína altamente conservada dentro del grupo de las enterobacterias, se ha involucrado en la adherencia de EHEC a células HeLa y Caco-2 (Torres y Kaper, 2003). No obstante se desconoce el mecanismo inicial de adherencia de la bacteria a la célula huésped y su papel dentro del mecanismo de patogenicidad.

II.9.ii Factores de virulencia en EHEC

La enfermedad producida por EHEC esta asociada con tres factores principales: la capacidad para provocar la formación de lesiones AE, que está mediada por los genes codificados en *LEE*; la expresión de la toxina Shiga (Stx); y la presencia de un plásmido llamado pO157 que codifica una hemolisina (Nataro y Kaper, 2004; Paton y Paton, 1998). Sin embargo, existen cepas “atípicas de EHEC” que expresan Stx pero no producen lesiones AE, ni poseen el pO157. Se cree que la capacidad para unirse estrechamente a los enterocitos e inducir la formación de lesiones AE, contribuye al desarrollo de la diarrea no acuosa; este proceso parece necesario para la colonización intestinal. Una vez establecida, EHEC secreta la Stx, la cual tiene un efecto sistémico, que provoca la diarrea con sangre y el SUH (Nataro y Kaper, 2004).

A continuación se mencionan de manera detallada los factores de virulencia de EHEC.

Toxina Shiga (Stx). La Stx, también conocida como toxina tipo Shiga o Verotoxina es producida por cepas de EHEC y posee gran similitud a las toxinas producidas por *S. dysenteriae* (O' Brien *et al.*, 1992). La producción de Stx constituye un elemento clave en la patogénesis de EHEC y una característica que distingue a éste patógeno de EPEC. La Stx es una toxina AB₅, con una subunidad catalítica A de 32 kDa y cinco subunidades B de 7.7 kDa (Ling *et al.*, 1998). La subunidad A es dividida en dos productos (A1 y A2) que están unidas por puentes disulfuro. La toxina se une a un receptor glicolípidido específico, globotriosilceramida, o GB3, sobre la superficie celular mediante las subunidades B (Linwood *et al.*, 1996). Después de la unión, la incorporación de la toxina ocurre por endocitosis, seguida por un transporte desde el aparato de Golgi hacia al retículo endoplásmico (Sandvig *et al.*, 1992). La subunidad A entra al citoplasma, donde el péptido A1 actúa como una *N*-glucosidasa específica que corta una adenina de la subunidad 28S del RNA ribosomal, inhibiendo la unión del tRNA dependiente del factor de elongación 1 (EF-1), lo que resulta en la intoxicación de las células y la posterior muerte de estas (Endo *et al.*, 1988; Saxena *et al.*, 1989).

pO157. Como se ha mencionado antes, EHEC posee un plásmido de 14 Kb conocido como pO157, el cual no se encuentra en EPEC. El papel de este plásmido en la virulencia no ha sido descrito, sin embargo, algunos reportes lo involucran con la adherencia de EHEC a las células epiteliales *in vitro* o en la colonización *in vivo* (Dytoc *et al.*, 1994), sin embargo, otros autores ponen en tela de juicio lo antes mencionado (Fratamico *et al.*, 1993). La determinación de la secuencia nucleotídica completa del pO157 ha confirmado que codifica probables factores de virulencia, que incluyen a una hemolisina (HlyA), una peroxido-catalasa (KatP), una serin-proteasa (Esp), un sistema de secreción tipo II, así como una proteína que contiene un probable sitio activo parecido al de una toxina clostridial (LCT) (Burland *et al.*, 1998).

II.10 *Citrobacter rodentium*

C. rodentium (originalmente llamado *C. freundii* biotipo 4280) es el único representante de patógenos AE que infecta ratones (Schauer y Falcow, 1993). Este patógeno comparte similitudes funcionales y estructurales con EPEC y EHEC. *C. rodentium* produce lesiones AE en el colon de una manera similar a las producidas por EPEC y EHEC en el humano. De igual manera, la proteína encargada de la unión íntima de la bacteria con la célula hospedante, intimina, es funcionalmente homóloga en *C. rodentium* y en cepas de EPEC y EHEC. Además, la infección murina y humana con estos patógenos se caracterizan por una respuesta inmune similar contra la bacteria (Luperchio y Schauer, 2001).

II.10.i Patogenicidad de *C. rodentium*

C. rodentium provoca en ratones hiperplasia colónica transmisible (HCT). Normalmente, la infección en un ratón es eliminada en un periodo de 3-6 semanas y adquieren inmunidad contra un reto secundario (Luperchio y Schauer, 2001). Dependiendo de la cepa de ratón, la infección es acompañada de manera normal por una morbilidad y mortalidad mínimas en ratones adultos, aunque un crecimiento retardado y alta mortalidad, pueden ocurrir en ratones jóvenes (Luperchio y Schauer, 2001).

La hiperplasia de la mucosa, la marca de HCT, puede ser detectada mediante análisis microscópicos alrededor del cuarto día post-infección (Luperchio y Schauer, 2001) y se caracteriza por la elongación de las criptas del colon, incremento en la actividad mitótica de las células, y la aparición de una gran cantidad de células epiteliales en la cripta. Durante la primera semana post-infección, la altura de las criptas se ha incrementado de 25 células en el tejido normal a aproximadamente 40 células infectadas (Luperchio y Schauer, 2001). Durante las siguientes 2-3 semanas el número de células por cripta es de tres a cuatro veces mayor a la normal dando a la cripta una apariencia pseudoestratificada (Luperchio y Schauer, 2001). Los factores que determinan el grado de la respuesta inflamatoria no están del todo entendidos. Recientemente se ha observado que en la cepa Swiss-Webster de ratón, el número de organismos en el inoculo experimental puede influir en la severidad de la inflamación y en los cambios erosivos (Luperchio y Schauer, 2001). Como se mencionó anteriormente, el análisis de la secuencia del LEE de *C. rodentium* demuestra que existe gran similitud entre las islas LEE de EPEC, EHEC y *C. rodentium* (Deng *et al.*, 2001).

II.10.ii Factores de virulencia en *C. rodentium*

Restando la isla de patogenicidad LEE, poco se sabe acerca de factores de virulencia de *C. rodentium*. Se ha demostrado que el plásmido críptico de 65 Kb que posee *C. rodentium* no es necesario para la infección o la virulencia en el ratón (Schauer y Falkow, 1993). Aún cuando es posible que muchos cambios estén mediados como una consecuencia de las actividades multifuncionales y cooperativas de los efectores del LEE, el reciente descubrimiento de efectores codificados fuera del LEE (Deng *et al.*, 2004) implica que el LEE no trabaja sólo. La secuencia de genomas de patógenos AE ha revelado la presencia de varias IP y su potencial para codificar un gran número de determinantes de virulencia adicionales. Sin embargo, sólo uno de los Nle's (Non LEE-encoded effectors) ha sido caracterizado en *C. rodentium* (EspI/NleA).

EspI/NleA no se requiere para la formación de la lesión AE. Se ha demostrado que NleA de EHEC se localiza en el aparato de Golgi (Gruenheid *et al.*, 2004). Una mutante *espI/nleA* está atenuada ya que ningún ratón infectado con esta mutante muere, sin embargo, cuando la mutante *espI/nleA* es complementada esta se vuelve virulenta mostrando una mortalidad del 100% de los ratones el día 13 después de la infección (Mundy *et al.*, 2004)

Otro de los probables efectores recientemente identificados, que no pertenece al grupo de Nle's es EspJ, y se ha demostrado que éste elemento no se requiere para la formación de lesiones AE. La infección con una mutante en *espJ* de *C. rodentium* no mostró ningún defecto en la colonización de ratones de la cepa C3H/HeJ a los 10 días después de la infección (Dahan *et al.*, 2005).

III ANTECEDENTES

En un estudio realizado por Deng y colaboradores en el año 2004 se realizó una mutagénesis de los 41 genes del LEE de *C. rodentium* y se caracterizaron funcionalmente a todas las mutantes *in vitro* y en el modelo de infección murino. Se identificaron 33 factores de virulencia, incluyendo dos reguladores (GrlA y GrlR) y un sistema de secreción jerárquico para el SSTT. En este trabajo, se definen a los efectores codificados en el LEE de *C. rodentium* (Deng *et al.*, 2004).

En éste trabajo encuentran que en mutantes *sepL* y *sepD* de *C. rodentium*, las cuales no secretan translocadores pero si efectores, la secreción de Tir y p54 aumenta notablemente. Al momento del estudio, p54 representaba una proteína desconocida codificada en una región diferente al LEE, posteriormente se nombraría NleA. Los autores de este trabajo notaron que el efecto multicopia de GrlA (regulador positivo del LEE), a partir del plásmido multicopia pCRorf11 aumenta la expresión de los genes del LEE y consecuentemente la secreción de EspA, EspB y EspD comparada con la cepa silvestre que carece de pCRorf11 (>300%) (Figura 8). Interesantemente, el mismo plásmido aumentó en un fondo mutante *sepL* y *sepD*, la secreción de Tir y NleA y de al menos 6 proteínas adicionales. Estas proteínas se caracterizaron mediante un análisis proteómico que permitió su identificación utilizando el genoma totalmente secuenciado de EHEC. Las 7 proteínas secretadas no están codificadas en el LEE de EHEC por lo que fueron nombradas NleA, NleB, NleC, NleD, NleE, NleF y NleG (por sus siglas en ingles a non-LEE-encoded effectors). Debido a que el genoma de *C. rodentium* aún no está totalmente secuenciado no es claro como es que los genes que codifican a estos nuevos efectores están organizados. En base a la secuencia peptídica obtenida de las 7 Nle's, se puede concluir que están muy conservadas en el genoma de EHEC O157 (Tabla 1). En el genoma de EHEC, los homólogos de NleA-G están codificados por genes agrupados en tres IP (O-36, 71 y 122) (Figura 9, Tabla 1). Homólogos de los 7 efectores también se encuentran presentes en el genoma parcialmente secuenciado de EPEC. Algunos de ellos tienen homólogos en otros patógenos como *E. coli* enteropatógena de conejo REPEC, *Pseudomonas syringae*, *S. flexneri* y *S. typhi*, lo que sugiere la importancia de estos nuevos efectores en la virulencia de distintas bacterias.

En nuestro laboratorio estamos interesados en entender como es que estos nuevos efectores (Nle's) son regulados a nivel transcripcional. En este trabajo presentamos el estudio de la regulación transcripcional del gen *nleB2* de EHEC. La

proteína NleB de *C. rodentium*, inicialmente descrita, contiene 326 residuos de aminoácidos con un peso aproximado de 38 kDa y se sabe que es secretada por el SSTT codificado en el LEE (Deng *et al.*, 2004). En el genoma de EHEC encontramos dos homólogos a NleB (NleB1 y NleB2, codificados en las IP O-36 y O-122, respectivamente) que presentan entre ellas un 60% de identidad y 74% de similitud. Además de EHEC, se han encontrado homólogos de NleB en las bacterias patógenas REPEC, EPEC y *S. typhimurium*. La decisión de estudiar *nleB2* surge porque este gen se encuentra en la isla O-36 donde existe el mayor número de probables efectores (Figura 10), dos de ellos identificados en el estudio de Deng y colaboradores, *nleC* y *nleD*. Además, recientemente se determinó que la cepa mutante *nleB* de *C. rodentium* presenta atenuación en el modelo de infección murino (J. L. Puente, comunicación personal).

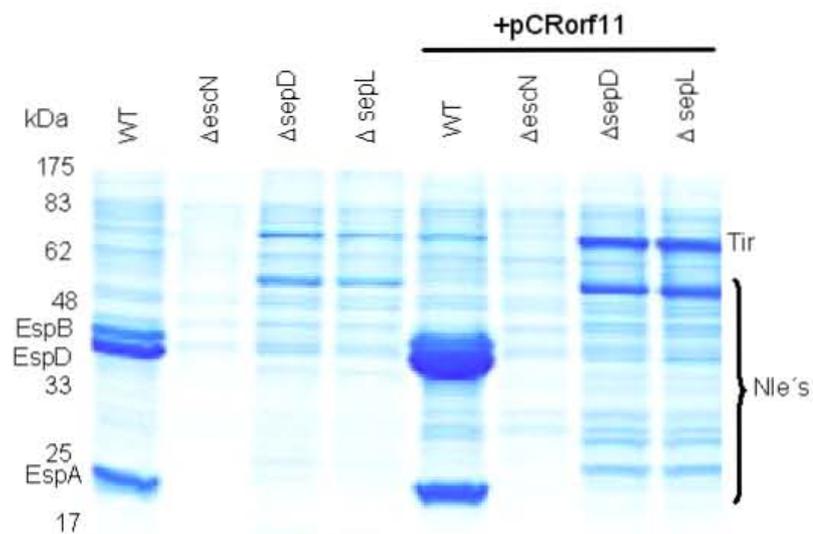


Figura 8. Efecto de la sobreexpresión de Orf11 (GrlA) en *C. rodentium* silvestre y las mutantes *sepL* y *rorf6*. Se muestran a las Nle's secretadas en las respectivas mutantes (Tomado y modificado de Deng *et al.*, 2004).

Tabla 1. Efectores y probables efectores secretados por el SSTT codificado en el LEE de *C. rodentium*.

Nombre	kDa	pI	Localización genética	Homólogos en EHEC y en otros patógenos por BLAST
LEE				
Tir	68	5.0		Tir, conservado en todos los patógenos AE
EspG	44	7.3		EspG, conservado en todos los patógenos AE
Map	23	9.0		Map, conservado en todos los patógenos AE
EspF	31	11.0		EspF, conservado en todos los patógenos AE
EspH	21	8.7		EspH, conservado en todos los patógenos AE
Fuera de LEE				
NleA	54	5.8		EHEC Z6024 en la isla O-71 cerca del profago CP-933P
NleB	39	5.9		EHEC Z4328 en la isla O-122, <i>rorfE</i> en REPEC, y <i>S. typhimurium</i> STMF1. También es homólogo a Z0985 de la isla O-36
NleC	40	4.6		EHEC Z0986 en la isla O-36 cerca del profago CP-933K
NleD	28	7.1		EHEC Z0990 en la isla O-36, al igual que Z0985 y Z0986. Similar al efector HopPtoH de <i>P. Syringae</i>
NleE	27	6.3		EHEC Z4329 en la isla O-122 al igual que Z4328. Similar a <i>rorfD</i> de REPEC
NleF	24	4.7		EHEC Z6020 en la isla O-71 al igual que Z6024. Similar a proteínas hipotéticas en <i>Y. pestis</i> y <i>H. pylori</i>
NleG	26	5.8		

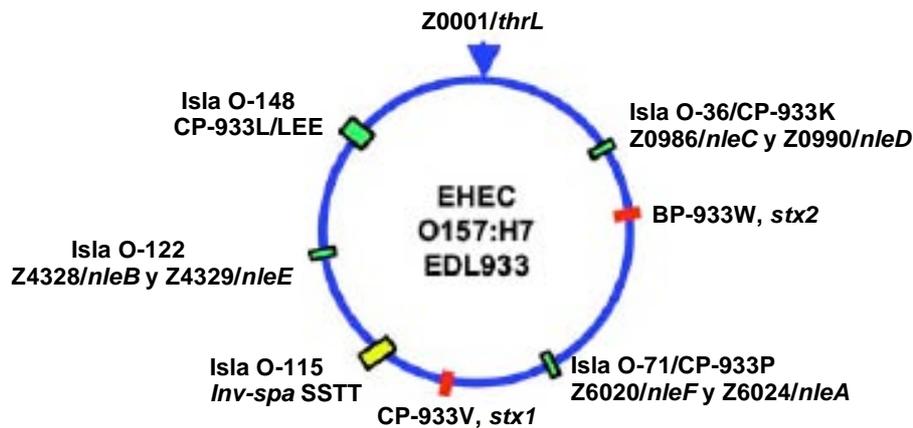


Figura 9. Localización de las proteínas Nleís en el genoma de EHEC O157:H7. También se muestra la localización de los genes de la toxina Shiga (*stx*), la isla LEE y los diferentes profagos asociados (Tomado y modificado de Deng *et al.*, 2004).

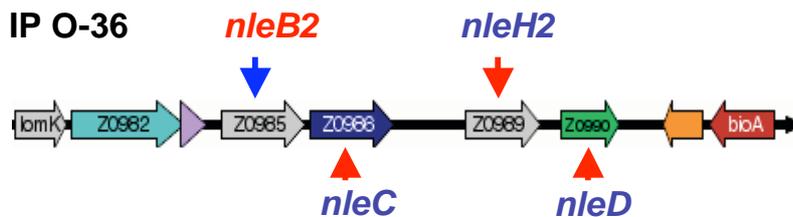


Figura 10. Organización genética de la IP O-36 de EHEC donde se sitúan los genes *nleB2*, *nleC*, *nleH2* y *nleD*. La imagen fue generada utilizando la base de datos *coliBase* (<http://colibase.bham.ac.uk/>) (Chaudhuri *et al.*, 2004).

IV OBJETIVOS

Objetivo general:

Estudiar la regulación transcripcional de los genes involucrados en la virulencia de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) y *Citrobacter rodentium*.

Objetivo particular:

Estudiar la regulación transcripcional del gen *nleB2*

Objetivos experimentales:

Construcción de fusiones transcripcionales *nleB2-cat*.

Identificación de la región promotora del gen *nleB2*.

Identificación de los elementos en *cis* involucrados en la regulación de *nleB2*.

Evaluación del papel de los reguladores Ler y GrlA en la regulación de *nleB2*.

V MATERIALES Y MÉTODOS

➤ Cepas bacterianas y medios de cultivo

Las cepas y plásmidos empleados en este estudio se enlistan en la Tabla 2. Las bacterias fueron cultivadas en medio LB (Luria Bertani; que contiene por litro 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, pH 7.5), en medio de cultivo para células eucariontes DME (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL). A un litro de DMEM se le adicionaron 3.7 g de NaHCO₃ y 160 ml de piridoxal (25 mg/ml), suplementados con los antibióticos como indica la Tabla 3.

Tabla 2. Cepas y plásmidos empleados en este trabajo.

