



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

PAPEL DE *Ler* Y H-NS EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL
DEL GEN QUE CODIFICA PARA LA CITOTOXINA EspC DE
Escherichia coli ENTEROPATÓGENA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

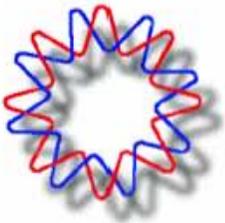
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

Biól. Verónica Irazú Martínez Santos

Director de tesis: Dr. José Luis Puente García

2006





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

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

En el comité tutorial participaron:

Dr. Enrique Merino Pérez

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos

El jurado de tesis estuvo integrado por:

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Dr. José Luis Puente García

Dr. Víctor Manuel González Zúñiga

Dra. Cinthia Ernestina Núñez López

Dr. Baltazar Becerril Luján

Durante la realización del trabajo fui becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con No. de registro 191128, por el período de agosto del 2004 a julio del 2006.

AGRADECIMIENTOS

A mis papás y mi hermano por ser los pilares de mi vida, apoyarme en esta etapa de mi formación y estar siempre conmigo.

A mis tías por estar con nosotros en un momento de preocupación en nuestras vidas.

A los Drs. José Luis Puente y Edmundo Calva por aceptarme en su laboratorio desde la licenciatura. En particular, quiero agradecer al Dr. José Luis Puente por haber dirigido este proyecto, por su paciencia y apoyo a lo largo de todo este tiempo. A los integrantes del laboratorio: Pancho, Alma, Ale, Marcos, Jenny, Rafael, Cristina, Víctor A., Miguel Ángel Ares, Alejandro, Carmen, Miguel Ángel, Ricardo, Ismael, Augusto, Aurora, Víctor B., Luary, Magdalena y Ana Lucía; a los que ya se fueron del laboratorio Bety, Toño, Olivia, Tomás y Miryam por su amistad y apoyo. En particular quiero agradecer a Ale Vázquez por proporcionarme las mutantes utilizadas en este proyecto, a Toño por enseñarme varias de las técnicas utilizadas a lo largo del proyecto. A las otras integrantes del laboratorio: Amapola y Rosalva por su amistad, y a Elvira y Paty por su paciencia y colaboración en la preparación de material.

A mis compañeritas Alma, Cristina, Diana, Idalia y Nancy por estudiar conmigo para los exámenes de los cursos. A Miguel por sus asesorías para pasar los exámenes.

A Karen por su amistad durante tantos años.

A los miembros de mi comité tutorial, los Drs. Miguel Ángel Cevallos y Enrique Merino por su tiempo y sus sugerencias.

A los miembros del jurado: Dr. Guillermo Gosset, Dr. José Luis Puente, Dr. Víctor González, Dra. Cinthia Núñez y Dr. Baltasar Becerril por la revisión de la tesis.

DEDICATORIAS

A mi mamá, mi papá y mi hermano, que siempre han estado conmigo, me han soportado y me han apoyado en todo lo que he hecho; a mis “niñas”: Coquis[†], Bola y Camila, que son parte de la familia. Los quiero mucho.

A mis tías, que aunque no nos vemos seguido sé que cuento con ustedes.

A mi abuelita, que nos cuida desde el cielo. Te extraño.

A Diosito, por permitirme cumplir otra de mis metas.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE	i
LISTA DE ABREVIATURAS	iii
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABLAS	vi
RESUMEN	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 <i>Escherichia coli</i>	1
I.2 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena	4
I.3 Modelo de patogénesis	4
I.4 Regulación de la expresión de factores de virulencia	7
I.5 Isla de patogenicidad <i>espC</i>	11
II. ANTECEDENTES	18
III. HIPÓTESIS	19
IV. OBJETIVOS	19
V. MATERIALES Y MÉTODOS	20
V.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	20
V.2 Oligonucleótidos	21
V.3 Construcción de fusiones transcripcionales	24
V.4 PCR inverso	27
V.5 Ensayo de actividad de CAT	28
V.6 Purificación de proteínas Ler-6XHIS y H-NS-6XHIS	29
V.7 Ensayo de retardamiento de banda (EMSA)	30

V.8 Determinación del inicio de transcripción por "primer extension"	31
VI. RESULTADOS	33
VI.1 La región no codificante de <i>espC</i> ejerce un efecto silenciador sobre la expresión del gen	32
VI.2 Purificación de Ler-6XHIS y H-NS-6XHIS.....	37
VI.3 Ler se une sobre la región reguladora de <i>espC</i> entre las posiciones -287 y -210.....	38
VI.4 H-NS se une entre las posiciones -210 y -121 de la región reguladora de <i>espC</i>	41
VI.5 Ler complementa la actividad de <i>espC</i> en <i>E. coli</i> K12.....	44
VI.6 La unión de Ler provoca la desestabilización de los complejos formados por H-NS.....	44
VI.7 Análisis de la regulación de genes aledaños a <i>espC</i>	47
VI. 8 Determinación del sitio de inicio de la transcripción de <i>espG2</i>	48
VI. 9 Análisis de la regulación de <i>espG2</i>	50
VI.10 Ler se une sobre la región reguladora de <i>espG2</i>	52
VI.11 <i>espG2</i> no es reprimido por crecimiento en medio rico.....	53
VI.12 <i>rorf4</i> no es regulado por Ler, pero sí por crecimiento en medio rico.....	54
VII. DISCUSIÓN	57
VIII. CONCLUSIÓN	64
IX. PERSPECTIVAS	65
X. APÉNDICE	66
XI. BIBLIOGRAFÍA	68

LISTA DE ABREVIATURAS

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

LB	Medio de cultivo tipo Luria (por sus siglas en inglés)
M	Molar
MDa	Mega Daltones
mg	Miligramos
µg	Microgramos
ml	Mililitros
µl	Microlitros
mM	Milimolar
µM	Micromolar
µm	Micrómetro
nM	Nanomolar
ORF	Marco de lectura abierto (por sus siglas en inglés)
³²-P	Fósforo 32 radioactivo
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (por sus siglas en inglés)
pb	Pares de bases
PBS	Regulador salino de fosfatos (por sus siglas en inglés)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés)
PKC	Proteín cinasa C
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
Sm	Estreptomicina
SDS	Dodecil sulfato de sodio (por sus siglas en inglés)
T	Timina
TBE	Solución de Tris-Boratos-EDTA
Tc	Tetraciclina
Tir	Receptor translocado de intimina (por sus siglas en inglés)
V	Volts
wt	Cepa silvestre

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1.- Fotomicrografía del pedestal formado por EPEC.....	2
Fig. 2.- Modelo de patogénesis de EPEC.....	7
Fig. 3.- Regulación de genes de virulencia de EPEC.....	11
Fig. 4.- Esquema de la isla de patogenicidad <i>espC</i>	12
Fig. 5.- Modelo del mecanismo de secreción de autotransportadores (Tipo V).....	13
Fig. 6.- Modelos probables de la acción de EspG/Orf3 y VirA.....	16
Fig. 7.- Esquema de las fusiones transcripcionales de <i>espC</i>	34
Fig. 8.- Ensayo de actividad de CAT con las fusiones de <i>espC</i>	35
Fig. 9.- Purificación de proteínas.....	38
Fig. 10.- EMSA con el fragmento <i>espC</i> -401 y Ler.....	39
Fig. 11.- EMSA con los fragmentos <i>espC</i> -401+1 y <i>espC</i> -43 y Ler.....	40
Fig. 12.- EMSA con los fragmentos <i>espC</i> -287, <i>espC</i> -210 y <i>espC</i> -121 y Ler.....	41
Fig. 13.- EMSA con los fragmentos <i>espC</i> -401+1 y <i>espC</i> -43 y H-NS.....	42
Fig. 14.- EMSA con los fragmentos <i>espC</i> -287, <i>espC</i> -210 y <i>espC</i> -121 y H-NS.....	43
Fig. 15.- Ensayo de complementación en <i>E. coli</i> MC4100.....	45
Fig. 16.- Ensayo de competencia con Ler y H-NS.....	47
Fig. 17.- Localización del promotor de <i>espG2</i>	49
Fig. 18.- Esquema de las fusiones transcripcionales de <i>espG2</i>	50
Fig. 19.- Ensayo de actividad de CAT con las fusiones de <i>espG2</i>	51
Fig. 20.- Interacción de Ler con la región reguladora de <i>espG2</i>	52
Fig. 21.- Ensayo de actividad de CAT en DMEM y LB con las fusiones de <i>espG2</i>	53
Fig. 22.- Esquema de las fusiones transcripcionales de <i>rorf4</i> y <i>rorf5</i>	55

Fig. 23.- Ensayo de actividad de CAT con las fusiones correspondientes a <i>rorf4</i> y <i>rorf5</i>	56
Fig. 24.- Representación esquemática de las regiones necesarias para la regulación de <i>espC</i>	60
Fig. 25.- Modelo de regulación de la expresión de <i>espC</i>	61

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1.- Cepas de <i>E. coli</i> patógenas para humanos.....	3
Tabla 2.- Similitudes de los ORF's dentro de la isla <i>espC</i>	12
Tabla 3.- Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.....	20
Tabla 4.- Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	23