Cepas	Características	Referencia
<i>E. coli</i> EDL933	EHEC O157:H7 prototípica	Perna <i>et al.</i> , 2001
<i>E. coli</i> MC4100	K-12 no patogénica; St ^R	Laboratorio J.L. P
<i>E. coli</i> VALE 156-6	EDL-933 con una inserción en <i>ler::Km</i> ; Km ^R	Laboratorio J.L. P
<i>E. coli</i> VALE 34-6	EDL-933 con una inserción en <i>grlA::Km</i> ; Km ^R	Laboratorio J.L. P
DH5a	<i>E. coli supE44 DlacU169 (F80 lacZDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Stratagene
<i>C. rodentium</i> DBS 100	ATCC 51459 W. T	Schauer, 1993
<i>C. rodentium ler</i>	DBS con una inserción en <i>ler::Km</i> ; Km ^R	Laboratorio J.L. P
<i>C. rodentium grlA</i>	DBS con una remoción de <i>grlA</i>	Deng <i>et al.</i> , 2004
Plásmidos		
pKK232-8	Derivado del pBR322, que contiene el gen de la enzima cloranfenicol acetil transferasa (<i>cat</i>) sin promotor, Amp ^r	Pharmacia Biotech
pKKnleB2	Derivado de pKK232-8, que contiene 315 pb de la región promotora de <i>nleB2</i>	Este estudio
pKKnleB2-P1	Derivado de pKKnleB2, que contiene una mutación en el promotor 1 (P1) de <i>nleB2</i>	Este estudio
pKKnleB-P2	Derivado de pKKnleB2, que contiene una mutación en el promotor 2 (P2) de <i>nleB2</i>	Este estudio
pKKnleB2-P1P2	Derivado de pKKnleB2, que presenta mutaciones en ambos promotores (P1 y P2) de <i>nleB2</i>	Este estudio
pKKnle2IRm	Derivado de pKKnleB2, que contiene mutaciones que cambian la identidad de la SIR	Este estudio
pKKnleB2-45	Derivado del pKKnleB2, que contiene un recorte de la región promotora de <i>nleB2</i> 45 pb corriente arriba del promotor 1	Este estudio
pKKnleB2IR	Derivado de pKKnleB2, que contiene un recorte que contiene la SIR, P1 y P2 de la región promotora de <i>nleB2</i> .	Este estudio
pMPT3	Derivado del p15A, vector de clonación de mediano número de copias Tc ^r	Mayer, 1995
pMPT3grlA	Derivado del pMPT3 que contiene el gen <i>grlA</i> de <i>C. rodentium</i> bajo el promotor <i>lac</i> , utilizado en ensayos de complementación.	Laboratorio J.L. P
pMPT3Crlr4	Derivado del pMPT3 que contiene el gen <i>ler</i> de <i>C. rodentium</i> bajo el promotor <i>lac</i> utilizado en ensayos de complementación	Laboratorio
pLEE2	Derivado del pKK232-8 que contiene la región intergénica localizada entre los genes <i>sepZ</i> y <i>orf12</i>	Bustamante <i>et al.</i> , 2001

Tabla 3. Antibióticos empleados en este trabajo.

Antibiótico	Abreviatura	Concentración	Concentración empleada
Ampicilina	Ap	200 mg/ml	100 mg/ml
Kanamicina	Km	25 mg/ml	30 mg/ml
Ac. Nalidíxico	Nal	25 mg/ml	150 mg/ml
Tetraciclina	Tc	12 mg/ml	20 mg/ml

➤ **Purificación de ADN plasmídico (miniprep)**

El ADN plasmídico se purificó a partir de cultivos de las cepas de interés utilizando el estuche comercial “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche) de acuerdo a las indicaciones del fabricante. En ocasiones, la purificación se realizó mediante la técnica de lisis alcalina, la cual se describe brevemente a continuación:

Se concentra por centrifugación 1 ml de un cultivo de la clona de interés. La pastilla celular se resuspendió en 200 ml de la solución 1 (glucosa al 20 %, EDTA , Tris-HCl 2 M pH 8.0), y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, a la muestra se le agregaron 200 ml de la solución 2 (NaOH 10 N, SDS al 20 %), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. A la mezcla anterior se le agregaron 200 ml de la solución 3 (acetato de potasio 3 M, pH 8.0), se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 10 min. Transcurrido el tiempo, la mezcla se centrifugó durante 10 min a 12,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo y se le adicionaron 2 volúmenes (con respecto al sobrenadante) de etanol absoluto, se mezcló e incubó en hielo por 5 min. Transcurridos los 5 min de incubación, la mezcla se centrifugó por 10 min a 12,000 rpm y el sobrenadante se desechó, mientras que la pastilla que quedo en el tubo se resuspendió en 130 ml de agua desionizada y 20 ml de MgCl₂ 1M para después incubar en hielo por 5 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se colocó de nuevo en tubos limpios a los cuales se les agregaron 300 ml de etanol absoluto y 15 ml de acetato de sodio 3M. Enseguida, la mezcla se incubó en hielo por 5 min. Pasado el tiempo de incubación, la mezcla se centrifugó por 10 min a 12,000 rpm desechando el sobrenadante y resuspendiendo la pastilla en 500 ml de etanol al 70%. Entonces la mezcla, se centrifugó por 5 min a 12,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Finalmente, la pastilla resultante se secó con calor al vacío durante 15 min y se resuspendió en 20 ml de agua desionizada estéril.

➤ **Construcción de las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat***

Las fusiones transcripcionales se construyeron utilizando el plásmido pKK232-8 y productos de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) que contienen la región

promotora de *nleB2*. Los productos de PCR fueron generados a partir del ADN cromosomal de la cepa EDL933 de EHEC O157:H7, el cual se purificó mediante el estuche comercial “Aqua Pure Genomic DNA isolation Kit” (Bio-Rad) siguiendo las indicaciones del fabricante. El pKK233-8 contiene el gen *cat*, que codifica la enzima cloranfenicol acetil transferasa (Tabla 1), pero carece de promotor. El sitio múltiple de clonación, que se encuentra hacia el extremo 5' de *cat* permite la inserción de fragmentos de PCR (Figura 10).

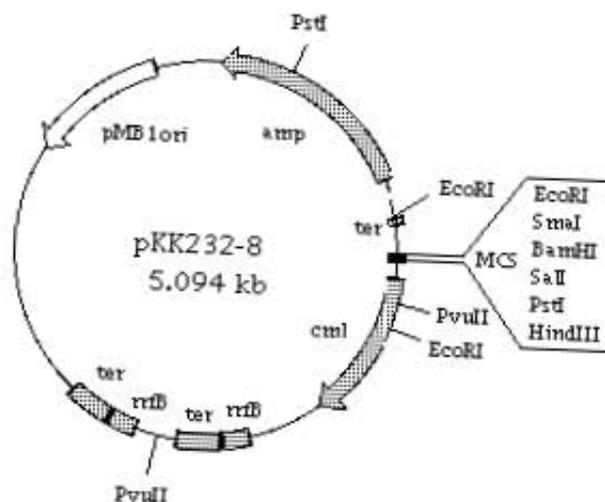


Figura 11. Mapa del vector pKK232-8, se muestra el sitio de policlonación (MCS). Este vector fue utilizado para construir todas las fusiones que se presentan en este trabajo.

Los productos de PCR empleados para la construcción de las fusiones transcripcionales se obtuvieron usando los oligonucleótidos listados en la Tabla 4.

A continuación se describe el tipo de reacción de PCR realizado en este estudio.

Reactivo	Volumen
ADN genómico	(~10 ng)
Amortiguador 10 X	5 ml
MgCl ₂ 50 mM	5 ml
Mezcla de dNTP's*	8 ml
Oligo F (25 mM)	1 ml
Oligo R (25 mM)	1 ml
Enzima <i>Taq</i> polimerasa (5 U/ml)	0.5 ml
Enzima <i>Pfu</i> polimerasa (5 U/ml)	0.5 ml
Agua desionizada	cbp 50 ml

*dATP, dCTP, dGTP, dTTP (New England Biolabs), 250 mM cada uno de los dNTP's.

Las condiciones de alineamiento y tiempo de amplificación variaron en cada reacción dependiendo de los pares de oligonucleótidos empleados y del tamaño del fragmento a amplificar.

➤ Digestiones

Para obtener las fusiones transcripcionales, los fragmentos de PCR, así como el vector pKK232-8 se digirieron con distintas enzimas de restricción. El volumen de las reacciones varió entre 15-30 ml, según la cantidad de ADN. Para las digestiones dobles, primero se digirió con una enzima y posteriormente con la otra. Todas las reacciones se llevaron a cabo bajo las condiciones especificadas por el fabricante.

Tabla 4. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.		
NOMBRE	SECUENCIA 5'-3' *	Características
Z0985L	CCG A/AG CTT GAC AGG GTG AAC TCT G	Oligonucleótido reverso que se utilizó para amplificar 315 pb de la región promotora de <i>nleB2</i>
Z0985U	CGG/ GAT CCA GTG TGT GGT AAG ACC	Oligonucleótido a favor que se utilizó para amplificar 315 de la región promotora de <i>nleB2</i>
mutZ0985U	ATG CCA AGG GCC /CTA ATA GAT TAA A	Oligonucleótido a favor que se utilizó junto con Z0985L para cambiar el promotor 1 por un sitio de restricción
mutZ0985L	ATC TAT TAG GGC C /CT TGG CAT ACT C	Oligonucleótido reverso que se utilizó junto con Z0985U para cambiar el promotor 1 por un sitio de restricción
nleB2-10U	TTT GTT GGG CC /C GCA AAG ATG GC	Oligonucleótido a favor que fue utilizado con Z0985L para generar una sustitución del promotor 2 por un sitio de restricción
nleB2-10L	CTT TGC GGG CCC AAC AAA CAT CC	Oligonucleótido reverso que se empleo con Z0985U para sustituir el promotor 2 por un sitio de restricción
Z6021Iru	CGG/ GAT CCC TTC ACA AAA ACC GG	Oligonucleótido a favor empleado con Z0985L para generar un recorte 5 pb corriente arriba de la SIR
Z6021IrmL	AAC AAC / TCG AGG AGC CGG ACT G/TC GAC TTT GTG AAG C	Oligonucleótido reverso que se utilizó con Z0985U para generar cambios de identidad del SIR
Z6021IrmU	ACA AAG/ TCG ACA GTC CGG CTC C/TC GAG TTG TTG TCA TG	Oligonucleótido a favor empleado con Z0985L para introducir cambios en la identidad de la SIR
pKK-8-BHI-F	G/GA TCC CTC GGG GAT	Oligonucleótido correspondiente a una secuencia del vector pKK232-8 en la región 5' del gen reportero <i>cat</i> que se empleo para secuenciar las fusiones que se presentan en este trabajo
pKK-8-H3-R	GTT TTC GA/A TAC AGC	Oligonucleótido correspondiente a una secuencia del vector pKK232-8 que se empleo para secuenciar las fusiones de este trabajo y para los experimentos de PE.

* Las letras negras indican los cambios para generar un sitio de restricción de interés; las diagonales representan el sitio de corte.

➤ Ligaciones

Una vez digeridos los productos de PCR y el vector, se llevaron a cabo las reacciones de ligación como a continuación se especifica:

ADN, productos de PCR	(~200 ng)
ADN vector	(~50 ng)
Amortiguador 10 X	2 ml
Enzima T4 DNA ligasa (Promega, 3 U/ml)	0.5 ml
Agua	cbp 20 ml

La mezcla se incubó toda la noche a 16 °C

➤ **Mutagénesis sitio-dirigida**

El método descrito por Ito y colaboradores (1991) fué utilizado para obtener constructions que contienen mutaciones en los promotores de *nleB2* o en el SIR. Brevemente, un par de productos de amplificación que contienen la mutación deseada fueron generados utilizando oligonucleótidos complementarios y externos. Los productos individuales fueron amplificados, aislados del gel de agarosa, mezclados y utilizados como templados para una segunda amplificación con los oligonucleótidos externos resultando en un producto que contiene las mutaciones de interés. Los productos de la amplificación final (sobrelapante u “overlapping”) se clonaron en el vector pKK232-8 y los plásmidos resultantes fueron secuenciados para verificar la mutación.

➤ **Preparación de células electrocompetentes**

Para preparar las células electrocompetentes, se inocula la cepa de interés en 5 ml de medio LB y se cultivan durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se inoculan 250 ml de medio LB con 2.5 ml del cultivo anterior y se pone a incubar el cultivo a 37°C hasta que alcance una D. O_{600} de 0.5-0.7 (aproximadamente 5 horas). Cuando la D. O se alcanza, se coloca el cultivo en hielo por 15 min y el cultivo se coloca en tubos para ser centrifugado a 10000 rpm a 4°C, durante 10 min. Después de la centrifugación el sobrenadante se retira y las células se resuspenden en 100 ml de agua MiliQ fría (4°C). Posteriormente, la mezcla anterior se centrifuga a 10000 rpm a 4°C por 10 min y el sobrenadante se retira. La operación anterior se repite tres veces y después, el cultivo se resuspende en 100 ml de una solución de glicerol al 10% fría (4°C) y ésta mezcla se centrifuga a 10,000 rpm a 4°C, durante 10 min y se retira el sobrenadante. La pastilla resultante se resuspende en 3 ml de una solución de glicerol al 10% fría y se elaboran

alícuotas de 50 ml en tubos estériles. Dichos tubos se mantienen en congelación a 70°C hasta su uso.

➤ **Electroporación**

Para realizar el proceso de electroporación, las células que se mantenían a -70°C se descongelan a temperatura ambiente y se mezcla con el ADN del plásmido de interés (aproximadamente 100 ng) y se incubó en hielo por 5 min. Posteriormente, la mezcla se coloca en cubetas para electroporar de 2 mm (Biorad) y con ayuda del electroporador (Biorad) se realiza una descarga de 2.5 Kvoltios. Después de que se realizó la electroporación, la mezcla se recupera con 1 ml de medio SOC y deja crecer a 37°C por 1 h. Después de que las células se han recuperado, se sidebar de 100 a 200 ml del cultivo en placas de medio LB acondicionadas con los antibióticos correspondientes.

➤ **Purificación de ARN e identificación del inicio de la transcripción**

El ARN total se obtuvo de bacterias cultivadas en DMEM que albergan las fusiones de interés utilizando el estuche “Rneasy Qiagen” (Qiagen Inc., Chatsworth, CA). La concentración e integridad del ARN se determinó con lecturas a D. O. _{260nm} y mediante un análisis electroforético en un gel de agarosa al 1.5% adicionado con teocinato de guanidina. El mapeo de transcritos se realizó por la técnica de “Primer Extension” (PE). Para las reacciones de PE se utilizaron oligonucleótidos complementarios al extremo 5’ o 3’ de la región reguladora de gen *nleB2*, los cuales se marcaron radioactivamente con [³²P] ATP utilizando la enzima T4 polinucleótido cinasa.

Fosforilación de los oligonucleótidos

Oligonucleótido (1.25 mM)	0.4 ml
Amortiguador de cinasa 10 X	1 ml
[³² P] ATP (5 mCi)	0.4 ml
Enzima T4 Polinucleótido cinasa (USB, 30 U/ml)	0.2ml
Agua	cbp 10 ml

Esta mezcla se incubó a 37 °C durante 30 min y se inactivó a 65 °C por 5 min.

A continuación, se enlistan de manera detallada las condiciones para realizar la extensión del iniciador o PE: Los oligonucleótidos marcados radiactivamente fueron empleados en la siguiente reacción:

Mezcla de hibridación

ARN	30 mg
NaCl 5 M	1.88 ml
Tris-HCl pH 8.0, 1M	0.89 ml
Oligonucleótido radioactivo (~5 mCi)	0.8 ml
Agua DEPC	cbp 25 ml

Esta mezcla se calentó a una temperatura de 90°C durante 5 min. Posteriormente, la mezcla se retiró del “termoblock” y se dejó enfriar a temperatura ambiente hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 42°C, entonces se preparó la mezcla para la siguiente reacción:

Mezcla de extensión

Inhibidor de RNasa (Invitrogen, 40 U/ml)	1.77 ml
Amortiguador 5 X	10 ml
DTT 100 mM	5 ml
dNTP's 25 mM	1.5 ml
Enzima AMV-RT (USB, 15 U/ml)	0.8 ml
Agua DEPC (Diethyl Pirocarbonato)	cpb 50 ml

La reacción se incubó durante 3 h a 42°C y. Los productos que se obtuvieron fueron precipitados con 1 ml de butanol seguidos de 5 min de centrifugación a 12000 rpm y 3 lavados con 0.5 ml de etanol al 70%. Posteriormente, las muestras se secaron utilizando una bomba de vacío (SAVANT). Para complementar el experimento, se realizaron reacciones de secuenciación de las regiones de interés, esto se realizó empleando los oligonucleótidos y el ADN de plásmido derivados del pKK232-8 que contenían las regiones de interés.

➤ **Secuenciación de ADN**

La secuenciación de ADN se realizó según el método descrito por Sanger en 1977, usando el estuche comercial “Termosequenase” (Amersham). Inicialmente, se preparó la siguiente mezcla de reacción para secuenciar cada una de las fusiones:

Mezcla de reacción

ADN plasmídico (obtenido por el estuche comercial de Roche)	(~100 ng)
Amortiguador de enzima Sequenasa 10 X	2.4 ml
Oligonucleótido radiactivo	1 ml
Enzima Sequenasa (USB, 4 U/ml)	0.6 ml
Agua	cbp 20 ml

Posteriormente, en cuatro tubos de 0.5 ml se agregaron 4 ml de cada uno de los nucleótidos terminadores (dideoxiterminadores ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP). Después, a cada uno de estos tubos se le adicionaron 5 ml de la mezcla de reacción antes descrita y las reacciones se sometieron a los siguientes ciclos en un termociclador:

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	5 min	1
95°C	30 seg	} 50
45°C	30 seg	
70°C	1 min	

Finalmente, a las muestras se les adicionaron 4 ml de formamida al 95 %, o solución de paro. Las muestras se analizaron en un gel de poliacrilamida al 8 % (80 ml de solución de acrilamida al 8 %, 250 ml de persulfato de amonio, PSA, al 10 % y 50 ml de Tetrametiletildiamina, TEMED). Antes de iniciar la corrida, el gel se precurrió durante 40 min a 50 W en amortiguador TBE 1X (Tris-Boratos-EDTA; 108 g de Tris base, 9.3 g de EDTA y 55 g de ácido bórico por litro de solución 10X). Las muestras se desnaturalizaron durante 5 min a 90°C, y se cargaron 6 ml en cada pozo del gel y se sometieron a electroforesis, con tiempos de corrida que dependían del tamaño del inserto. Al término de la corrida, el gel se transfirió a papel filtro 3M y secó al vacío a

80°C por 1.5 h y se expuso en un cartucho tipo “PhosphorImager” (Molecular Dynamics) durante toda la noche. Al día siguiente, la placa receptora se sometió a un proceso de “escaneo” empleando el equipo “PhosphorImager” (Molecular Dynamics) para obtener una imagen con la ayuda del programa “Image Quant” para su posterior análisis.

➤ **Actividad de CAT (Cloramfenicol acetil transferasa)**

Para determinar la actividad de CAT, se colectaron muestras de los cultivos de interés a D. O.₆₀₀ = 0.8 y 1. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm a 4°C por 10 min y se lavaron con 0.7 ml de solución de TDTT (Tris-HCl 1M pH 7.8, y DTT 1M). Las pastillas obtenidas se resuspendieron en 0.5 ml de solución TDTT y se sometieron a cavitación. Brevemente, las muestras se cavitan durante 9.9 seg y se dejan reposar por igual tiempo, estos ciclos se repiten durante 3 min a una amplitud de 35% en un sonicador Soniprep 150 MSE. Posteriormente, la suspensión que se obtiene se centrifuga a 4°C por 20 min a 15000 rpm para separar fragmentos celulares, y los sobrenadantes se colocan en tubos limpios. Para evaluar la actividad de CAT, se colocan por duplicado 5 ml de cada muestra en una placa de 96 pozos y se adicionan 200 ml del amortiguador de reacción que contiene 10 mg de DNTB 5-5'-dithio-bis(ácido 2-nitrobenzoico) (Boehringer Manheim) en 2.5 ml de Tris-HCl 1M pH 7.8, 0.5 ml de cloramfenicol (0.1 mM) y 0.5 ml de acetil Coenzima A (0.1 mM) (Pharmacia Biotech). Los cambios en absorbancia se leen a través del lector automático CERES 900C utilizando el programa CK3 (Biotek Instruments Inc. Winoski, VT).

La concentración total de proteínas se determinó empleando el estuche “BCA Protein Assay Reagent” (Pierce) de acuerdo a las indicaciones de fabricante. Brevemente, se colocan 10 ml de extracto por duplicado en cajas de 96 pozos y se le adicionan 200 ml de la mezcla preparada del estuche comercial. Después de llenar la placa, se incuba a 37°C por 30 min y se lee en el lector automático CERES 900C con el programa KC3. Los valores obtenidos de la concentración de proteínas se utilizan para calcular la actividad específica de CAT. Cada valor de actividad representada en las gráficas se obtuvo del promedio de 3 ensayos realizados de manera independiente.

➤ **Análisis bioinformático**

El análisis del ADN se realizó con el programa DNASTAR y con el conjunto de programas que se encuentran disponibles en NCBI (por sus siglas en inglés, National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las búsquedas de las secuencias de los genomas se realizaron empleando el programa BLAST nucleótido-nucleótido (BLASTn) de manera específica usando los parámetros establecidos. Para los genomas que aún no se encuentran totalmente secuenciados se realizó un BLAST local en el servidor del “Sanger Institute” (<http://www.sanger.ac.uk/DataSearch/blast.shtml>). Los alineamientos múltiples de secuencia se realizaron utilizando el programa Clustal-W, usando los valores predeterminados (Thompson *et al.*, 1994) en el servidor del “European Bioinformatics Institute” (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>). La edición de los alineamientos se realizó mediante el empleo del programa SeqVu.

VI RESULTADOS

VI.1 Generación de la fusión *nleB2*

Para iniciar el estudio de la regulación transcripcional de *nleB2*, se construyó una fusión de la región promotora de este gen al gen reportero *cat*. Para este fin, se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los oligonucleótidos Z0985U y Z0985L (Tabla 3) y ADN genómico de la cepa EDL933 de EHEC, un fragmento de 315 pb de la región reguladora de *nleB2*. El producto de PCR resultante se clonó en el vector comercial pKK232-8, que contiene al gen reportero *cat* desprovisto de promotor, generando el pKK*nleB2* (fusión *nleB2*) (Tabla 1). Por experiencia de experimentos previos en nuestro laboratorio, sabemos que el fondo de actividad de CAT del pKK232-8 es nulo. La fusión *nleB2* contiene 240 pb corriente arriba del ATG del gen *nleB2* que incluyen 60 pb hacia la región estructural del gen que precede a *nleB2*, *Z0984*, así como 60 pb corriente abajo del ATG de *nleB2*, tal como se muestra en la figura 12. Generalmente, los ensayos de actividad del reportero (Cloranfenicol acetil transferasa) presentados en este trabajo fueron realizados a partir de cultivos de las cepas de interés crecidas en medio DME bajo dos condiciones: la primera en agitación a 200 rpm a 37°C y la segunda, en condiciones estáticas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. En trabajos previos se ha demostrado que estas condiciones de crecimiento son óptimas para la expresión de los genes codificados en el LEE (Bustamante *et al.*, 1998; Deng *et al.*, 2004).

Iniciamos el estudio de la fusión *nleB2* con un experimento en el que realizamos una cinética de crecimiento de las cepas silvestres de EHEC y de *C. rodentium* que portan el pKK*nleB2*, y tomamos muestras para ensayar la actividad de CAT en distintos puntos de la curva (3, 6, 9, 12 y 24 h) y en condiciones de crecimiento estático y en agitación, tal como se menciona en los párrafos superiores. Con este experimento concluimos que la fusión *nleB2* es activa en los fondos silvestres, lo que nos indicó que la fusión contiene un promotor activo, y que la expresión de la fusión no depende de la fase de crecimiento (datos no mostrados). Con base en este ensayo decidimos analizar la actividad de las fusiones en la fase de crecimiento exponencial tardío (a una D. O₆₀₀= 0.8 y 1, aproximadamente a las 9 h de crecimiento en condiciones estáticas o de agitación, respectivamente), ya que en esta fase la fusión alcanza los niveles de expresión más elevados.

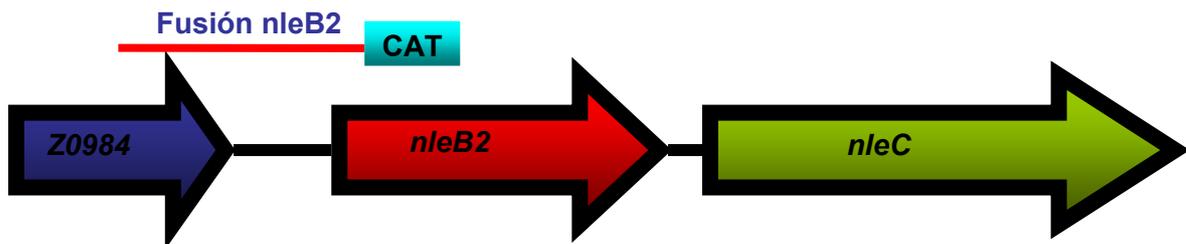


Figura 12. Representación esquemática de la fusión *nleB2*. Esta fusión abarca parte de la región estructural tanto del gen *nleB2*, así como del gen que le precede, *Z0984*.

VI. 2 Análisis de la región promotora de *nleB2*

VI.2.1 Determinación del inicio de la transcripción e identificación del promotor 1 (P1) del gen *nleB2*

Con la finalidad de identificar el promotor del gen *nleB2* decidimos determinar el sitio de inicio de la transcripción de dicho gen. Para este fin realizamos experimentos tipo “Primer Extension” (PE) (como se describe en materiales y métodos) a partir de ARN de las cepas silvestres de EHEC y *C. rodentium* que portan el pKK*nleB2* crecidas en DME. Con estos experimentos determinamos que el sitio de inicio de la transcripción del gen *nleB2* corresponde a una T (Figura 13A) que se sitúa a 48 pb corriente arriba del ATG. Corriente arriba del +1 encontramos un hexámero correspondiente a una secuencia -10 consenso (TATAAT) para promotores dependientes de σ^{70} (Dorman y Smith, 2001) (Figura 13A y B) y a 21 pb corriente arriba de este hexámero encontramos una probable caja -35 que contiene solo 3 (TGGAGG) de los 6 nucleótidos que caracterizan al consenso.

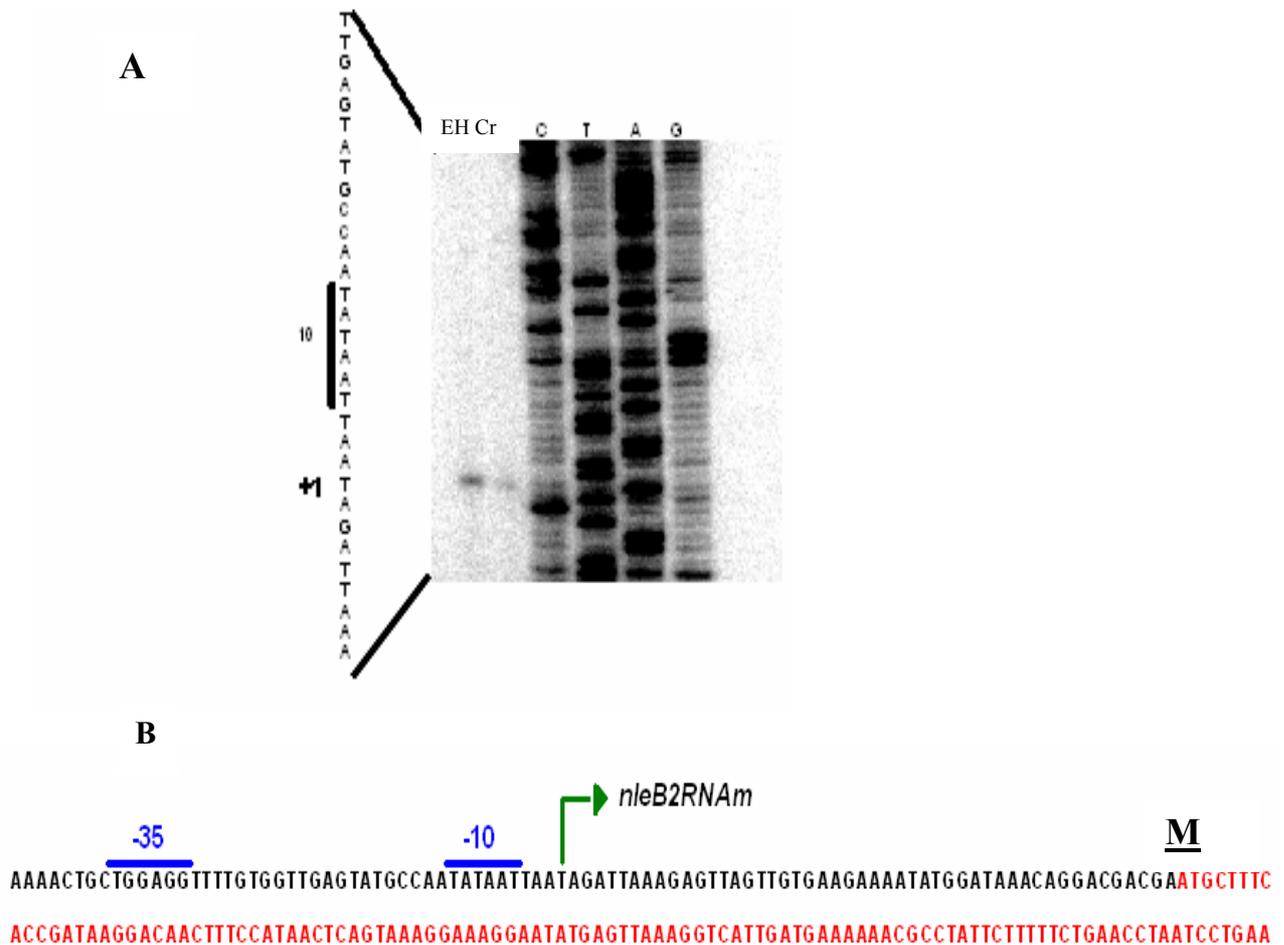


Figura 13. Identificación del inicio de la transcripción de *nleB2*. A) Análisis por PE del promotor de *nleB2*. El ARN total fue obtenido de las cepas EHEC y *C. rodentium* conteniendo el pKKnleB2 (fusión silvestre), crecidas en DMEM a una D. O₆₀₀ = 1. B) Secuencia nucleotídica de la región promotora de *nleB2*, se señala el promotor identificado, el inicio de la transcripción (+1), así como el inicio de la traducción de *nleB2* (M).

En un estudio realizado de manera simultánea en nuestro laboratorio, se determinó que la expresión del gen *nleH1* de EHEC depende de una secuencia inversa repetida (SIR) de ~30 pb localizada corriente arriba del promotor de dicho gen (Téllez *et al.*, 2005; datos no publicados). En el genoma de EHEC, *nleH1* se encuentra organizado en forma de operón con *nleF*, cuyo producto (non-LEE encoded effector F) fue identificado en el estudio realizado por Deng y colaboradores (2004). El elemento SIR se localiza a 60 pb corriente arriba del ATG de *nleH1*. Con este antecedente realizamos una búsqueda del SIR en la región promotora de *nleB2* e identificamos una secuencia homóloga. Posteriormente, realizamos un alineamiento de las regiones promotoras de *nleH1* y *nleB2* para determinar el grado de conservación entre ambas regiones promotoras (Figura 14). Como se puede observar en el alineamiento, no solo el SIR está conservado entre *nleB2* y *nleH1*, sino también el promotor y el +1 identificado en *nleH1*, que en este caso corresponde a una G. Sin embargo, la región promotora de

nleH1 no conserva el promotor identificado en *nleB2*. Por el grado de conservación de estas regiones, pensamos que el promotor identificado para *nleH1* podría también ser funcional para *nleB2*. Así entonces, proponemos que el único promotor identificado para *nleH1* es un segundo promotor para *nleB2* y fue nombrado P2. El P2 se localiza a 110 pb corriente arriba del ATG de *nleB2* y se encuentra separado de P1 por 45 pb e inmediatamente debajo del SIR (Figura 14).

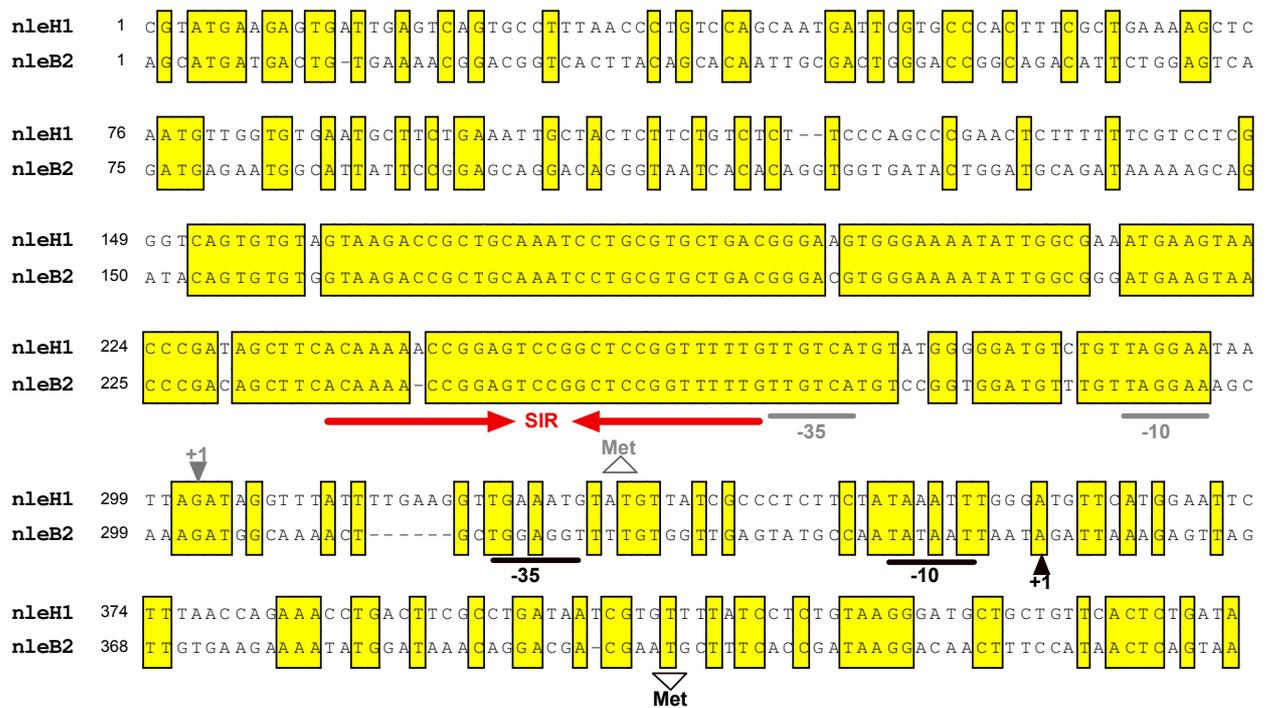


Figura 14. Alineamiento de las regiones promotoras de *nleH1* y *nleB2*. En este alineamiento se muestran el SIR, P1 y P2, así como los inicios de la transcripción para P1 de *nleB2* y para *nleH1*, así como el codón de inicio de ambas proteínas.

VI. 2.2 Análisis de los promotores Identificados

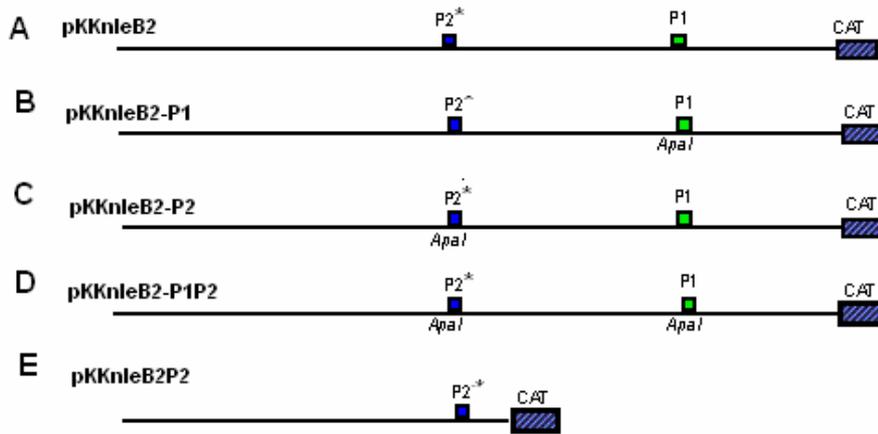
Una vez determinado el sitio de inicio de la transcripción (+1) de *nleB2*, así como el hexámero correspondiente a la caja -10 (P1) mediante experimentos de PE, y de proponer la existencia de un segundo promotor (P2) en base al alineamiento que demuestra la conservación de la región promotora entre *nleB2* y *nleH1*, decidimos confirmar la funcionalidad de estos elementos. Para tal fin, construimos a partir del pKKnleB2, una fusión en la que generamos una mutación sitio-específica de la caja -10 identificada por PE en P1, sustituyendo el hexámero por un sitio de restricción *Apal* (GGCCCC). La fusión resultante, *nleB2*-P1 (contenida en el pKKnleB2-P1) fue evaluada en las cepas silvestres de EHEC, *C. rodentium* y MC4100 crecidas en DMEM en condiciones estáticas y en agitación. Como se puede observar en la figura 15 (inciso

B), el nivel de expresión de la fusión *nleB2*-P1 disminuye de manera drástica en los tres fondos genéticos en ambas condiciones con respecto a la fusión silvestre (*pKKnleB2*) (Figura 15, comparar A y B). Con base en los resultados generados por el *pKKnleB2*-P1 podemos decir que el promotor identificado, nombrado P1, es funcional, sin embargo, la actividad que genera *pKKnleB2*-P1, aún cuando es muy baja, nos indicaba que dicha actividad era debida tal vez a la actividad de P2. Por lo anterior, nos dimos a la tarea de construir la fusión *nleB2*-P2 en la cual introducimos, mediante una mutación sitio-específica, un sitio de restricción *ApaI* (GGGCC) que sustituye a la caja -10 del P2, generando el *pKKnleB2*-P2. La actividad del *pKKnleB2*-P2 fue evaluada en las cepas silvestres de EHEC, *C. rodentium* y MC4100 crecidas en DMEM en condiciones estáticas y en agitación. Como se puede observar en la figura 15 (inciso C), los niveles de expresión del *pKKnleB2*-P2 disminuyeron con respecto a los niveles de la fusión silvestre (*pKKnleB2*) (Figura 15, comparar incisos A y C). Sin embargo, esta reducción no es tan drástica como la que se observa cuando mutamos P1 (Figura 17, comparar incisos B y C) en cualquiera de las condiciones evaluadas. Estos resultados nos sugieren que el P2 también es funcional para la expresión del gen *nleB2*.