RESUMEN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es un patógeno bacteriano Gram-negativo no invasivo. Es el agente etiológico predominante de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, afectando principalmente a niños menores de 6 meses. Esta bacteria coloniza la superficie del epitelio intestinal, donde se une a la superficie de las células hospederas e inyecta directamente factores de virulencia mediante un sistema de secreción tipo III, del cual depende para la formación de una histopatología característica conocida como lesión de adherencia y eliminación (AE). Esta lesión se caracteriza por la eliminación local de las microvellosidades y el rearrreglo del citoesqueleto de actina para formar una estructura parecida a un pedestal al cual se encuentra adherido estrechamente. Los genes necesarios para generar esta lesión, están codificados en una isla de patogenicidad denominada LEE (“Locus of Enterocyte Effacement”), la cual también está presente en otros patógenos AE como EHEC y *Citrobacter rodentium*. Para la expresión de los genes de LEE se requiere del activador Ler, codificado en la misma isla. EPEC secreta varias proteínas al medio extracelular, entre las que se encuentran EspG2 y EspC. De éstas sólo EspC es secretada de manera independiente del sistema de secreción tipo III. Tanto EspC como EspG2 se encuentran codificadas en una segunda isla de patogenicidad localizada en el cromosoma de EPEC y denominada *espC*. Anteriormente reportamos que *espC* es regulado positivamente por Ler y negativamente por H-NS, y que su región reguladora mínima está localizada corriente abajo de la posición -287; sin embargo, el mecanismo no ha sido caracterizado en detalle. También se reportó que *espG2*, al igual que *espC*, es regulado por BipA a través de Ler. Este trabajo tuvo como objetivo caracterizar el mecanismo de la regulación transcripcional mediada por Ler y H-NS de *espC*, continuar con la caracterización de su región reguladora, así como determinar si hay otros genes de la isla co-regulados por Ler. Para cumplirlo, se construyeron fusiones transcripcionales entre el gen reportero *cat* y diferentes porciones de la región reguladora de *espC*. Estas fusiones se utilizaron para hacer ensayos de actividad de CAT en las cepas silvestre, Δler y Δhns de EPEC. Con estos ensayos se determinó que la región no codificante de *espC* está involucrada en la regulación, ya que su eliminación induce un incremento en la actividad del promotor, así como que no existen elementos reguladores dentro de la región estructural de *espC*. Así mismo, se localizaron los sitios de unión de Ler y H-NS mediante ensayos de retardamiento en gel con las proteínas purificadas. La complementación de una fusión *espC-cat* en *E. coli* K12 MC4100 con Ler codificada en un plásmido multicopia, demostró que Ler es suficiente para la activación de *espC* en una cepa no patógena,

lo cual es consistente con el fenotipo de una cepa de EPEC mutante en *ler*, la cual no expresa EspC. Por otro lado, se construyeron fusiones transcripcionales con recortes hacia el extremo 5' de las regiones reguladoras de los genes *espG2* y *rorf4*, los cuales flanquean a *espC*. Estas fusiones se utilizaron para hacer ensayos de actividad de CAT en las cepas silvestre y Δ *ler* de EPEC y MC4100 silvestre crecidas tanto en medio DME como LB. En el caso de *espG2* se determinó el sitio de inicio de la transcripción, lo que permitió mapear su promotor. También se realizó un ensayo de retardamiento en gel con Ler purificada para corroborar si es regulado por esta proteína. De acuerdo a los resultados obtenidos, se determinó que la región no traducida de *espC* modula negativamente su expresión. El sitio de unión de Ler se localiza entre las posiciones -287 y -210 y el de H-NS entre las posiciones -210 y -58. Ler es el único regulador positivo necesario para la expresión de *espC*. *espG2* parece ser co-regulado por Ler, mientras que *rorf4* no es regulado por Ler.

I. INTRODUCCIÓN

I.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram-negativo que no forma esporas, usualmente mótil con flagelos peritricos y mide de 2 a 3 μm de longitud y 1 μm de ancho. Es una bacteria anaerobia facultativa que posee metabolismo fermentativo y respiratorio y su temperatura óptima de crecimiento es de 37°C. Es una de las bacterias predominantes de la microbiota intestinal de varios mamíferos incluyendo al humano. En humanos, es el organismo facultativo predominante del intestino delgado, donde en general, es considerado un comensal inocuo. La interacción de la bacteria con el ser humano comienza después del nacimiento, cuando coloniza el tracto gastrointestinal de los infantes recién nacidos, obteniendo ambos un beneficio mutuo (Nataro and Kaper, 1998). *E. coli* es el microorganismo más extensamente estudiado, pues ha sido el sistema modelo para el estudio del metabolismo bacteriano, procesos de división celular, biosíntesis de pared celular, quimiotaxis y genética bacteriana (Puente, 2001).