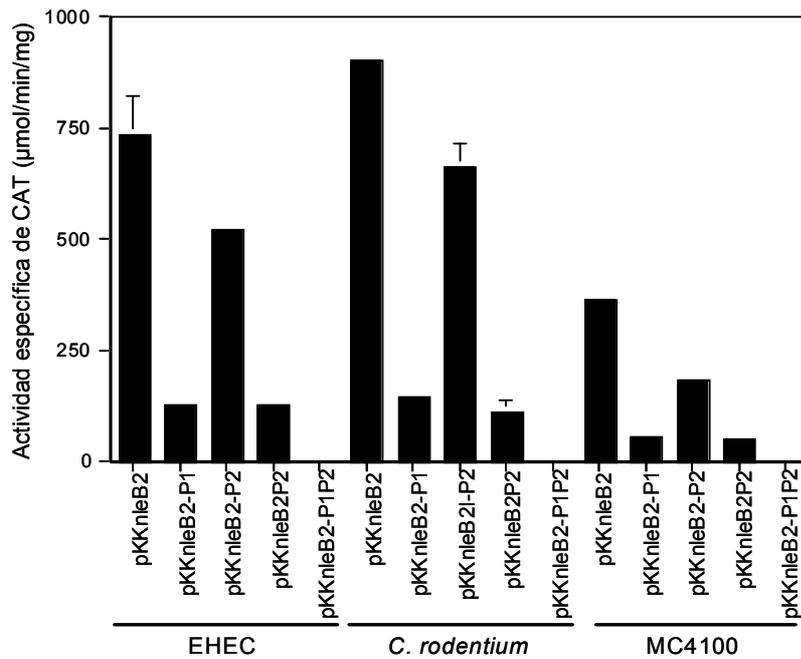
Siguiendo con el análisis de P2, construimos una fusión que contiene solo a P2 y al SIR (el análisis de este último elemento se presenta más adelante), y en la cual se elimina a P1 y 35 pb de la región que existe entre P1 y P2 (ver esquema de la figura 15 correspondiente al inciso E). La actividad de la fusión resultante *nleB2*P2, contenida en el *pKKnleB2*P2, fue evaluada en las cepas silvestres de EHEC, *C. rodentium* y MC4100 crecidas en DMEM en condiciones estáticas y en agitación. Los niveles de expresión que generó ésta fusión disminuyen drásticamente en ambas condiciones y en los tres fondos evaluados con respecto a la fusión silvestre, *pKKnleB2* (Figura 15). Dichos niveles son similares a los niveles generados por el *pKKnleB2*-P1, mutante en P1, en los tres fondos genéticos y en ambas condiciones (Figura 15). Estos resultados nos confirman que el P2 es funcional para la expresión del gen *nleB2*, dado que en el *pKKnleB2*P2, se eliminó a P1 y aún así vemos que la fusión es activa.

Aún cuando la fusión contenida en el *pKKnleB2*P2 nos deja claro que P2 participa en la transcripción de *nleB2*, construimos otra fusión en la que, mediante mutagénesis sitio-específica, realizamos cambios de las cajas -10 de ambos promotores (P1 y P2) por sitios de restricción *ApaI*. La actividad de la fusión resultante, contenida en el *pKKnleB2*-P1P2, fue evaluada en las cepas silvestres crecidas en las condiciones antes mencionadas. Cuando las cepas son crecidas en condiciones estáticas, la actividad

de la fusión desaparece por completo en los tres fondos evaluados (Figura 15, inciso D; comparar con inciso A). Sin embargo, cuando las cepas son crecidas en condiciones de agitación, se observan niveles de expresión muy bajos (Figura 15, inciso D; comparar con inciso A), los cuales probablemente se deben a una actividad de fondo vista únicamente en condiciones de agitación. En conjunto, los resultados presentados nos permiten afirmar que la expresión de *nleB2* depende de dos promotores (P1 y P2) y que es P1 más activo que P2.



F Estático



G Agitación

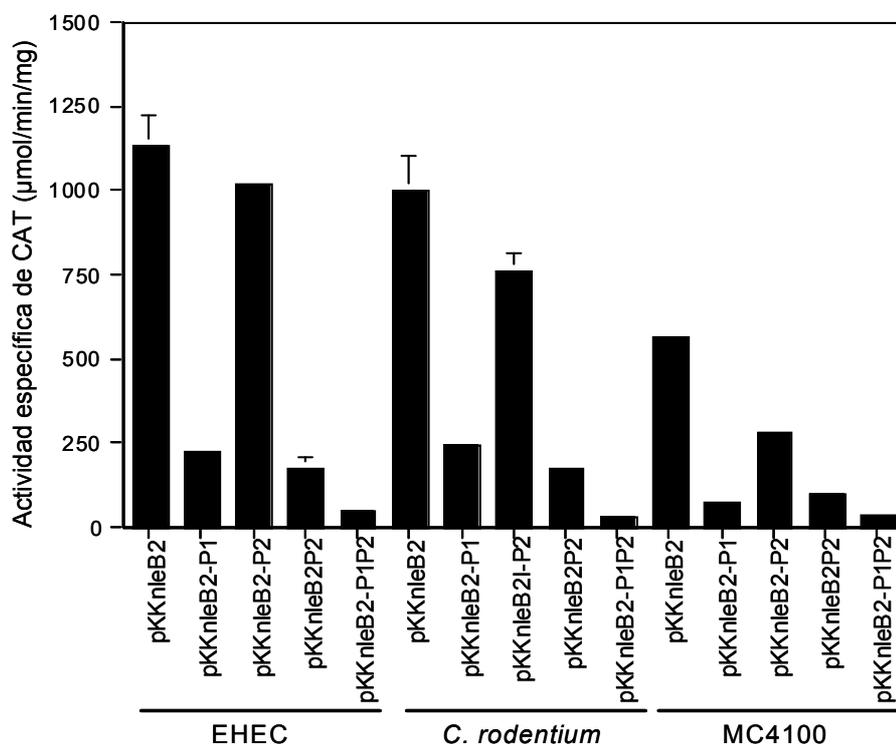


Figura 15. Análisis de los promotores (P1 y P2) de *nleB2*. A-E) Representación esquemática de las fusiones construidas a partir del pKKnleB2 (los detalles de las construcciones están descritas en el texto). F) Actividad de las fusiones en cepas crecidas en DMEM en condiciones estáticas (D. $O_{600} = 0.8$). G) Actividad de las fusiones en cepas crecidas en DMEM en condiciones de agitación (D. $O_{600} = 1$). Estos experimentos fueron realizados por duplicado en tres experimentos independientes.

VI.2.3 Papel del SIR en la transcripción de *nleB2*

Hasta este momento hemos analizado el papel de los promotores en la transcripción de *nleB2* y hemos visto que ambos son funcionales, aunque aparentemente P1 es un promotor más fuerte en comparación con P2. Como se mencionó en párrafos anteriores, lo que nos llevó a proponer la existencia de P2 fue el alineamiento de las secuencias promotoras de *nleH1* y *nleB2* (Figura 14). Sin embargo, hay que mencionar que el alineamiento se realizó en un principio para ver el grado de conservación de la secuencia inversa repetida (SIR) que previamente se había identificado en el estudio de la transcripción de *nleH1* (Télez *et al.*, 2005, datos no publicados). Para el caso del gen *nleB2*, el SIR se sitúa a 135 pb del ATG, a 75 pb de P1 e inmediatamente arriba de P2. Para evaluar el papel del SIR en la transcripción de *nleB2*, construimos una fusión contenida en el plásmido pKKnleB2IRm, la cual contiene un par de mutaciones realizadas nuevamente por mutagénesis sitio-específica en los extremos del SIR. Dichas mutaciones consisten en sustituir las regiones de identidad del SIR por sitios de

restricción, en un extremo el sitio *SalI* (GTCGAC) y en el otro extremo *XhoI* (CTCGAG) con lo cual la secuencia del SIR se sustituye de ACAAAAACCGGAGTCCGGCTCCGGTTTTTGT por ACAAAGTCGACAGTCCGGGCTCCTCGAGTTGT (en negritas se resaltan los sitios de restricción). La actividad del plásmido resultante, pKKnleB2IRm, fue evaluada en las cepas silvestres de EHEC, *C. rodentium* y MC4100 crecidas en las condiciones antes mencionadas. Como se muestra en la figura 16 (inciso B), la actividad generada por el pKKnleB2IRm se desaparece totalmente en los tres fondos genéticos evaluados en las condiciones de crecimiento. Este resultado demuestra que el SIR es indispensable en la transcripción de *nleB2*.

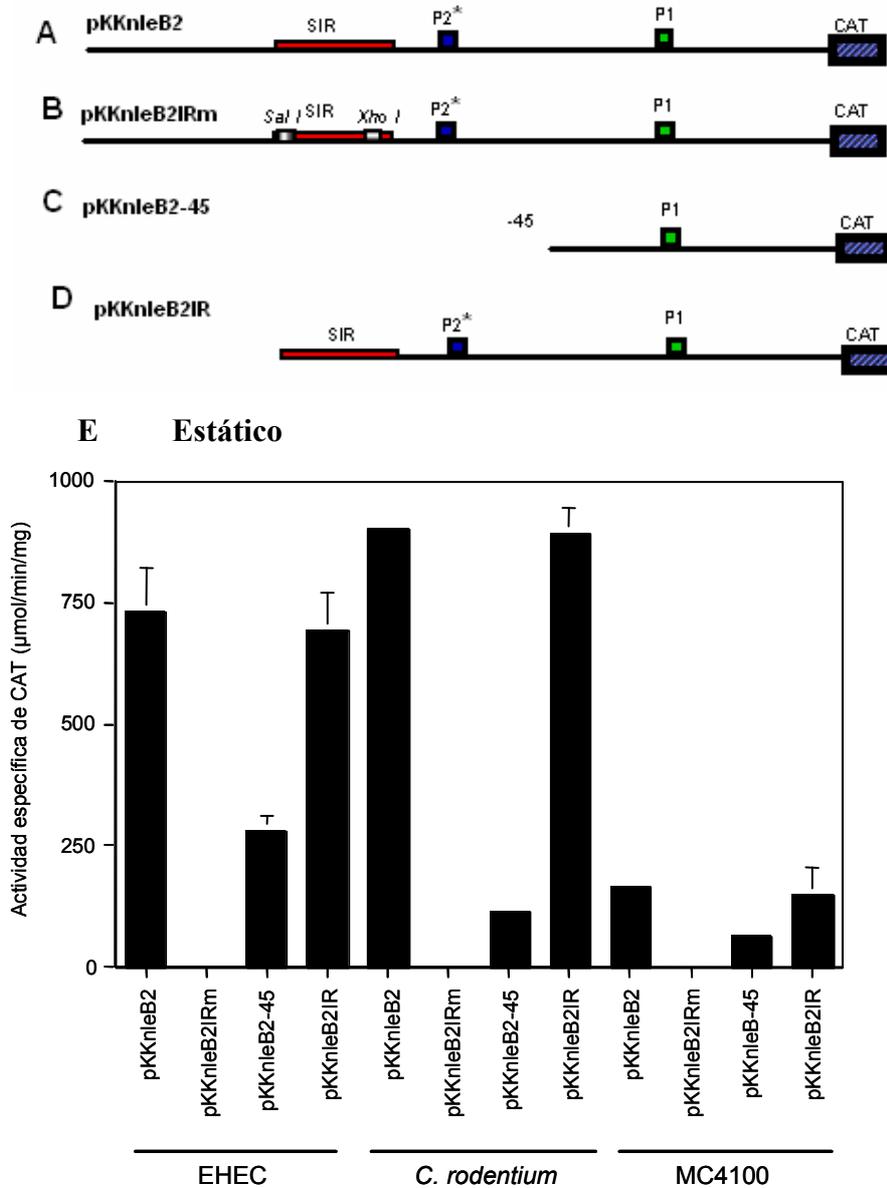
VI.2.4 Probables elementos de regulación negativa entre P1 y P2 de *nleB2*

Como se mencionó en el experimento anterior, la introducción de cambios en los extremos que definen la identidad del SIR afecta la transcripción de *nleB2*. Con la finalidad de hacer una evaluación más completa del SIR, decidimos eliminar a este elemento junto con P2, que es proximal al SIR haciendo un recorte en la posición -45 con respecto al inicio de la transcripción de *nleB2*. La fusión resultante, nleB2-45, contenida en el pKKnleB2-45 se utilizó para transformar los fondos silvestres de EHEC, *C. rodentium* y MC4100. La actividad de esta fusión fue evaluada a partir de cultivos de las cepas en DMEM en las condiciones de crecimiento antes mencionadas. Debemos mencionar que en un principio esperábamos que la fusión resultante fuese inactiva dado que eliminamos a dos elementos importantes ya descritos, P2 y SIR. Sin embargo, como puede observarse en la figura 16, los niveles de expresión del pKKnleB2-45 son significativos con respecto a los niveles que se presentan en el pKKnleB2 (figura 16, incisos A y C). Los datos arrojados por la fusión nleB2-45 nos hacen pensar que existen regiones de regulación negativa entre P1 y P2 y que al realizar este recorte estamos eliminando dichas regiones permitiendo que la fusión nleB2-45 alcance los niveles observados.

VI.2.5 Análisis de la región corriente arriba del SIR

Hasta el momento hemos descrito la importancia de cada uno de los promotores así como del SIR en la regulación de la transcripción de *nleB2*. En una exploración hacia el extremo 5' de la región promotora de *nleB2* en busca de otros elementos que pudieran estar participando en la regulación de dicho gen, realizamos un recorte a 10 pb corriente arriba del SIR generando la fusión nleB2IR (pKKnleB2IR). Esta fusión

contiene los tres elementos descritos en este trabajo, es decir, P1, P2 y el SIR. La actividad del pKKnleBIR fue evaluada en las cepas silvestres de EHEC, *C. rodentium* y MC4100 crecidas en DMEM en las condiciones antes descritas. Como puede verse en la figura 16, la actividad del pKKnleB2IR alcanzó niveles de expresión similares a los que presenta la fusión silvestre (pKKnleB2) (Figura 16, inciso A y D) en los tres fondos genéticos y en ambas condiciones de crecimiento. Con base en estos resultados podemos decir que hacia el extremo 5' de la región promotora de *nleB2*, más allá del SIR, no existen otros elementos que pudieran participar en la transcripción de dicho gen.



F Agitación

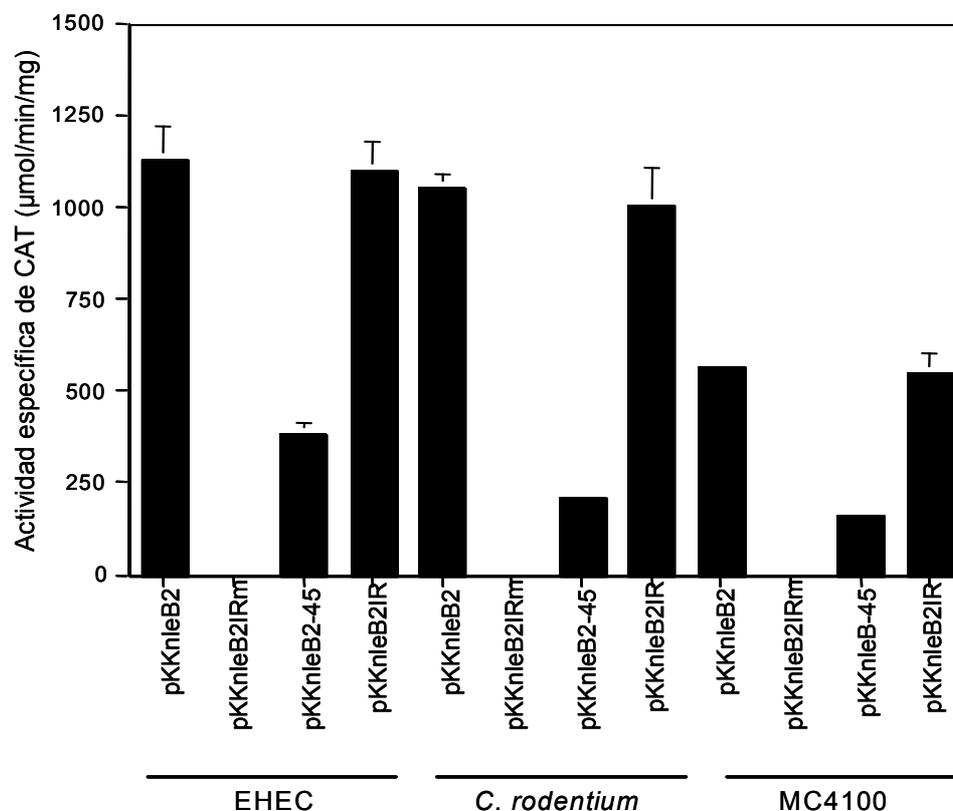


Figura 16. Análisis de la secuencia inversa repetida (SIR) de *nleB2*. A-D) Representación esquemática de las fusiones construidas a partir del pKKnleB2 (los detalles de las fusiones están descritas en el texto). E) Actividad de las fusiones en cepas crecidas en DMEM en condiciones estáticas (D. $O_{600} = 0.8$). F) Actividad de las fusiones en cepas crecidas en DMEM en condiciones de agitación (D. $O_{600} = 1$). Estos experimentos fueron realizados por duplicado en tres experimentos independientes.

VI.3 El SIR es un elemento que se encuentra conservado en distintas regiones del genoma de diferentes bacterias patógenas

Después de analizar el papel del SIR en la transcripción de *nleB2* y encontrar que este elemento es necesario para la óptima expresión de *nleB2*, y retomando la gran conservación observada en el alineamiento de las secuencias promotoras de *nleB2* y *nleH1* (Figura 14), nos preguntamos si el SIR se localizaba en algunas otras regiones del genoma de EHEC EDL933. Para este fin analizamos el genoma de EHEC por medio del programa BLASTn, utilizamos en particular la sección de “Search for short nearly exact matches” en la base de datos del NCBI. Producto de este análisis, se encontró que el SIR se localiza en distintas regiones del genoma de EHEC. Normalmente, el SIR se encuentra en regiones intergénicas corriente arriba de un marco de lectura, como es el caso de *nleB2* y *nleH1*, o entre dos marcos de lectura codificados convergentemente. En los diez casos donde el SIR se localiza corriente arriba de un marco de lectura (Figura

17 y Tabla 5), este elemento se encuentra inmerso en una región de aproximadamente 200 pb altamente conservada que mantiene, además, el promotor descrito para *nleH1* o el P2 para *nleB2* (Figura 17). Como puede observarse en el alineamiento múltiple de la figura 17 (página 43), la identidad de las distintas regiones se pierde hacia los extremos 5' y 3' con respecto al SIR. Por otra parte, cuando el SIR se encuentra entre dos genes codificados convergentemente, únicamente se conservan los ~30 nucleótidos de la secuencia inversa repetida. Los genes asociados al SIR, en su mayoría, se encuentran codificados en regiones conocidas como islas O (36, 45, 57, 108 y en la región hipervariable CP-933R) que no están representadas en el genoma de *E. coli* K12. Algunas de estas islas tienen más de un gen asociado al SIR, por ejemplo, las islas 57, 36 y 71. Resulta por demás interesante que la mayoría de los genes identificados están relacionados con virulencia (Tabla 5). En el caso de los genes que poseen el SIR corriente arriba encontramos varios de los genes que codifican proteínas del grupo de las Nle's identificadas por Deng y colaboradores (2004) (*nleH1*, *nleH2*, *nleB2* y 5 homólogos a *nleG*). En estos casos, el SIR se localiza, en términos generales, a dos tipos de distancias del ATG de las proteínas de interés, alrededor de 70 nucleótidos, como es el caso de *nleH1*, o alrededor de 120 nucleótidos como en *nleB2*. En el grupo de genes que tienen el SIR localizado corriente abajo también encontramos genes asociados a virulencia, como los dos homólogos a *espF* (*Z3085* y *Z1385*).