E. coli por lo regular reside inocuamente en el lumen intestinal, aunque cepas no patógenas pueden provocar infecciones en hospederos debilitados o inmunosuprimidos. Así mismo, existen varias cepas patógenas que pueden provocar distintas enfermedades tanto intestinales, como extraintestinales que incluyen: i) infección del tracto urinario (UTI, “urinary tract infection”), ii) sepsis / meningitis, y iii) enfermedad entérica / diarrea (Nataro and Kaper, 1998).

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

De estas cepas, EPEC es el organismo prototipo de un grupo de bacterias patógenas que provocan una histopatología característica conocida como lesión de adherencia y eliminación (AE, “attaching and effacing”) (Fig. 1). Esta lesión se caracteriza por la

adherencia íntima de la bacteria a la superficie del epitelio intestinal y la eliminación de las microvellosidades de los enterocitos (Vallance and Finlay, 2000). Dentro de este grupo se encuentran también: *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Tabla 1), *Citrobacter rodentium*, que provoca hiperplasia de colon transmisible en ratones, y *E. coli* enteropatógena de conejos (REPEC), a los que les provoca diarrea (Haack *et al.*, 2003).

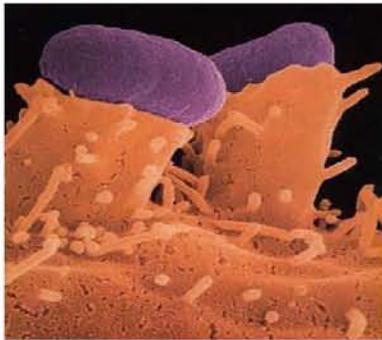


Fig. 1. Fotomicrografía del pedestal formado por EPEC sobre células HeLa, tomada por microscopía electrónica de barrido (SEM, “scanning electron microscopy”). La imagen fue coloreada artificialmente para distinguir a EPEC (morado) de las células HeLa (café). Tomado de Rosenshine *et al* (1996).

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

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

*Modificado de Puente(2001).

I.2 *E. coli* enteropatógena (EPEC)

Las cepas de EPEC se establecieron originalmente como aquellas que pertenecían a ciertos serotipos asociados con epidemias y casos esporádicos de diarrea infantil severa en países desarrollados durante mediados del siglo XX (Nougayrede *et al.*, 2003). Estas cepas se caracterizaban principalmente por no producir toxinas tipo Shiga (Stx) y no ser invasivas (Clarke *et al.*, 2003). Actualmente, las cepas de EPEC se definen como aquellas que contienen la isla de patogenicidad LEE (“Locus of Enterocyte Effacement”), forman la lesión AE, pueden o no tener el plásmido EAF (“EPEC adherence factor”) y presentan adherencia localizada. Aunque las cepas de EPEC ya no son una causa importante de diarrea en países desarrollados, sí son los agentes bacterianos causales predominantes de diarrea infantil en países en vías de desarrollo y pobres, afectando principalmente a niños menores de 6 meses en quienes colonizan la superficie del epitelio intestinal (Nataro and Kaper, 1998). Esta bacteria se transmite por el consumo de alimentos y agua contaminados.

I.3 Modelo de patogénesis

Como ya se mencionó, la interacción de EPEC con células epiteliales lleva a la producción de la lesión AE, que se caracteriza por la pérdida de microvellosidades en la superficie de los enterocitos y la inducción de pedestales de actina polimerizada justo por debajo del sitio donde se adhiere la bacteria (Vallance and Finlay, 2000). El modelo de patogenicidad se ha dividido en tres etapas para su mejor entendimiento (Fig. 2):

i) **Adherencia localizada.** La primera etapa involucra la adherencia inicial de la bacteria al epitelio intestinal del hospedero, la cual está mediada por el pilus BFP (“bundle-forming pilus”). En esta etapa, EPEC forma microcolonias densas que se adhieren a las células epiteliales en un patrón denominado adherencia localizada (AL) (Vallance and Finlay, 2000). Baldini y colaboradores (1983), demostraron que la habilidad de EPEC de adherirse con este patrón depende de la presencia del plásmido EAF. Éste es un plásmido de alto peso molecular (~92 kb ó 60 MDa) que se encuentra en las cepas clásicas de EPEC (Nataro *et al.*, 1985). La identidad del factor que media la AL fue

reportada por Girón y colaboradores (1991), quienes describieron una fimbria de 7 nm de diámetro que tiende a agregarse y a formar haces, por lo que sugirieron el nombre BFP.