Tabla 5. Reiteraciones del SIR en el genoma de *E. coli* O157:H7 EDL933.

ORF (gen)	Función*	Localización	Posición SIR-ATG (n)
Corriente arriba			
Z0985 (<i>nleB2</i>)	Type III translocated effector	Isla O 36	134
Z0989 (<i>nleH2</i>)	Type III translocated effector	Isla O 36	64
Z1485	Hypothetical unknown protein	Isla O 45	4
Z2075 (<i>nleG</i>)	Type III translocated effector	Isla O 57	116
Z2076	Hypothetical unknown protein	Isla O 57	62
Z2149 (<i>nleG</i>)	Type III translocated effector	Isla O 57	70
Z6021 (<i>nleH1</i>)	Type III translocated effector	Isla O 71	63
Z6025 (<i>nleG</i>)	Type III translocated effector	Isla O 71	114
Z3921 (<i>nleG</i>)	Type III translocated effector	Isla O 108	61
Z2339 (<i>nleG</i>)	Type III translocated effector	FC-933R***	70
Corriente abajo**			
Z4594 (<i>degS</i>)	Protease	Esqueleto	19
Z4595 (<i>mdh</i>)	Malate dehydrogenase		19
Z1383	Hypothetical unknown protein	Isla O 44	309
Z1385	EspF like protein		82
Z1819	Putative tail component	Isla O 50	100
Z1821	Hypothetical unknown protein		310
Z3072 (<i>espFu</i>)	Type III translocated effector	Isla O 79	83
Z3073	Hypothetical unknown protein		13
Z3305	Din like protein	Isla O 93	325
Z3306	Hypothetical unknown protein		12

*La función está dada por la anotación correspondiente en la base de datos del NCBI.

** Entre dos genes codificados convergentemente

***Fago críptico

De la misma manera que en el caso del genoma de EHEC, analizamos genomas bacterianos completamente secuenciados y genomas cuya secuencia se encuentra en proceso de secuenciación, para saber si también presentan elementos similares al SIR. Como puede verse en la tabla 6, el SIR no solo está presente en genes de EHEC, sino también está asociado a genes de otras bacterias como *C. rodentium* y EPEC (patógenos AE), así como *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri* en distintas posiciones con respecto a un gen (Tabla 6).

Tabla 6. Distribución del SIR en distintos genomas bacterianos.

Bacteria	ORF (gen)	Función	Posición
<i>C. rodentium</i>	<i>nleH</i>	Type III translocated effector	Corriente arriba
	<i>sopA</i>	Secreted effector protein	Corriente arriba
	<i>nleB</i>	Type III translocated effector	Corriente arriba
	<i>nleG</i>	Type III translocated effector	Corriente arriba
	<i>nleG</i>	Type III translocated effector	Corriente arriba
<i>E. coli</i> EPEC	<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase	Corriente arriba
	<i>nleH</i>	Type III translocated effector	Corriente arriba
	<i>nleH</i>	Type III translocated effector	Corriente arriba
	<i>nleB</i>	Type III translocated effector	Corriente arriba
	<i>nleG</i>	Type III translocated effector	Corriente arriba
	<i>nleG</i>	Type III translocated effector	Corriente arriba
	*Orf_294	Hypothetical unknown protein	Corriente arriba
<i>E. coli</i> K12	<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase	Corriente abajo
<i>E. coli</i> UPEC	<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase	Corriente abajo
<i>S. enterica</i> Typhi	STY4192	Hypothetical unknown protein	Corriente abajo
<i>S. flexneri</i> 2457T	<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase	Corriente abajo
<i>S. flexneri</i> 301 pCP301	<i>mdh</i>	Malate dehydrogenase	Corriente abajo
	CP0209	Hypothetical unknown protein	Corriente abajo

*Epath186e03_q1kz_ORF_294, homólogo al orf Z1485 codificado por el fago BP-933W en EHEC.

VI. 4 Papel de los reguladores Ler y GrlA en la regulación de *nleB2*

La expresión de los genes codificados en el LEE, incluyendo a los 5 efectores, se abate en los fondos mutantes *ler* (Sperandio *et al.*, 2000; Bustamante *et al.*, 2001) y *grlA* (Deng *et al.*, 2004). Para evaluar el papel de los reguladores Ler y GrlA en la expresión de *nleB2*, utilizamos el pKKnleB2 para transformar las cepas mutantes *ler* y *grlA* de EHEC y *C. rodentium*, así como en la cepa de *E. coli* no patógena MC4100. Las cepas se crecieron en medio DME en las dos condiciones antes mencionadas y se analizó la actividad del reportero. Como puede observarse en la figura 18, en ninguna de las dos condiciones se encontró algún efecto provocado por las mutaciones en los reguladores Ler o GrlA, ni en *C. rodentium* ni en EHEC. Ciertamente, los niveles de expresión son mayores en condiciones de agitación (Figura 18A) en comparación con los niveles que se presentan en un crecimiento estático (Figura 18B). Como control, se utilizaron las cepas de *C. rodentium* silvestre, *ler* y *grlA* conteniendo la fusión LEE2, sin embargo por razones aún desconocidas para nosotros, la actividad de la fusión LEE2 en EHEC *ler* y *grlA* no se ve disminuida, por lo que no se utiliza como control, sin embargo, conviene mencionar que las mutantes de EHEC *ler* y *grlA* fueron evaluadas en ensayos de secreción y únicamente de esta manera se pudo comprobar el fenotipo de dichas cepas. Por lo anterior, los ensayos de complementación y sobreexpresión descritos más adelante solo fueron realizados en las mutantes *ler* y *grlA* de *C. rodentium*. La fusión control pLEE2, es un derivado del pKK32-8 que contiene un fragmento de 700 pb de la región promotora del operón 2 del LEE (promotor de *sepZ*) y que se emplea rutinariamente como control en nuestro laboratorio. En reportes anteriores se ha descrito que la fusión LEE2 en el fondo de *C. rodentium* silvestre alcanza niveles elevados de actividad ~7500 U, (Deng *et al.*, 2004) similares a los niveles que obtuvimos en nuestros ensayos. Asimismo, se sabe que la actividad del pLEE2 se reprime en los fondos mutantes *ler* y *grlA* (Sperandio *et al.*, 2000; Bustamante *et al.*, 2001; Deng *et al.*, 2004), como puede verse en la figura 18.

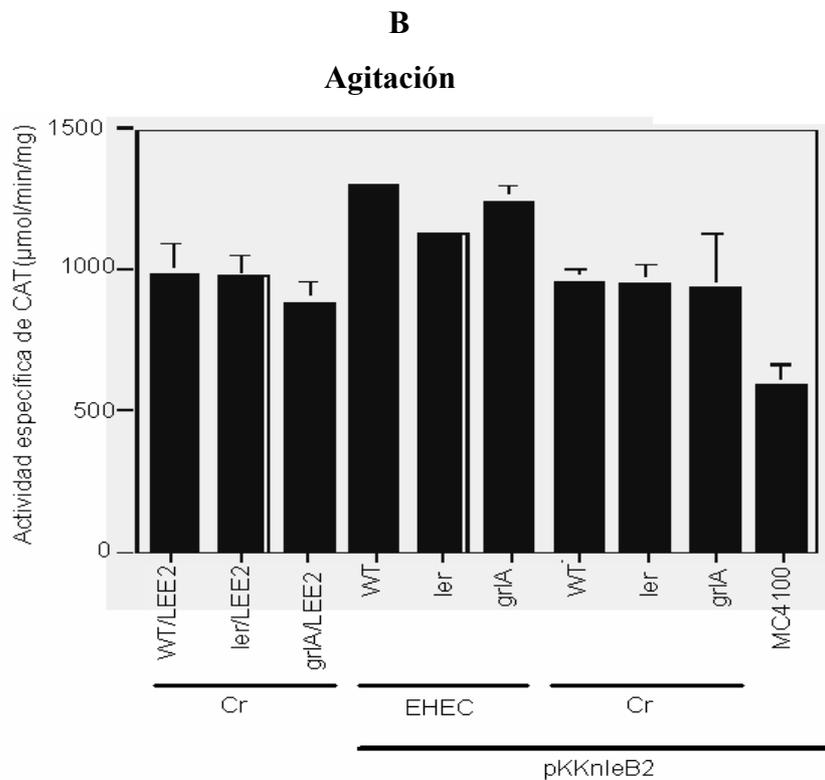
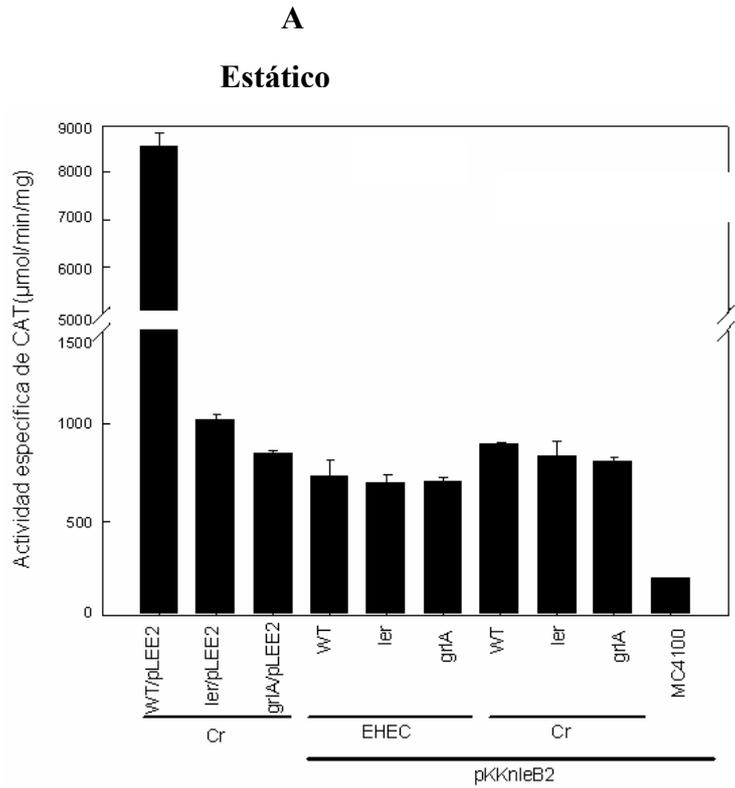


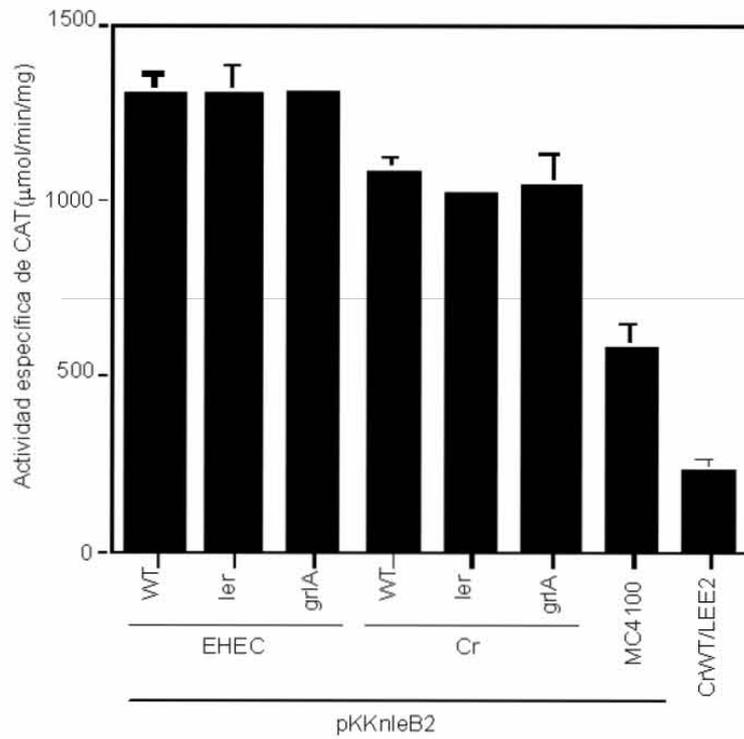
Figura 18. Papel de Ler y GrIA en la expresión de *nleB2*. Las cepas fueron crecidas en DMEM en condiciones estáticas (A) o en condiciones de agitación (B). La actividad de CAT fue evaluada a partir de muestras de cultivos a D. O₆₀₀ de 0.8 y 1.0 para los cultivos estáticos y agitados, respectivamente. En las graficas se muestran los resultados de tres experimentos independientes.

VI. 5 Expresión de la fusión *nleB2* en medio LB

Se ha demostrado previamente que la expresión de algunos de los factores de virulencia en EPEC es afectada por diferentes condiciones de crecimiento. En general, se ha visto que la expresión de los genes del LEE, que codifican para el SSTT y para las proteínas reguladoras, es óptima en medio de cultivo DME a 37° C y que se reprime en condiciones de crecimiento en medio de cultivo rico como el LB, o temperaturas mayores a 37° C, así como por concentraciones milimolares de amonio en el medio (Bustamante *et al.*, 1998; Martínez-Laguna *et al.*, 1999; Puente *et al.*, 1996). Para evaluar el papel del medio de cultivo en la regulación de la transcripción del gen *nleB2*, utilizamos las cepas del experimento anterior y las crecimos en medio LB (ver materiales y métodos) en condiciones estáticas o de agitación. Como se puede observar en la figura 19, los niveles de expresión son más elevados en los cultivos crecidos en agitación (Figura 19A) en comparación con los niveles observados en crecimientos estáticos (Figura 19B), al igual que lo observado en medio DME. Sin embargo, no pudimos observar algún efecto provocado por las mutaciones en los reguladores *ler* o *grlA* de EHEC o *C. rodentium* sobre la expresión del pKKnleB2. El control, la fusión pLEE2, corrobora los datos reportados previamente referentes a la represión ejercida por el medio LB sobre los genes del LEE (Figuras 19A y B) (Puente *et al.*, 1996). Tomando en cuenta las observaciones anteriores, podemos decir que la expresión de *nleB2* no está regulada por el medio de crecimiento, ya que los niveles de expresión en medio DME son muy parecidos a los niveles en medio LB en ambas condiciones de crecimiento.

Dentro de los experimentos reportados hasta este momento, una observación importante que pudimos hacer fue el hecho de que en ambas condiciones evaluadas, en medio DME o LB, la fusión *nleB2* se expresa en un fondo de *E. coli* no patógeno (MC4100). No obstante que los niveles de expresión en MC4100 son menores que los niveles que se observan en las cepas silvestres de EHEC o *C. rodentium*, esta actividad nos sugiere que existen elementos específicos para la expresión de *nleB2* que solo se encuentran en los fondos patógenos.

A
Agitación



B
Estático.

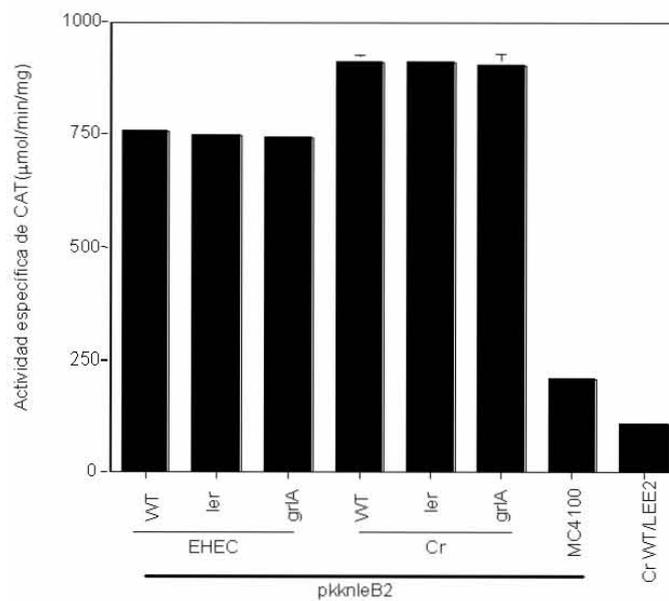


Figura 19. Papel del medio LB en la expresión de *nleB2*. Las cepas fueron crecidas en LB en condiciones de agitación (A) o en condiciones estáticas (B). La actividad de CAT fue evaluada a partir de muestras de cultivos a D. O₆₀₀ de 1.0 y 0.8 para los cultivos agitados y estáticos, respectivamente. En las graficas se muestran los resultados de tres experimentos independientes.

VI.6 Efecto de la sobreexpresión de Ler y GrlA sobre la transcripción de *nleB2*

Como se mencionó anteriormente, en el trabajo realizado por Deng y colaboradores (2004) se determinó que la sobreexpresión de GrlA (orf11), a partir de un vector multicopia en un fondo mutante de *C. rodentium* *sepL* o *sepD*, incrementa notablemente la secreción de efectores conocidos como Tir, pero también de nuevas proteínas colectivamente llamadas Nle's (Deng *et al.*, 2004). Sin embargo, el incremento antes mencionado puede ser debido al incremento del SSTT o al efecto directo sobre la transcripción de las Nle's. Para evaluar la segunda posibilidad, realizamos experimentos de sobreexpresión de Ler y GrlA, a partir de un vector multicopia, en cepas de *C. rodentium* que contienen al pKKnleB2, así como otros plásmidos derivados de éste y que se han presentado en experimentos previos. Como podemos observar en la figura 20, el nivel de actividad generado por la cepa silvestre de *C. rodentium* que contiene tanto el pKKnleB2 como a los plásmidos que expresan a Ler o a GrlA, aumenta de 2 a 3 veces, respectivamente. Para corroborar la funcionalidad de los plásmidos que sobreexpresan a los reguladores Ler y GrlA utilizados en nuestro experimento, utilizamos la fusión pLEE2, cuya actividad se sabe que se incrementa cuando se sobreexpresa a Ler y GrlA en *trans*. Como podemos ver en la figura 20, la expresión del pLEE2 se incrementa notablemente en presencia de los plásmidos que contienen a Ler o a GrlA, lo cual nos habla de que los plásmidos utilizados son funcionales y que los resultados obtenidos son confiables. Estos resultados demuestran que existe un efecto de la expresión en *trans* de Ler y GrlA sobre la transcripción de *nleB2*. Sin embargo, en los experimentos anteriores (Figura 13), cuando se evaluó la fusión silvestre, pKKnleB2, en los fondos mutantes *ler* o *grlA* de EHEC y *C. rodentium* no se observó ningún efecto. Esta aparente contradicción podría ser el resultado de la presencia de los dos promotores en *nleB2*, es decir, que quizás el efecto de Ler o GrlA se acentúa sobre uno de los promotores, mientras que el otro no se ve afectado. Para evaluar esta posibilidad, sobreexpresamos nuevamente Ler y GrlA en cepas de *C. rodentium* que contienen, por un lado, la fusión que lleva la mutación en P1 (pKKnleB2-P1) y por el otro, la fusión que lleva la mutación en P2 (pKKnleB2-P2). Cuando se expresa a Ler o GrlA en *trans* en cepas que portan al pKKnleB2-P1 (P2 activo), los niveles de actividad aumentan con respecto a la cepa que solo contiene al vector, en el que están clonados Ler o GrlA, alcanzando niveles similares a los que se generan cuando se sobreexpresa a Ler y GrlA en la cepa que tiene la fusión silvestre (pKKnleB2) (Figura 20). Sin embargo, cuando se repite el experimento con la cepa que

lleva el pKKnleB2-P2 (P1 activo), los niveles de actividad permanecen constantes. Estos resultados indican que Ler y GrlA tienen un efecto sobre la expresión generada a partir de P2. Lo anterior nos permite sugerir que la transcripción generada a partir de P1 nos impide ver algún efecto cuando evaluamos la expresión de la fusión silvestre (pKKnleB2) en los fondos mutantes de *C. rodentium* *ler* y *grlA*. Con el fin de comprobar la funcionalidad de ambos promotores en la transcripción de *nleB2* y para descartar la posibilidad de que hubiera otro promotor que pudiera estar respondiendo a la sobreexpresión de Ler o GrlA, realizamos la expresión en *trans* nuevamente de Ler y GrlA en la cepa que contiene la fusión en la que se han mutado los dos promotores P1 y P2 (pKKnleB2-P1P2). Como se puede observar en la figura 20, la fusión sigue siendo inactiva, lo que corrobora la funcionalidad de ambos promotores y descarta la posibilidad de que existan otros elementos que respondan a Ler o GrlA.

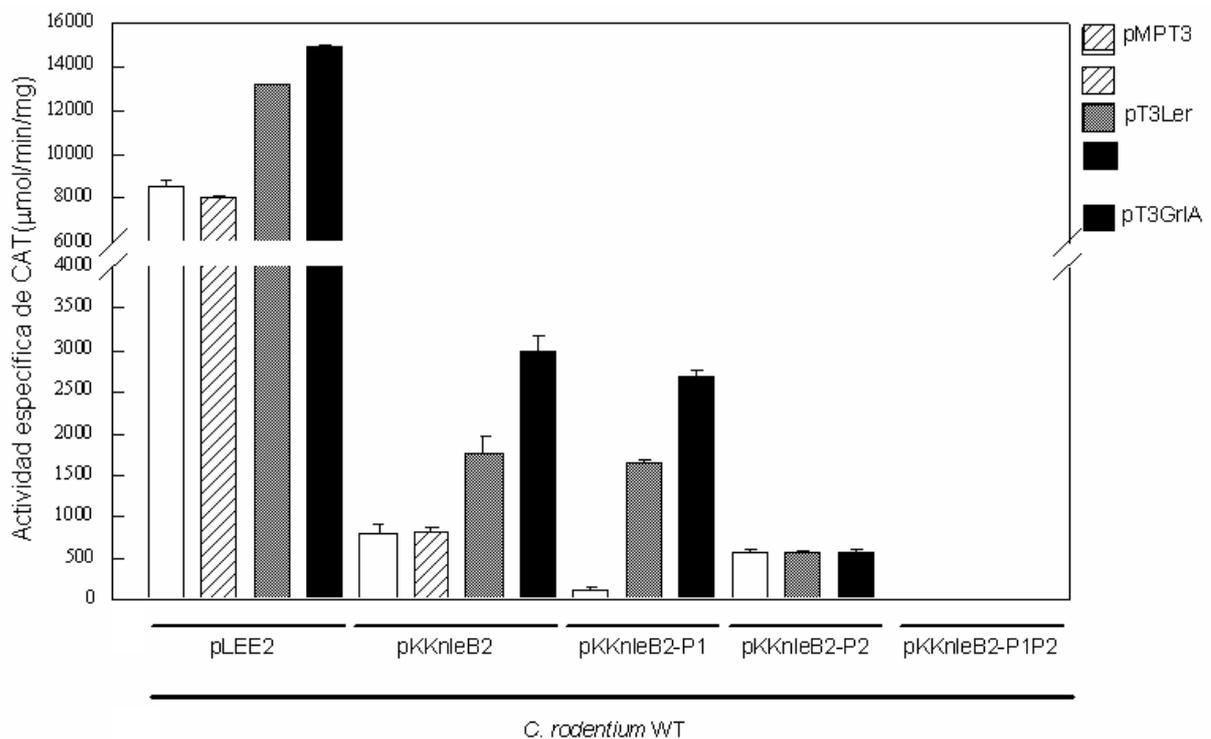


Figura 20. Efecto de Ler y GrlA sobre la expresión de *nleB2*. Las actividades fueron analizadas a partir de cultivos de las cepas silvestres de *C. rodentium* que contienen las diferentes fusiones y plásmidos que se expresan a Ler o a GrlA crecidas en DMEM a una D. O₆₀₀ de 0.8 en condiciones estáticas. Estos experimentos fueron realizados por duplicado en tres experimentos independientes.

VI.7 Actividad de P2 en los fondos mutantes de *C. rodentium* *ler* y *grlA*

Para confirmar el efecto de Ler y GrlA sobre la expresión a partir de P2, evaluamos la actividad de la fusión que solo tiene activo a P2, contenida en el

pKKnleB2-P1, en cepas de *C. rodentium* silvestre, mutantes *ler* y *grlA*. Como se puede observar en la figura 21, pKKnleB2-P1 disminuye sus niveles de actividad en los fondos mutantes *ler* y *grlA*, lo que nos habla del efecto que estos reguladores tienen sobre este promotor, de igual manera, en la grafica se muestran los niveles de expresión de la fusión silvestre en los fondos silvestre, *ler* y *grlA*, en los cuales no se ve efecto de los reguladores, sin embargo, no hay que olvidar que esta fusión lleva ambos promotores (P1 y P2), y que la actividad de P1 no responde a Ler ni a GrlA.

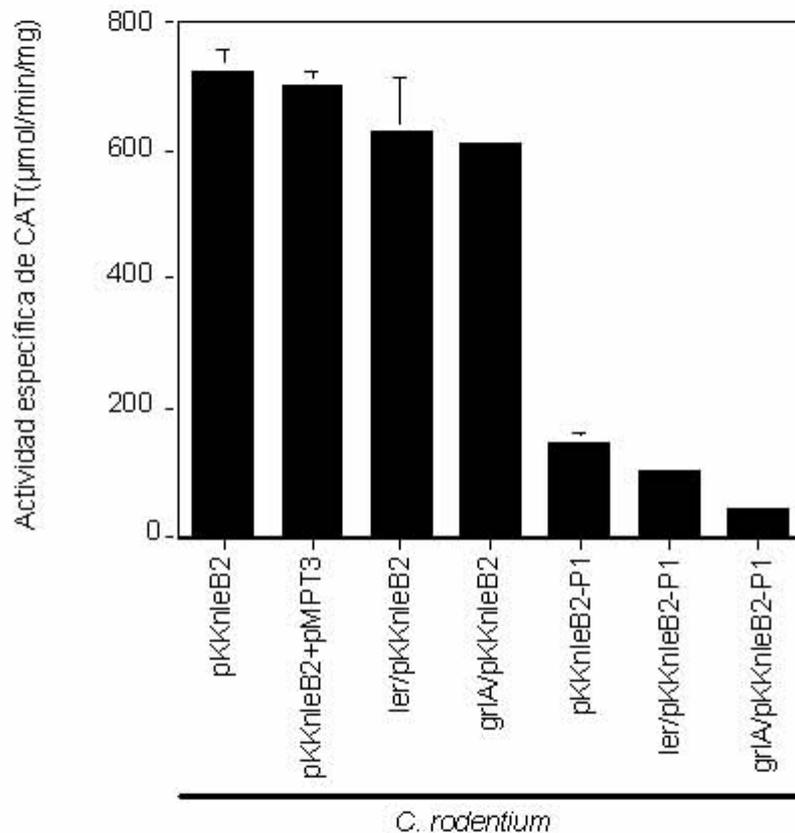


Figura 21. Efecto de Ler y GrlA sobre la expresión del P2 de *nleB2*. Las actividades fueron analizadas a partir de cultivos de las cepas de *C. rodentium* que contienen las diferentes fusiones y que fueron crecidas en DMEM a una D. O₆₀₀ de 0.8 en condiciones estáticas. Estos experimentos fueron realizados por duplicado en tres ocasiones independientes.

VI.8 El efecto de Ler y GrlA sobre la expresión de *nleB2* es indirecto

De acuerdo a los experimentos anteriores, hemos observado que P2 responde a la sobreexpresión de Ler y GrlA, mientras que P1 no responde. Con la finalidad de evaluar si la respuesta de P2 a Ler y a GrlA se debe a un efecto directo de estos reguladores sobre dicho promotor, introducimos el pKKnleB2 (fusión silvestre) en el fondo silvestre de *E. coli* MC4100, y evaluamos su expresión en presencia de Ler y GrlA. Como control, utilizamos la fusión pLEE2, de la cual se sabe que se expresa en

un fondo K12 en presencia de Ler (Figura 22). De acuerdo con los resultados obtenidos podemos concluir que aún cuando la expresión de *nleB2* en *C. rodentium* responde a Ler y GrlA a través de P2, el efecto que ejercen ambos reguladores no es directo, puesto que los niveles de expresión de la fusión silvestre (pKKnleB2) en el fondo silvestre de *E. coli* MC4100 permanecen constantes aún en presencia de Ler o GrlA (Figura 22). Lo anterior nos indica que existen elementos exclusivos de los fondos patógenos que participan por debajo de Ler y GrlA en la regulación transcripcional de *nleB2*.

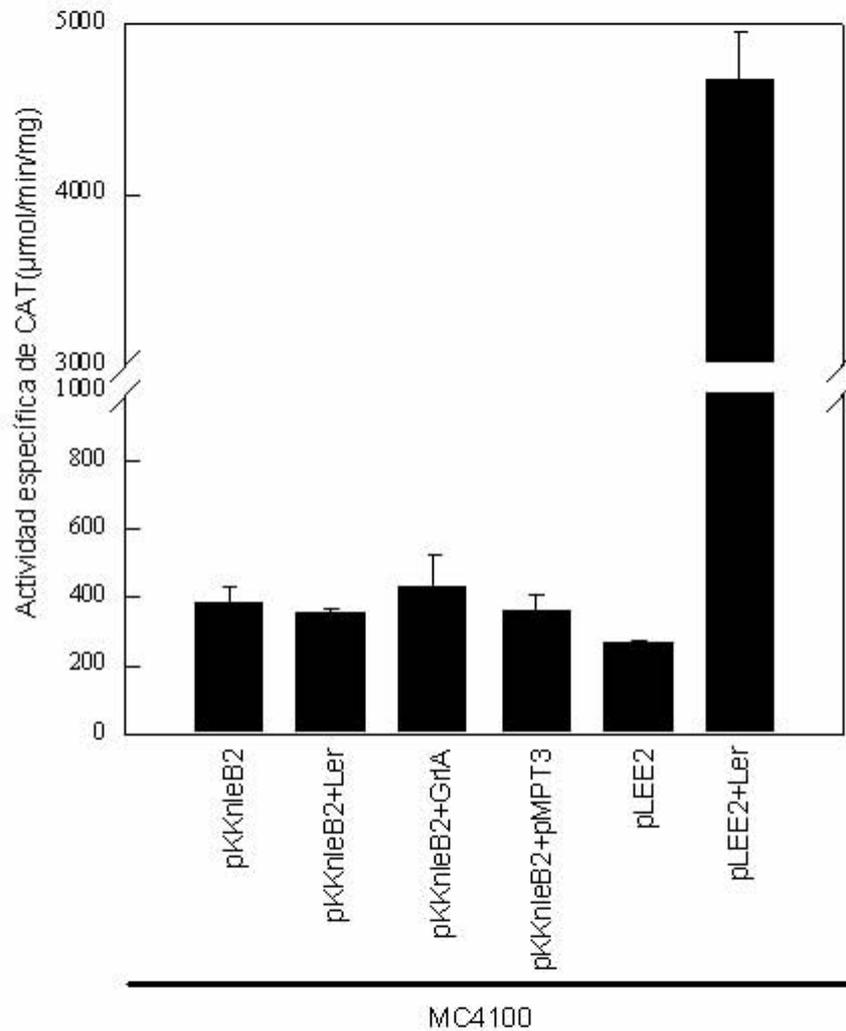


Figura 22. Efecto de Ler y GrlA sobre la expresión de *nleB2* en el fondo de *E. coli* no patógeno, MC4100. Las actividades de la cepa MC4100 que contienen las diferentes fusiones y los plásmidos que expresan a Ler y a GrlA fueron evaluadas a partir de cultivos crecidos en DMEM a una D_{600} de 0.8 en condiciones estáticas. Estos experimentos fueron realizados por duplicado en tres ocasiones independientes.

VII DISCUSIÓN

A la fecha se han publicado varios estudios donde se describe la existencia de proteínas efectoras codificadas en IP distintas al LEE. En, en un estudio realizado en colaboración con nuestro laboratorio se reportó que *C. rodentium* posee 7 nuevos efectores (NleA, B, C, D, E, F, G) codificados fuera del LEE (Deng *et al.*, 2004). Se desconoce la ubicación de los genes codificantes en el genoma de *C. rodentium*, sin embargo, homólogos a éstas proteínas están codificados en tres IP (O-36, O-71 y O-122) en el genoma de EHEC (Deng *et al.*, 2004). De estos efectores únicamente NleAEspI ha sido caracterizada (Gruenheid *et al.*, 2004). Hoy sabemos que: A) NleA se transloca y localiza en el aparato de Golgi de la célula infectada; B) NleA no se requiere para la formación de la lesión AE; y C) La mutante *nleA* de *C. rodentium* está altamente atenuada en el modelo de infección murino (Gruenheid *et al.*, 2004; Mundy *et al.*, 2004), sin embargo, resta por definir cual su función específica .

El interés de nuestro laboratorio se enfoca en entender cómo es que se lleva a cabo la regulación transcripcional de estos nuevos efectores En este trabajo presentamos el estudio de la regulación transcripcional del gen *nleB2* de EHEC. En el genoma de EHEC encontramos dos homólogos de la proteína NleB de *C. rodentium*, que se nombraron NleB1 y NleB2 (codificados en las IP O-36 y O-122, respectivamente). Estas proteínas presentan entre ellas un 60% de identidad y 74% de similitud. Además de EHEC, se han encontrado homólogos de NleB en las bacterias patógenas REPEC, EPEC y *S. typhimurium*. Recientemente se observó que la mutante *nleB* de *C. rodentium* está atenuada en el modelo de infección murino (J. L Puente, comunicación personal).

La mayoría de los trabajos de regulación transcripcional de los genes involucrados en la virulencia de los patógenos AE, se han centrado por un lado en el estudio de la expresión de los genes de la isla LEE, y por otro en la expresión del operón *perABC*, localizado en el plásmido EAF de EPEC. La suma de varios trabajos ha permitido concluir que el producto de *ler* regula de manera positiva la expresión de los genes del LEE, contrarrestando la represión ejercida por el regulador global H-NS sobre estos genes (Bustamante *et al.*, 2001; Sánchez-San Martín *et al.*, 2001; Barba *et al.*, 2005). También se sabe que Ler activa la expresión de genes codificados fuera del LEE, tal es el caso del gen *espC* que codifica una enterotoxina en EPEC (Mellies *et al.*, 2001).

Por otra parte, numerosos estudios en EPEC y EHEC han establecido que la expresión de *ler* obedece a un amplio conjunto de factores transcripcionales, tanto positivos (IHF, Fis, BipA, PerC, PerClike, QseA y GadX) como negativos (H-NS, Hha, YhiE, YhiF, EtrA, EivF y GrlR), que actúan de manera concertada. Entre estos factores podemos encontrar reguladores globales y particulares de los patógenos AE, que en algunos casos están codificados en el LEE o en otras IP. Finalmente, también se ha descrito que Ler se une a su propia región reguladora y autorreprime su transcripción en un evento dependiente de su propia concentración (Berdichevsky *et al.*, 2005).

Para estudiar la regulación transcripcional de *nleB2* construimos una fusión transcripcional de la región promotora de *nleB2* al gen reportero *cat*. La fusión, pKKnleB2 (Figura 12), contiene un fragmento que abarca la región intergénica (177 pb) entre el gen *Z0984* y *nleB2*, así como 60 pb hacia la región estructural tanto de *Z0984* como de *nleB2*. Elegimos éste fragmento de DNA en el entendido de que generalmente en bacterias las regiones intergénicas contienen los elementos requeridos para la óptima expresión de los genes. Inicialmente realizamos una cinética de actividad de las cepas silvestres de EHEC y *C. rodentium* que poseen la fusión y que fueron crecidas en agitación en DME a 37°C, así como en condiciones estáticas en una atmósfera al 5% de CO₂. Los niveles de actividad generados por las distintas cepas nos confirmaron que la fusión contiene un promotor activo y que su expresión no depende de la fase de crecimiento (datos no mostrados). Por experiencia de nuestro laboratorio sabemos que generalmente la expresión de los genes de EHEC y EPEC involucrados con la virulencia no depende de la fase de crecimiento y que el óptimo de expresión de estos genes se alcanza en la fase de crecimiento exponencial tardío en medio DME (Martínez-Laguna *et al.*, 1999; Bustamante *et al.*, 2001; Sánchez-San Martín *et al.*, 2001).

Después de confirmar que la fusión pKKnleB2 es activa en los fondos silvestres de EHEC y *C. rodentium*, identificamos, mediante la técnica de "Primer Extension" (PE), que el sitio de inicio de la transcripción de *nleB2* en ambos fondos patógenos corresponde a un residuo T que se encuentra a 48 pb corriente arriba del ATG (Figura 13). La determinación del +1 nos permitió identificar una secuencia promotora que consiste de una caja -10, idéntica a la secuencia consenso (TATAAT) de promotores tipo σ^{70} (Dorman y Smith, 2001), separada por 21 pb de una probable caja -35 (TGGAGG) que contiene solo 3 de los 6 nucleótidos de un -35 consenso (Figura 13). No obstante que la caja -10 es idéntica al consenso, podemos considerar que el promotor identificado no es fuerte ya que la probable caja -35 se encuentra localizada a

una distancia mayor de lo que dicta un promotor consenso σ^{70} (17 ± 1 pb) (Dorman y Smith, 2001). En *E. coli* se han reportado promotores dependientes de σ^{70} que tienen las cajas -10 y -35 separadas por más de 20 pb, incluso se han descrito algunos promotores que carecen totalmente de una caja -35, las cuales en algunos casos tienen una caja -10 extendida (TGNTATAAT) (Mitchell *et al.*, 2003). Sin embargo, el promotor que identificamos carece del dinucleótido (TG) característico de las cajas -10 extendidas.

En un estudio realizado en nuestro laboratorio de manera simultánea a éste trabajo, se describió que la expresión de *nleH1*, cuyo producto forma parte del grupo de las Nle's, requiere de una secuencia inversa repetida (SIR) de ~30 pb situada a 60 pb corriente arriba del promotor de dicho gen (Télez *et al.*, 2005; datos no publicados). Un alineamiento entre las secuencias promotoras de *nleH1* y *nleB2* nos permitió determinar que la región promotora de *nleB2* contiene el elemento SIR identificado en *nleH1*, pero además es evidente que existe un alto grado de conservación entre ambas regiones promotoras (Figura 14). Como se puede observar en el alineamiento de la figura 14, el promotor identificado en *nleH1* está conservado en *nleB2*, incluso también se conserva el nucleótido G que corresponde al +1 en *nleH1*. Este promotor está situado a 110 pb corriente arriba del ATG de *nleB2* y se encuentra a una distancia de 45 pb con respecto al promotor identificado por PE, e inmediatamente abajo del SIR (Figura 14). En conjunto estos datos nos sugirieron que el promotor identificado para *nleH1* podría ser funcional para *nleB2*. En este sentido, decidimos nombrar al promotor de *nleB2* previamente identificado por PE como P1 y al promotor identificado por el alineamiento como P2.