ii) **Transducción de señales.** Después del primer contacto con la célula hospedera, EPEC se une a la superficie de la célula y le inyecta directamente factores de virulencia a través de un sistema de secreción tipo III. Éste es una maquinaria molecular multimérica especializada, compuesta de aproximadamente 20 proteínas, entre cuyos componentes principales se encuentran las proteínas EspA, EspB y EspD que conforman el translocón (Vallance and Finlay, 2000). EspA forma un filamento en la superficie bacteriana, mientras que EspB y EspD forman un poro en la membrana celular de la célula hospedera. Estas proteínas conforman una jeringa molecular a través de la cual son liberadas diversas moléculas efectoras al citoplasma (Campellone and Leong, 2003), entre las cuales se encuentran EspG (Elliott *et al.*, 2001) y su homólogo Orf3 (Matsuzawa *et al.*, 2004), recientemente renombrado EspG2 (Shaw *et al.*, 2005); EspF, EspH, Map (“mitochondria-associated protein”) y Tir (Clarke *et al.*, 2003). Estas moléculas efectoras activan vías de señalización celulares causando alteraciones en la arquitectura del citoesqueleto, lo que resulta en la pérdida de las microvellosidades y la despolimerización de los filamentos de actina.

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

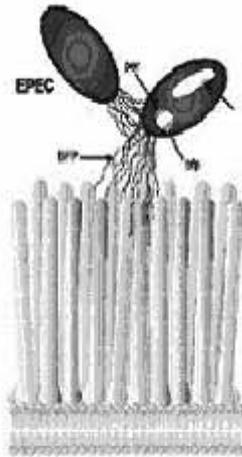
También se ha demostrado la activación de al menos dos cinasas, la proteína cinasa C (PKC) y la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) (Baldwin *et al.*, 1990; Crane and Oh, 1997; Manjarréz-Hernández *et al.*, 1996). La activación de la PKC induce cambios rápidos del contenido de agua intestinal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

iii) **Adherencia íntima.** Como ya se mencionó, una de las proteínas efectoras translocadas es Tir. Una vez translocada, es modificada por fosforilación de residuos de treonina y serina, pero principalmente es fosforilada en un residuo de tirosina, Tyr474, localizado en la región C-terminal citoplasmática (Kenny, 1999). Posteriormente, Tir se inserta en la membrana de la célula hospedera mostrando un dominio extracelular central que se une a una proteína de membrana externa de la bacteria llamada intimina (Campellone and Leong, 2003) que actúa como adhesina. Los dominios amino y carboxilo de Tir residen en el citoplasma de la célula hospedera, donde son capaces de interactuar con componentes del citoesqueleto (Campellone and Leong, 2003).

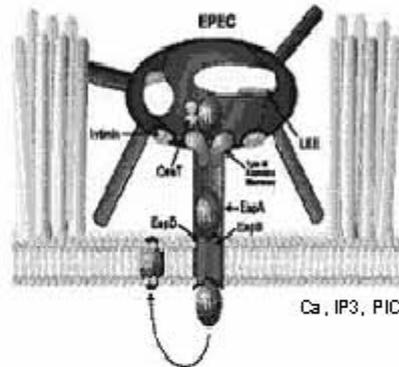
La fosforilación de Tir en Y474 por la cinasa de la familia Src (SFK, por sus siglas en inglés) c-Fyn de la célula hospedera es crucial para la formación de los pedestales de actina (Phillips *et al.*, 2004). Tanto la fosforilación de Tir como la formación del pedestal son bloqueadas por una mutación de Y474 in Tir (Gruenheid *et al.*, 2001; Kenny, 1999); por genisteína, un inhibidor relativamente no específico de la tirosin cinasa (Rosenshine *et al.*, 1996) o por los inhibidores de la familia Src de cinasas AG18 y PP2 (Phillips *et al.*, 2004).

Una vez fosforilada, Tir facilita el reclutamiento y la activación de proteínas de la célula hospedera, incluyendo Nck (Gruenheid *et al.*, 2001), N-WASP (“neuronal Wiskott- Aldrich sndrome protein”) (Lommel *et al.*, 2001) y el complejo de proteínas relacionadas a actina 2/3 (Arp2/3) (Kalman *et al.*, 1999), que inician la polimerización de actina para la formación del pedestal. El papel de Nck es reclutar al dominio amino terminal de N-WASP y al complejo Arp 2/3. El reclutamiento de Arp2/3 resulta en la nucleación de filamentos de actina y el inicio de la formación del pedestal (Kalman *et al.*, 1999; Rohatgi *et al.*, 1999).

A) Adherencia localizada



B) Transducción de señales



C) Adherencia íntima

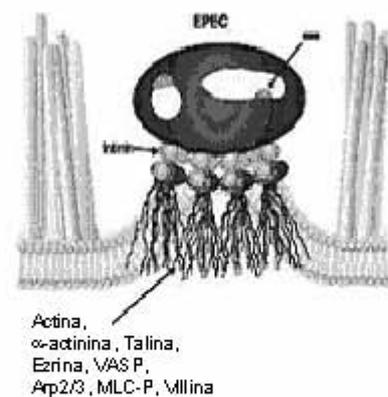


Fig. 2. Modelo de patogénesis de EPEC. A) La adherencia localizada está mediada por la producción del pilus BFP. Los genes necesarios para la producción de este pilus están codificados en el plásmido EAF (Sohel *et al.*, 1996; Stone *et al.*, 1996). B) La transducción de señales ocurre cuando EPEC le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

I.4 Regulación de la expresión de factores de virulencia

Las cepas de EPEC contienen una isla de patogenicidad denominada LEE (“Locus of Enterocyte Effacement”), que abarca 35 kb y se localiza en el cromosoma en el minuto 82 (Donnenberg *et al.*, 1997). En esta región está codificado el sistema de secreción tipo III, el cual, como ya se mencionó, es utilizado por EPEC para secretar a las proteínas efectoras fuera de la bacteria y/o translocarlas a la célula hospedera (ver sección anterior). Este sistema está codificado por los genes *esc* (“E. coli secretion”) y *sep* (“secretion of E. coli proteins”) que están distribuidos en al menos 3 operones (*LEE1* a *LEE3*) de la isla (Elliott *et al.*, 1998). Los genes necesarios para la adherencia íntima (*tir*, *cesT* y *eae*) están codificados en el operón *LEE5* (Sánchez-SanMartín *et al.*, 2001), mientras que las proteínas translocadoras y varias de las secretadas están codificadas en el operón *LEE4* (Mellies *et al.*, 1999).

Para que EPEC pueda establecer la infección necesita, además de los genes de virulencia arriba mencionados, una regulación precisa de éstos (Fig. 3) y su expresión adecuada en respuesta a cambios en las condiciones ambientales, pues la expresión inadecuada de estos genes puede traer consecuencias desfavorables para la bacteria, ya que el expresarlos requiere de un gasto metabólico costoso y expresarlas antes de establecer la infección puede alertar al sistema de defensa del hospedero sobre la presencia de la bacteria antes de una colonización exitosa (Clarke *et al.*, 2003).

Se ha visto que la expresión de los factores de virulencia de EPEC se presenta a niveles muy bajos cuando se crece a la bacteria en un medio rico, como el LB (Kenny *et al.*, 1997; Puente *et al.*, 1996). Sin embargo, cuando se crece en un medio mínimo definido, como el DMEM, se detecta la expresión del BFP y de las proteínas secretadas. La expresión óptima de los genes de virulencia en EPEC se observa durante el crecimiento exponencial a 37°C, pH 7.0 y a una osmolaridad fisiológica, en presencia de calcio y bicarbonato de sodio (Puente *et al.*, 1996). Por otro lado, la presencia de sales de amonio reduce significativamente la expresión de *bfpA* y el fenotipo AL *in vitro* (Puente *et al.*, 1996).

La base genética de la regulación de los genes de virulencia de EPEC se ha enfocado en el papel del regulador Per (“plasmid-encoded regulator”), codificado en el plásmido EAF. El operón *per* incluye a *perA*, *perB* y *perC*. PerA es miembro de la familia AraC/XylS de activadores transcripcionales (Gómez-Duarte and Kaper, 1995; Tobe *et al.*, 1996) y regula de manera positiva la expresión de su propio promotor y la del operón *bfp* (Bustamante *et al.*, 1998; Ibarra *et al.*, 2003; Martínez-Laguna *et al.*, 1999). La transcripción de *per* es reprimida parcialmente por GadX, proteína que regula también la síntesis de proteínas glutamato descarboxilasas que forman parte del mecanismo de resistencia a ácidos (Shin *et al.*, 2001). Por otro lado, PerC no muestra homología a secuencias de proteínas en la base de datos (Gómez-Duarte and Kaper, 1995; Tobe *et al.*, 1996), pero regula de manera positiva la expresión de los genes de LEE mediante la activación de *ler*, el primer gen del operón *LEE1* (Bustamante *et al.*, 2001 y datos no publicados; Porter *et al.*, 2005). Este gen codifica para la proteína reguladora Ler, la cual regula positivamente varios genes de virulencia codificados tanto en la isla LEE como en otras partes del cromosoma (Elliott *et al.*, 2000).