Para confirmar la funcionalidad de ambos promotores decidimos construir una serie de fusiones transcripcionales a partir de la fusión pKKnleB2, en las cuales sustituimos, mediante mutaciones sitio dirigidas, las cajas -10 de P1 y P2 por sitios de restricción (*ApaI*). Las actividades de las fusiones resultantes fueron evaluadas en los fondos silvestres de EHEC, *C. rodentium* y MC4100, a partir de cultivos mantenidos en condiciones estáticas o en agitación. Como se muestra en la figura 15, los niveles de expresión de las fusiones pKKnleB2-P1 (mutante -10 P1) y pKKnleB2-P2 (mutante -10 P2) disminuyen de manera consistente en los tres fondos genéticos, en ambas condiciones de crecimiento, con respecto a la actividad generada por la fusión silvestre (pKKnleB2). Sin embargo, comparativamente la reducción de los niveles de actividad generadas por la fusión pKKnleB2-P1, resulta más drástica que la disminución de actividad a partir la fusión pKKnleB2-P2. Lo anterior nos indica que ambos promotores

son funcionales y que por lo menos en las condiciones en que realizamos nuestros experimentos, el promotor P1 es más activo que el P2. Además, los niveles de actividad generadas por ambas fusiones de manera independiente son aditivos, es decir, si sumamos ambos niveles de actividad obtendremos niveles similares a los que produce la fusión silvestre (pKKnleB2). No obstante que los experimentos anteriores nos sugieren la existencia de un segundo promotor (P2) en la región reguladora de *nleB2*, no fuimos capaces de ver el transcrito generado a partir de este promotor en experimentos de PE. Además, el efecto de la mutación en el P2 podría interpretarse también como una mutación que alteró una región activadora de P1. Por estas razones decidimos generar la fusión pKKnleB2P2 en la que eliminamos totalmente el P1 y 35 pb de la región entre ambos promotores, dejando únicamente al P2 (Figura 15E). La actividad de esta fusión nos presenta niveles de expresión que disminuyen de manera drástica en los tres fondos genéticos analizados con respecto a la fusión completa (pKKnleB2) (Figura 15). De manera consistente, los niveles de expresión a partir del pKKnleB2P2 son similares a los niveles generados por la fusión pKKnleB2-P1 en los tres fondos genéticos cultivados en ambas condiciones (Figura 15). Estos resultados nos permiten confirmar la funcionalidad de P2. Los resultados anteriores nos confirman la participación de P1 y P2 en la transcripción de la fusión pKKnleB2, sin embargo, estos resultados no descartan la existencia de un tercer promotor en ésta región. Para descartar esta hipótesis generamos la fusión pKKnleB2-P1P2 que presenta las cajas -10 de ambos promotores sustituidas por sitios de restricción *ApaI*. La actividad de dicha fusión fue evaluada en los tres fondos genéticos utilizados en los experimentos anteriores cultivados en DMEM en condiciones estáticas o de agitación. Resulta evidente que la expresión del pKKnleB2-P1P2 se abate totalmente en los tres fondos evaluados, particularmente en las cepas crecidas estáticamente, mientras que en cultivos mantenidos en agitación se observan niveles de expresión muy bajos (Figura 15). Con base en estos experimentos proponemos que la fusión pKKnleB2 posee únicamente 2 promotores a partir de los cuales se transcribe *nleB2*.

Como se mencionó anteriormente, lo que nos llevó a proponer la existencia de P2 fue el alineamiento entre las secuencias promotoras de *nleH1* y *nleB2* (Figura 14). Sin embargo, hay que mencionar que el alineamiento se realizó en un principio para ver la conservación de la secuencia inversa repetida (SIR,) que previamente se había identificado en el estudio de la transcripción de *nleH1* (Téllez *et al.*, 2005, datos no publicados). Hemos mencionado que en *nleB2*, el SIR se sitúa a 135 pb del ATG y a 75

pb de P1 e inmediatamente corriente arriba de P2. Para evaluar el papel del SIR en la transcripción de *nleB2* generamos, a partir del pKKnleB2, la fusión pKKnleB2IRm que contiene un par de mutaciones en los extremos del SIR. Dichas mutaciones sustituyen parcialmente las regiones de identidad del SIR por sitios de restricción (*SalI* y *XhoI*) pero mantienen intacto a P2. La actividad de la fusión pKKnleB2IRm, evaluada en las cepas silvestres de EHEC, *C. rodentium* y MC4100 crecidas en DMEM en condiciones estáticas o en agitación, se abate totalmente en los tres fondos genéticos en ambas condiciones de cultivo (Figura 16). Estos resultados demuestran que el SIR es un elemento indispensable para la transcripción del gen *nleB2*. Lo anterior es consistente con los resultados obtenidos en el estudio de *nleH1*, en donde se observa que la mutación del SIR disminuye drásticamente, pero no abate totalmente como en *nleB2*, la transcripción de *nleH1*. Resulta interesante que en el caso de *nleB2*, que posee dos promotores, el SIR es un elemento esencial mientras que en *nleH1*, que solo tiene un promotor, el SIR no posee un papel tan contundente (Téllez *et al.*, 2005; datos no publicados). Nosotros pensamos que el SIR podría ser el sitio de pegado de una proteína activadora que facilita la transcripción y que consecuentemente en la fusión mutante este activador no se une al SIR y la transcripción no es posible. De manera interesante, éste probable activador también está presente en el fondo no patógeno MC4100.

Con el fin realizar una evaluación más completa de la región promotora de *nleB2*, decidimos construir un par de fusiones en las que se retiran distintas porciones hacia el extremo 5' de la región promotora de *nleB2*. En la fusión pKKnleB2IR realizamos un recorte a 10 pb corriente arriba del SIR de tal manera que mantenemos intactos los tres elementos descritos en este trabajo (P1, P2 y el SIR) pero retiramos toda la secuencia corriente arriba del SIR. La fusión pKKnleB2IR, evaluada en las cepas silvestres de EHEC, *C. rodentium* y MC4100 crecidas en DMEM en las condiciones antes descritas, alcanzó niveles de expresión similares a los que presenta la fusión silvestre (pKKnleB2) (Figura 16). Estos resultados sugieren que hacia el extremo 5' de la región promotora, más allá del SIR, no existen otros elementos que pudieran participar en la transcripción de *nleB2*, similar a lo que ocurre en el estudio de *nleH1* (Téllez *et al.*, 2005; datos no publicados). En la fusión pKKnleB2-45 retiramos toda la región río arriba a partir de la posición -45 con respecto al inicio de la transcripción de P1. En el alineamiento de la figura 14 podemos ver que las regiones promotoras de *nleB2* y *nleH1* son muy parecidas, sin embargo, la secuencia de *nleB2* contiene un promotor (P2) que no existe en *nleH1*. Para nuestra sorpresa la integridad del SIR es

necesaria para la expresión de *nleB2* a partir de ambos promotores. En este sentido nos preguntamos qué pasaría si eliminamos el SIR. Originalmente pensamos que si el SIR es un elemento esencial para la transcripción de *nleB2* era probable que la remoción de este elemento produjera una fusión inactiva. Sorprendentemente, aún cuando produce niveles de actividad reducidos, en comparación con la fusión pKKnleB2, podemos ver que la fusión pKKnleB2-4 es activa en las cepas silvestres de EHEC, *C. rodentium* y MC4100 (Figura 17). Estos datos indican que existen regiones de regulación negativa entre P1 y P2 y que posiblemente al eliminar dichas regiones permitimos que la fusión pKKnleB2-45 se exprese a partir de P1. Quizás esta región es un sitio de pegado de algún represor, el cual estaría también presente en el fondo no patógeno de *E. coli*.

Mediante un análisis computacional, identificamos que existen secuencias similares al SIR en otras regiones del genoma EHEC y de otras bacterias (Figura 17; Tablas 5 y 6). El alineamiento de la figura 17 muestra que tanto el SIR como el promotor identificado en principio para *nleH1* y que en el caso de *nleB2* definimos como P2, constituyen elementos muy conservados y generalmente localizados en regiones intergénicas asociados a distintos genes. En la mayoría de los casos encontramos estos elementos (SIR y promotor) localizados corriente arriba de un gen, es decir, en la región promotora, mientras que en otros casos encontramos únicamente el SIR, y no el promotor, en regiones intergénicas entre dos genes convergentes (Tabla 5 y 6). Pensamos que en el primer caso el SIR y promotor coordinan la expresión de estos genes, sin embargo, en el segundo caso desconocemos la función que tiene el SIR. La mayoría de los genes asociados al SIR se localizan en IP y codifican proteínas relacionadas con virulencia en EHEC, pero también en otros patógenos AE como *C. rodentium* y EPEC, así como en *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri* (Tabla 6). Para nuestra sorpresa encontramos que varios genes de EHEC que codifican para el grupo de las Nle's están asociados al SIR, tal es el caso de *nleH1*, *nleH2*, *nleB2*, y cinco homólogos de *nleG*. Es probable que estos elementos conservados a lo largo de la evolución de los patógenos tengan un papel importante en la regulación de los genes donde están asociados, y que estos genes en conjunto conformen un regulón involucrado con la virulencia. En este sentido, sería interesante analizar la función de los marcos de lectura Z1485 y Z2076 anotados en la base de datos del genoma de EHEC como genes hipotéticos que codifican proteínas de función desconocida.

Como se ha mencionado antes, Ler es el activador central de la expresión de los genes del LEE, pero también activa la expresión de genes fuera del LEE (*espC*) (Mellies *et al.*, 2001). Recientemente se determinó en nuestro laboratorio que Ler activa la expresión del operón *grlAR*, localizado dentro del LEE, y que GrlA a su vez contribuye a la expresión de *ler* generando un circuito regulatorio esencial para la expresión de los genes de la isla (Barba *et al.*, 2005). Cabe mencionar que precisamente la sobreexpresión de *grlA*, a partir de un vector multicopia, le confirió a las mutantes *sepL* y *sepD* de *C. rodentium* la capacidad de secretar, entre otras proteínas, a *nleB* (Deng *et al.*, 2004). Lo anterior nos sugería que GrlA, y posiblemente también Ler, podrían participar en la expresión de *nleB* y de esta manera coordinar su expresión con los genes del LEE. Para confirmar dicha observación analizamos la expresión de la fusión pKKnleB2 en los fondos mutantes *ler* y *grlA* de EHEC y *C. rodentium* y en la cepa no patógena de *E. coli* MC4100 crecidas en medio DME a 37°C en condiciones de agitación o estáticas en una atmósfera de CO₂ al 5%. Se debe mencionar que en el estudio donde se identificaron las Nle's, las cepas de *C. rodentium* fueron crecidas estáticamente en medio DME a 37°C. Interesantemente, las condiciones de crecimiento estáticas han mostrado ser óptimas para la expresión de los factores de virulencia de *C. rodentium*, mientras que las condiciones de crecimiento en agitación reducen la expresión de estos factores (Deng *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2004; Barba *et al.*, 2005). Inicialmente, resulta evidente que la actividad del pKKnleB2 es menor que la actividad generada por la fusión pLEE2 en los fondos silvestres de EHEC y *C. rodentium*, particularmente en las condiciones de agitación y estáticas, respectivamente (Figura 12). Distintos experimentos de nuestro laboratorio nos indican que la región promotora del operón 2 del LEE, contenida en la fusión pLEE2, es una de las regiones promotoras más activas del LEE. Además, la expresión de pKKnleB2 es menor en la cepa no patógena MC4100 comparada con la expresión en los fondos patógenos, lo cual sugiere que existen factores propios de los patógenos que contribuyen a la expresión de *nleB2*. Sin embargo, los datos obtenidos con las mutantes *ler* y *grlA* de *C. rodentium* nos indican que a diferencia de la fusión pLEE2, la expresión de la fusión pKKnleB2 no se ve afectada por la carencia de GrlA o Ler en ninguna de las condiciones evaluadas (Figuras 18 y 19). Sorprendentemente y por razones que desconocemos, la actividad de la fusión pLEE2 no se vio disminuida en las cepas mutantes *ler* y *grlA* de EHEC. Estos datos son contradictorios con numerosos reportes en los que se le atribuye a Ler un papel crucial en la expresión de los genes del LEE. Por esta razón, en los experimentos de

complementación y sobreexpresión, solo utilizamos a las cepas *ler* y *grlA* de *C. rodentium*. Es conveniente mencionar que las cepas mutantes *ler* y *grlA* de *C. rodentium* y EHEC utilizadas en este trabajo fueron caracterizadas fenotípicamente por experimentos de secreción como mutantes bonafide, ya que a diferencia de las cepas silvestres, no secretan al medio ninguna de las proteínas efectoras ni translocadoras, como Tir o EspA, respectivamente (datos no mostrados). Finalmente, en ninguno de los fondos genéticos existe un efecto drástico de las condiciones de crecimiento (estáticas o agitación) sobre la actividad de la fusión pKKnleB2.

En trabajos previos se ha demostrado que los factores de virulencia en EHEC, EPEC y *C. rodentium* son regulados por diferentes condiciones y medios de crecimiento. Por ejemplo, se ha observado que la expresión de los genes del LEE que codifican el SSTT es óptima en medio DME a 37°C y que se reprime en condiciones de crecimiento en medio LB, o en temperaturas mayores y menores de 37° C, así como por concentraciones milimolares de amonio en el medio (Puente *et al.*, 1996; Martínez-Laguna *et al.*, 1999). Para explorar el efecto del medio sobre la expresión de *nleB2*, analizamos la actividad de la fusión pKKnleB2 en los fondos silvestres de EHEC, *C. rodentium* y sus respectivos fondos mutantes *ler* y *grlA*, así como en la cepa de *E. coli* MC4100 en medio LB a 37 °C en condiciones de agitación o estáticas. Nuestros resultados muestran que no existe efecto del medio LB ni de la carencia de Ler o GrlA sobre la expresión del pKKnleB2 en ninguno de los fondos patógenos analizados (Figura 19). Sin embargo, en la cepa de *E. coli* no patógena (MC4100), esta fusión sigue presentando niveles de expresión reducidos con respecto a los fondos patógenos (Figura 19). La expresión de nuestra fusión control, pLEE2, confirma los reportes acerca de la represión de los genes del LEE por efecto del medio rico (LB) (Puente *et al.*, 1996) (Figura 19). Los datos obtenidos por estos experimentos sugieren que la regulación de los genes involucrados con la virulencia codificados en LEE es diferente a la regulación de los que se encuentran codificados en otras IP.

Uno de los principales datos que dan origen a este estudio, es que la sobreexpresión de GrlA en fondos mutantes *sepL* y *sepD* de *C. rodentium* evidenció la existencia de las Nle's (Deng *et al.*, 2004). Es posible que en estos experimentos el efecto de GrlA se debiera al incremento de los componentes del SSTT por un lado y/o a un efecto directo sobre la transcripción de las Nle's. No obstante que en los experimentos con las mutantes de *ler* y *grlA* de *C. rodentium* no vimos efecto sobre la expresión de *nleB2*, decidimos evaluar la segunda posibilidad ya que pensamos que la

existencia de un segundo promotor podría enmascarar el efecto de Ler y GrlA. Para este fin realizamos experimentos de sobreexpresión de Ler y GrlA en *trans* en cepas de *C. rodentium* que contienen el pKKnleB2, así como otras fusiones derivadas que se han presentado en experimentos previos. Es importante recordar que los experimentos de sobreexpresión sólo se realizaron en las cepas silvestres y mutantes *ler* y *grlA* de *C. rodentium* ya que es el único fondo en el que logramos ver un fenotipo claro cuando evaluamos la fusión control LEE2 (Ver pagina 45 párrafos iniciales). Además, la funcionalidad de los plásmidos que sobreexpresan a Ler o GrlA, a partir del vector multicopia pMPMT3, se confirmó utilizando la fusión pLEE2, cuya actividad sabemos que se incrementa por la sobreexpresión de Ler o GrlA. La sobreexpresión de Ler o GrlA en las cepas que contienen la fusión pKKnleB2 produce un incremento de 2 y 3 veces, respectivamente, con respecto a los niveles de actividad de las cepas que poseen la fusión pKKnleB2 y el pMPT3. Esto demuestra que existe un efecto positivo de Ler y GrlA a nivel transcripcional sobre *nleB2*. Estos resultados contrastan con los obtenidos cuando evaluamos la fusión pKKnleB2 en fondos mutantes *ler* o *grlA* de *C. rodentium*. Sin embargo, cuando sobreexpresamos a Ler y a GrlA en cepas silvestres de *C. rodentium* que contienen a la fusión pKKnleB2-P1 (P1 mutante) o a la fusión pKKnleB2-P2 (P2 mutante), demostramos que solo el P2 es activado por Ler y/o GrlA, mientras que el P1 es insensible a ambos reguladores. Para descartar la posibilidad de que hubiera otro u otros promotores que pudieran estar respondiendo a Ler o GrlA, y no necesariamente P2, nuevamente realizamos la sobreexpresión de ambos reguladores en las cepas que contiene la fusión pKKnleB2-P1P2 (P1-P2 mutantes). En la figura 20 se muestra que la fusión pKKnleB2-P1P2 es inactiva aún en presencia de los activadores. Con estos resultados confirmamos que efectivamente la presencia de P1 enmascara la carencia de los reguladores en las cepas mutantes *ler* y *grlA* sobre la expresión de *nleB2*. Para aclarar el efecto de Ler y GrlA sobre P2, evaluamos la fusión que solo tiene a P2 (pKKnleB2-P1) en las cepas silvestre y mutantes *ler* y *grlA* de *C. rodentium*. Como lo esperábamos, la expresión del pKKnleB2-P1 disminuye en los fondos mutantes *ler* y *grlA* con respecto a la cepa silvestre, mientras que los niveles expresión de la fusión pKKnleB2 en los fondos silvestre y mutantes se mantienen inalterados (Figura 21). Estos datos son consistentes con los resultados obtenidos por Téllez y colaboradores en el estudio de *nleH1*, en los que observan que la expresión de dicho gen muestra niveles de expresión reducidos en los fondos mutantes *ler* y *grlA* de *C. rodentium*. Para evaluar si el efecto de Ler y GrlA es directo sobre P2, sobreexpresamos a ambos reguladores en

la cepa MC4100 de *E. coli* que contiene la fusión pKKnleB2. En este caso la actividad del pKKnleB2 no fue incrementada por los reguladores, lo cual confirma que aún cuando la expresión de *nleB2* responde a Ler y GrlA, el efecto que ejercen ambos reguladores no es directo. Lo anterior nos indica que existen elementos exclusivos de los fondos patógenos que participan por debajo de Ler y GrlA en la regulación transcripcional de *nleB2* (Figura 22).

VIII CONCLUSIONES

- A diferencia de los genes del LEE, *nleB2* se expresa en medio DME y LB.
- La transcripción de *nleB2* depende de la actividad de dos promotores, aquí llamados P1 y P2.
- Además de los promotores, el SIR juega un papel esencial en la transcripción de *nleB2*.
- El SIR es un elemento que se conserva en un gran número de genes relacionados con la virulencia en distintas bacterias patógenas.
- Ler y GrlA participan de manera indirecta en la expresión de *nleB2* a través de P2.