La regulación del gen *ler* es muy compleja e involucra muchos factores cromosomales y reguladores patógeno-específicos, además de PerC, que se ha demostrado que afectan su expresión. Uno de ellos es la proteína H-NS, un represor común de genes de virulencia en bacterias Gram-negativas, que regula negativamente la expresión de *ler*, siendo su efecto más evidente a temperaturas inferiores a 30°C (Umanski *et al.*, 2002). De igual manera reprime de manera independiente de la temperatura a los operones *LEE2* a *LEE5* (Bustamante *et al.*, 2001; Sánchez-SanMartín *et al.*, 2001; Umanski *et al.*, 2002). H-NS es una proteína funcionalmente parecida a histonas, que se une fuertemente al DNA de forma no específica, preferentemente en secuencias intrínsecamente curvas y ricas en residuos de A's y T's (Falconi *et al.*, 1988). Esta unión provoca cambios en el superenrollamiento y empaquetamiento e influye en la expresión genética, por lo que modula de forma negativa la expresión de genes involucrados en muchos procesos celulares distintos, incluyendo virulencia (Atlung and Ingmer, 1997).

Otros reguladores transcripcionales de *ler* son: IHF, BipA, GrIA y GrIR. **IHF** (“integration host factor”) es una proteína asociada a nucleóide requerida para la expresión eficiente de *ler* e interactúa con la región promotora de *LEE1 in vitro*. Esta proteína se une específicamente al DNA en sitios consenso y lo dobla para formar complejos nucleoproteínicos, actúa como regulador global y es esencial para la activación de *ler* (Friedberg *et al.*, 1999). **BipA**, es miembro de la superfamilia de GTPasas de unión a ribosomas y también regula de manera positiva la expresión de *ler* (Grant *et al.*, 2003). **GrIA** tiene 23% de identidad con CaiF, un activador transcripcional común de las enterobacterias, y regula de manera positiva la expresión de *ler* en *Citrobacter rodentium* (Deng *et al.*, 2004). La regulación se da mediante un circuito regulador donde GrIA es necesaria para la expresión de Ler aún en ausencia de H-NS y Ler es necesaria para la activación de GrIA (Barba *et al.*, 2005). Este regulador está conservado en EPEC y en EHEC, por lo que se asume que funciona de manera similar en ambos organismos. Por último, **GrIR**, que no tiene similitud con proteínas en la base de datos, regula de manera negativa la expresión de *ler* (Deng *et al.*, 2004). Se propone que esta represión la ejerce modulando la actividad de GrIA, con la cual se ha visto que interactúa (Creasey *et al.*, 2003), (Lara-Ochoa, datos no publicados).

Como ya se mencionó, el primer gen del operón *LEE1* codifica para la proteína Ler (“LEE-encoded regulator”), la cual tiene similitud con la familia de proteínas tipo H-NS. La

similitud más alta se encuentra en el dominio C-terminal donde se conserva el motivo de unión a DNA (TWTGXGRXP).

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

A través de estos estudios se demostró que Ler es necesaria para la transcripción de los genes de *LEE*, compitiendo por las secuencias de unión al DNA con H-NS, la cual reprime su expresión en ausencia de Ler. También se ha demostrado que Ler es requerida para la expresión del operón *LEE4* y de los genes *espF*, *espG*, y *map* (Elliott *et al.*, 2000; Friedberg *et al.*, 1999; Mellies *et al.*, 1999; Sánchez-SanMartín *et al.*, 2001; Sperandio *et al.*, 2000).