IX PERSPECTIVAS

- ❖ Identificar el inicio de la transcripción generado a partir de P2.
- ❖ Comprobar la existencia de regiones de regulación negativa entre P1 y P2.
- ❖ Demostrar la organización operónica de *nleB2* y *nleC*.
- ❖ Identificar al o los elementos que se unen al SIR.
- ❖ Identificar a los elementos que participan por debajo de Ler y GrlA en la regulación de *nleB2*.

X BIBLIOGRAFÍA

- Atlung, T., and H. Ingmer.** 1997. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol. Microbiol.* **24**: 7-17.
- Baldini, M. M., J. B. Kaper, M. M. Levine, and H. W. Moon.** 1983. Molecular nature of adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Lancet* **2**(8343): 218.
- Baldwin, T.J., W. Ward, A. Aitken, S. Knutton, and P. H. Williams.** 1991. Elevation of intracellular free calcium levels in HEp-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **59**: 1599-1604.
- 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 GrlA. *J Bacteriol.* **187**: 7918-30.
- Bassler, B.** 2002. Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria. *Cell*, **109**: 421-424.
- Beltrametti, F., A. U. Kresse, and C. A. Guzman.** 1999. Transcriptional regulation of the *esp* genes of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **181**: 3409-3418.
- 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.
- Bergthorsson, U., and H. Ochman.** 1998. Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* **15**: 6-16.
- Bergthorsson, U., and H. Ochman.** 1995. Heterogeneity of genome sizes among natural isolates of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**: 5784-5789.
- Bieber, D. S., W. Ramer, C. Y. Wu, W. J. Murray, T. Tobe, R. Fernandez, and G. K. Schoolnik.** 1998. Type IV Pili, Transient Bacterial Aggregates, and Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **280**: 2114- 2118.
- Black, R. E.** 1990. Epidemiology of travelers' diarrhea and relative importance of various pathogens. *Rev. Infect. Dis.* **1**. (Supl. **1**). S73-S79.
- Blattner, F. R., G. Plunket III, C. A. Bloch, C, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-1474.
- Burland V., Y. Shao, N. T. Perna, G. Plunkett, H. J. Sofia, and F. R. Blattner.** 1998. The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7. *Nucleic Acids Res.* **15**: 4196-4204.
- Bustamante, V. H., E. Calva and J. L Puente.** 1998. Analysis of *cis*-acting elements required for *bfpA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **180**: 3013-3016.

- Bustamante, V. H., F. 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**: 664-678.
- Campellone, K., and J. Leong.** 2003. Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 82-90.
- Campellone, K., D. Robbins, and J. Leong.** 2004. EspF (U) is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck independent actin assembly. *Dev. Cell.* **7**: 217-228.
- Chaudhuri, R. R., A. M. Khan, and M. J. Pallen.** 2004. coliBASE: an online database for *Escherichia coli*, Shigella and *Salmonella* comparative genomics. *Nucleic Acids Res.* **32**: 296-299.
- Dahan, S., S. Wiles, R. M. La Ragione, A. Best, M. J. Woodward, M. P. Stevens, R. K. Shaw, Y. Chong, S. Knutton, A. Phillips, and G. Frankel.** 2005. EspJ is a prophage-carried type III effector protein of attaching and effacing pathogens that modulates infection dynamics. *Infect. Immun.* **73**: 679-686.
- Dean, P., and B. Kenny.** 2004. Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein. *Mol. Microbiol.* **54**: 665-675.
- Deng, W., J. L. Puente, S. Gruenheid, Y. Li, B. Vallance, A. Vázquez, J. Barba, J. Ibarra, P. O'Donnell, K. Ashman, S. Lee, D. Goode, T. Pawson, and B. B. Finlay.** 2004. Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **101**: 3597-3602.
- 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**: 6323-6335.
- Deng, W., B. A. Vallance, Y. Li, J. L. Puente, and B. B. Finlay.** 2003 *Citrobacter rodentium* translocated intimin receptor (Tir) is an essential virulence factor needed for actin condensation, intestinal colonization, and colonic hyperplasia in mice. *Mol. Microbiol.* **48**: 95-115.
- Dorman, C.** 2004. H-NS: A Universal Regulator for a Dynamic Genome. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 391-400.
- Dorman, C. J., and S. G. J. Smith.** 2001. Regulation of Virulence Gene Expression in Bacterial Pathogens. En: "Principles of bacterial pathogenesis". E.A. Groissman, editor. Academic Press. pp. 75- 132.
- Dytoc, M., L. Fedorko, and P. M. Sherman.** 1994. Signal transduction in human epithelial cells infected with attaching and effacing *Escherichia coli* *in vitro*. *Gastroenterology.* **106**: 1150-1161.

- Ebel F., C. Deibel, A. U. Kresse, C. A. Guzman, and T. Chakraborty.** 1996. Temperature and medium-dependent secretion of proteins by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **64**: 4472-4479.
- Elliott, S. J., V. Sperandio, J. A. Girón, S. Shin, J. L. Mellies, L. Wainwright, S. W. Hutcheson, T. K. McDaniel, and J. B. Kaper.** 2000. The Locus of Enterocyte Effacement (LEE)-Encoded Regulator Controls Expression of Both LEE and Non-LEE-Encoded Virulence Factors in Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **68**: 6115-6126.
- Elliott, S.J., J. Yu, and J. B. Kaper.** 1999. The Cloned Locus of Enterocyte Effacement from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Is Unable To Confer the Attaching and Effacing Phenotype Upon *E. coli* K-12. *Infect. Immun.* **67**: 4260-4263.
- Endo, Y., K. Tsurugi, T. Yutsudo, Y. Takeda, T. Ogasawara, and K. Igarashi.** 1988. Site of action of a Vero toxin (VT2) from *Escherichia coli* O157:H7 and of Shiga toxin on eukaryotic ribosomes. RNA N-glycosidase activity of the toxins. *Eur. J. Biochem.* **171**: 45-50.
- Finlay B. B., S. Falkow.** 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 136-169.
- Finlay, B. B., I. Rosenshine, M. Donnenberg, and B. Kaper.** 1992. Cytoeskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. *Infect. Immun.* **60**: 2541-2543.
- Fratamico, P. M., S. Bhaduri, and R. L. Buchanan.** 1993. Studies in *Escherichia coli* O157:H7 strains containing a 60 MDa plasmid and 60 MDa plasmid-cured derivatives. *Microbiol.* **39**: 371-381.
- Freundlich, M., N. Ramani, E. Mathew, A. Sirko, and P. Tsui.** 2000. The role of integration host factor in gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **6**: 2557-2563.
- 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**: 941-952.
- Garmendia, J., A. D. Phillips, M. F. Carlier, Y. Chong, S. Schuller, O. Marches, S. Dahan, E. Oswald, R. K. Shaw, S. Knutton, and G. Frankel.** 2004. TccP is an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cell. Microbiol.* **6**: 1167-1183.
- Garmendia, J., G. Frankel, and V. F. Crepin.** 2005. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation. *Infect. Immun.* **73**: 2573-2585.
- Girón, J. A., A. S. Ho and G. K. Schoolnik.** 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**: 710-713.
- Goldberg, M. D., J. Johnson, C. Hinton, and P. H. Williams.** 2001. Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **41**: 549-559.

- Grant, A. J., M. Farris; P. Alefounder, P. H. Williams, M. J. Woodward, and C. D. O'Connor.** 2003. Coordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Mol. Microbiol.* **48**: 507-521.
- Gruenheid, S., I. Sekirov, N. A. Thomas, W. Deng, P. O'Donnell, D. Goode, Y. Li, E. A. Frey, N. F. Brown, P. Metalnikov, T. Pawson, K. Ashman, and B. B. Finlay.** 2004. Identification and characterization of NleA, a non-LEE encoded type III translocated virulence factor of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* **51**:1233-1249.
- Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldofer, and H. Tschape.** 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: Structure, function and impact on microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**: 1089-1097.
- Ito, W., H. Ishiguro, and Y. Kurosawa.** 1991. A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. *Gene* **102**: 67-70
- Iyoda, S., and H. Watanabe.** 2004. Positive effects of multiple *pch* genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HEp-2 cells. *Microbiology* **150**: 2357-2371.
- Kanack, K. J., J. A. Crawford, M. A. Tatzuno, I. 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.
- Kaper, J. B.** 1996. Defining EPEC. *Rev. Microbiol.* **27**: 130-133.
- Kaper, J. B.** 1998. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**: 103-108.
- Kaper, J. B., J. Nataro, and L. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 123-138.
- 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**: 2606-2612.
- Kenny B., and B. B. Finlay.** 1995. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7991-7995.
- Kenny, B.** 2001. The enterohemorrhagic *Escherichia coli* (serotype O157: H7) Tir molecule is not functionally interchangeable for its enteropathogenic *E. coli* (serotype O127:H6) homologue. *Cell. Microbiol.* **3**: 499-510.
- Kenny, B.** 2002. Mechanism of action of EPEC type III effector molecules. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**: 469-477.
- Kenny, B., and M. Jepson.** 2000. Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria. *Cell. Microbiol.* **2**: 579-590.
- Kenny, B., S. Ellis, A. Leard, J. Warawa, H. Mellor, and M. Jepson.** 2002. Co-ordinate regulation of distinct host cell signaling pathways by multifunctional Enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. *Mol. Microbiol.* **44**: 1095-1107.

- Kodama, T., Y. Akeda, G. Kono, A. Takahashi, K. Imura, T. Iida, and T. Honda.** 2002. The EspB protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* interacts directly with alpha-catenin. *Cell. Microbiol.* **4**: 213-222.
- Ling, H., A. Boodhoo, B. Hazes, M. D. Cummings, G. D. Armstrong, J. L. Brunton, and R. J. Read.** 1998. Structure of the Shiga-like toxin I B-pentamer complexed with an analogue of its receptor Gb3. *Biochemistry.* **37**: 1777-1788.
- Lingwood, C. A.** 1996. Role of verotoxin receptors in pathogenesis. *Trends Microbiol.* **4**: 147-153.
- Luperchio, S. A. and D. B. Schauer.** 2001. Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia. *Microbes and Infect.* **3**: 333-340.
- Marches, O., T. N. Ledger, M. Boury, M. Ohara, X. Tu, F. Goffaux, I. Mainil, I. Rosenshine, M. Sugai, J. De Rycke, and E. Oswald.** 2003. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Mol. Microbiol.* **50**: 1553-1567.
- Martinez-Laguna Y., E. Calva, 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**: 153-166.
- Matsuzawa, T., A. Kuwae, S. Yoshida, C. Sasakawa, and A. Abe.** 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* activates the RhoA signaling pathway via the stimulation of GEF-H1. *EMBO J.* **23**: 3570-3582.
- Mayer M. P.** 1995. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **22**: **163**. 41-46.
- McLeod, S., and R. Johnson.** 2001. Control of transcription by nucleoid proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 152-159.
- McNamara, B.P., and M. S. Sonnenberg.** 1998. A novel proline-rich protein, EspF, is secreted from enteropathogenic *Escherichia coli* via the type III export pathway. *FEMS Microbiol. Lett.* **166**: 71-78.
- McNamara, B.P., A. Koutsouris, C. B. O'Connell, J. P. Nougayrede, M. S. Sonnenberg, and G. Hecht.** 2001. Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *J. Clin. Investig.* **107**: 621-629.
- Mead, P., and P. Griffin.** 1998. *Escherichia coli* O157:H7. *The Lancet* **352**: 1207-1211.
- 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**: 315-324.
- Mellies, J., S. Elliott, V. Sperandio, M. Sonnenberg, 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.

- Menard, R., C. Dehio, and P. J. Sansonetti.** 1996. Bacterial entry into epithelial cells. The paradigm of *Shigella*. *Trends Microbiol.* **4**: 220-226.
- Mitchell, J. E., D. Zheng, S. J. W. Busby, and S. D. Minchin.** 2003 Identification and analysis of extended-10' promoters in *Escherichia coli*. *Nuc. Ac. Res.* **31**: 4689-4695.
- Moon, H., S. C. Whipp, R. A. Argenzio, M. M. Levine, and R. A. Giannella.** 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.* **41**: 1340-1351.
- Mundy, M., L. Petrovska, K. Smollett, N. Simpson, R. K. Wilson, J. Yu, X. Tu, I. Rosenshine, S. Clare, G. Dougan, and G. Frankel.** 2004. Identification of a novel *Citrobacter rodentium* type III secreted protein, EspI, and the roles of this and other secreted proteins in infection. *Infect. Immun.* **72**: 2288-2302.
- Nagai, T., A. Abe, and C. Sasakawa.** 2005. Targeting of enteropathogenic *Escherichia coli* EspF to host mitochondria is essential for the bacterial pathogenesis: critical role of the 16th leucine residue in EspF. *J. Biol. Chem.* **280**: 2998-3011.
- Nataro, J., and J. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 142-201.
- Neidhart, F. C.** 1996. The enteric bacterial cell and the age of bacteria. En "*Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology". (F. C. Neidhart, R. Curtis III, J. L. Ingraham, E. C. C. Lin, K. B. Low, B. Magasanik, W. S. Reznikoff, M. Riley, M. SchAEchter and H. E. Umbarger, eds.), vol. 1, pp. 1-3. ASM Press. Washington, DC.
- Nougayrede, J.P., and M. S. Sonnenberg.** 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. *Cell Microbiol.* **11**: 1097-1111.
- O'Brien, A.D., V. L. Tesh, A. Donohue-Rolfe, M. P. Jackson, S. Olsnes, K. Sanvig, A. A. Lindberg, and G. T. Keusch.** 1992. Shiga toxin: Biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **180**: 65-94.
- Paton, J., and A. Paton.** 1998. Pathogenesis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 450-479.
- Pérez-Pérez, M. G.** 2001. Estudio de la expresión del gen *ler* de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). Tesis de Licenciatura, carrera de Biología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).
- Perna, N., G. Plunkett, V. Burland, B. Mau, J. Glasner, D. Rose, G. Mayhew, P. Evans, J. Gregor, H. Kirkpatrick, G. Pósfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. Grotbeck, W. Davis, A. Lim, E. Dimalanta, K. Potamouisis, J. Apodaca, T. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. Schwartz, R. Welch, and F. Blattner.** 2001. Genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**: 529-533.

- Philpott, D. J., D. M. McKay, P. M. Sherman, and M. H. Perdue.** 1996. Infection of T84 cells with enteropathogenic *Escherichia coli* alters barrier and transport functions. *Am. J. Physiol.* **270**: 634-645.
- 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.
- 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**: 1117-1133.
- Puente, J. L., D. Bieber, S. W. Ramer, W. Murria, and G. K. Schoolnik.** 1996. The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol. Microbiol.* **20**: 87-100.
- Rice, P.** 1997. Making DNA do a U-turn: IHF and related proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**: 86-93.
- Rode C. K., L. J. Melkerson-Watson, A. T. Johnson, and C. A. Bloch.** 1999. Type-specific contributions to chromosome size differences in *Escherichia coli*. *Infect Immun.* **67**: 230-236.
- Rosenshine, I., S. Ruschkowski, and B. B. Finlay.** 1996. Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells. *Infect. Immun.* **64**: 966-973.
- Sánchez-SanMartín, C., V. H. Bustamante, E. Calva, and J. L. Puente.** 2001. Transcriptional regulation of the *orf19* gene and the *tir-cesT-eAE* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**: 2823-2833.
- Sandvig, K., O. Garred, K. Prydz, J. V. Kozlov, S. H. Hansen, and B. van Deurs.** 1992. Retrograde transport of endocytosed Shiga toxin to the endoplasmic reticulum. *Nature* **358**: 510-512.
- Sanger F., S. Nicklen, and A. R. Coulson.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Saxena, S.K., A. D. O'Brien, and E. J. Ackerman.** 1989. Shiga toxin, Shiga-like toxin II variant and ricin are all single-site RNA N-glycosidase of 28S RNA when microinjected into *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **264**: 596-601.
- Schauer, D. B., S. Falkow.** 1993. Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype 4280 that causes transmissible murine colonic hyperplasia, *Infect. Immun.*, **61**: 2486-2492.
- Sears, C. L., and J. B. Kaper.** 1996. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.* **11**: 450-479.
- Sharma, V. K A., and R. L. Zuerner.** 2004. Role of *hha* and *ler* in transcriptional regulation of the *esp* operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* **186**: 7290-7301.

- Shin, S., M. P. Castanie-Cornet, J. M. 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.
- Sircili, M.P., M. Walters, L. R. Trabulsi, and V. Sperandio.** 2004. Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. *Infect. Immun.* **72**: 2329-2337.
- Sperandio, V., C. C. Li, and J. B. Kaper.** 2002. Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A (QseA): a regulator of the LysR family involved in the regulation of the LEE pathogenicity island in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **70**: 3085-3093.
- Sperandio, V., J. Mellies, R. Delahay, G. Frankel, A. Crawford, W. Nguyen, and J. B. Kaper.** 2000. Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) *LEE2* and *LEE3* operons by Ler. *Mol. Microbiol.* **38**: 781-793.
- Sperandio, V., A. G. Torres, B. Jarvis, J. P. Nataro, and J. B. Kaper.** 2003. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**: 8951-8956.
- Taylor, K.A., C. B. O'Connell, P. W. Luther, and M. S. Donnenberg.** 1998. The EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is targeted to the cytoplasm of infected HeLa cells. *Infect. Immun.* **66**: 5501-5507.
- Thompson J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson.** 1994. Improved sensitivity of profile searches through the use of sequence weights and gap excision. *Comput Appl Biosci.* **10**:19-29.
- Torres, A. G., and J. B. Kaper.** 2003. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Infect. Immun.* **71**: 4985-4995.
- Torres, A.G., J. Giron, N. Perna, V. Burland, F. Blattner, F. Avelino-Flores, and J. B. Kaper.** 2002. Identification and Characterization of *lfpABCC'DE*, a Fimbrial Operon of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **70**: 5416-5427.
- Tu, X., L. Nisan, C. Yona, E. Hanski, and I. Rosenshine.** 2003. EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **47**: 595-606.
- Umanski, T., I. Rosenshine, and D. Friedberg.** 2002. Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol.* **148**: 2735-2744.
- Vallance, B. A., and B. B. Finlay.** 2000. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**: 8799-8806.
- Viswanathan, V. K., A. Koutsouris, S. Lukic, M. Pilkinton, I. Simonovic, M. Simonovic, and G. Hecht.** 2004. Comparative analysis of EspF from enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in alteration of epithelial barrier function. *Infect. Immun.* **72**: 3218-3227.

- Viswanathan, V. K., S. Lukic, A. Koutsouris, R. Miao, M. M. Muza, and G. Hecht.** 2004. Cytokeratin 18 interacts with the enteropathogenic *Escherichia coli* secreted protein F (EspF) and is redistributed after infection. *Cell. Microbiol.* **6**: 987-997.
- Wolff, C., I. Nisan, E. Hanski, G. Frankel, and I. Rosenshine.** 1998. Protein translocation into HeLa cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **28**: 143-155.
- Yona-Nadler, C., T. Umanski, S. Aizawa, D. Friedberg, and I. Rosenshine.** 2003. Integration host factor (IHF) mediates repression of flagella in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**: 877-884.
- Yoshida, S., E. Katayama, A. Kuwae, H. Mimuro, T. Suzuki, C. Sasakawa.** 2002. *Shigella* delivers an effector protein to trigger host microtubule destabilization, which promotes Rac1 activity and efficient bacterial internalization. *EMBO J.* **21**: 2923-2935.