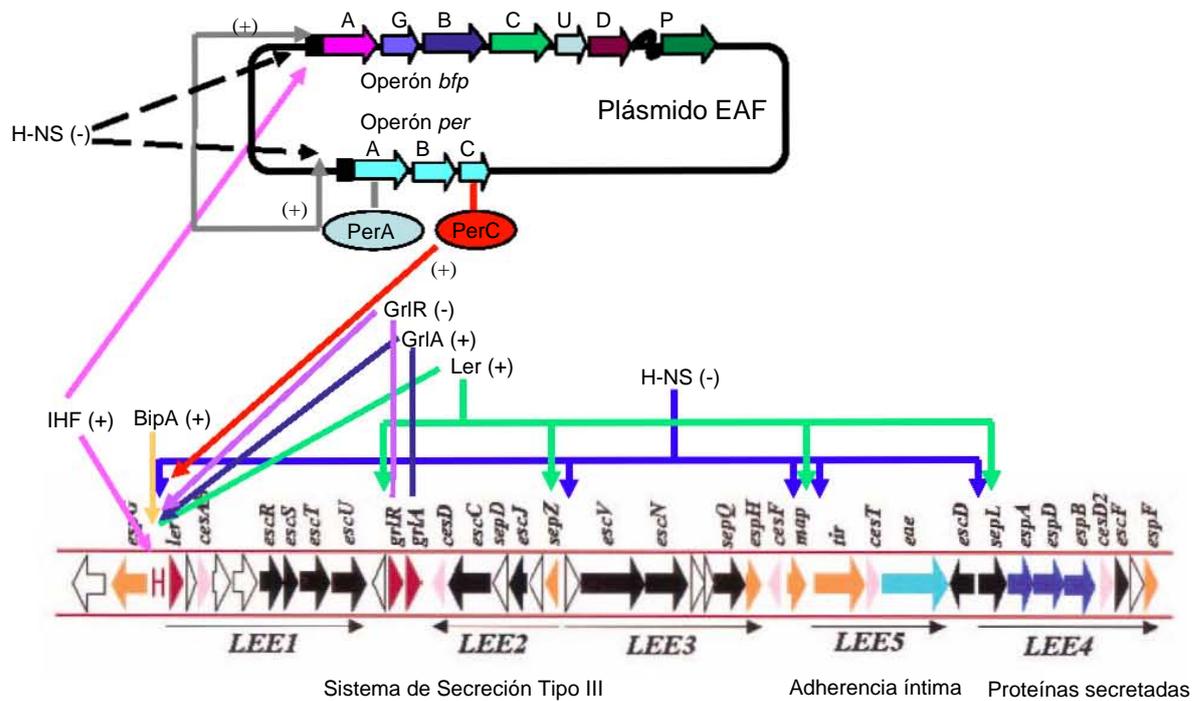


Fig. 3. Regulación de genes de virulencia en EPEC. En el plásmido EAF se encuentra el operón *per*, el cual codifica para PerA, PerB y PerC. PerA regula de manera positiva la transcripción de su promotor y la del operón *bfp*. Por su parte, PerC junto con GrlA, IHF, y BipA, regulan de manera positiva la expresión del primer gen del operón *LEE1*, *ler*. El producto de este gen elimina la represión ejercida por H-NS sobre los promotores de *LEE2*, *LEE3*, *LEE4* y *LEE5*.

1.5 Isla de Patogenicidad *espC*

Además de la isla LEE, algunas cepas de EPEC contienen una segunda isla de patogenicidad denominada *espC*, que se localiza en el minuto 60 del cromosoma (Fig.4). Esta isla consta de aproximadamente 15,000 pb y de 16 ORFs, de los cuales 6 tienen similitud con elementos genéticos móviles, dos con proteínas reguladoras, dos con factores de virulencia y tres no tienen similitud con proteínas en las bases de datos (Tabla 2).

Tabla 2. Similitudes de los ORF's dentro de la isla *espC*.

Locus	Proteína o locus similar	% Identidad	% Similitud
<i>rorf1</i>	<i>o90a</i> adyacente a <i>o360</i> en <i>E. coli</i> K-12	51	65
<i>orf1</i>	Ninguno	----	----
<i>rorf2</i>	Proteína reguladora de asimilación de nitrógeno de <i>Synechocystis sp.</i>	29	55
<i>rorf3</i>	Endopeptidasa neutral de <i>Lactococcus lactis</i> subespecie <i>cremoris</i>	23	40
<i>orf2</i>	Ninguno	----	----
<i>orf3</i>	VirA de <i>Shigella flexneri</i>	19	37
(<i>espG2</i>)	EspG de EPEC	43	63
<i>espC</i>	Pet de EaggEC	52	67
<i>orf5</i>	Ninguno	----	----
<i>rorf4</i>	Citocromo b de <i>Anthropoides virgo</i>	26	44
<i>rorf5</i>	Proteína activadora NahR de <i>Pseudomonas putida</i>	31	53
<i>orf6.1</i>	BfpM de <i>E. coli</i> (probable transposasa)	93	95
	Probable transposasa xtn de <i>V. cholerae</i>	67	74
<i>orf6.2</i>	Probable transposasa xtn de <i>V. cholerae</i>	77	89
<i>orf6.3</i>	Probable transposasa xtn de <i>V. cholerae</i>	42	66
<i>rorf6</i>	Integrasa del profago CP4-57	91	93
<i>orf7</i>	Probable transposasa a del plásmido pMT1 de <i>Yersinia pestis</i>	95	95
<i>orf8</i>	Probable transposasa b del plásmido pMT1 de <i>Yersinia pestis</i>	93	96

* Modificado de Mellies *et al* (2001).

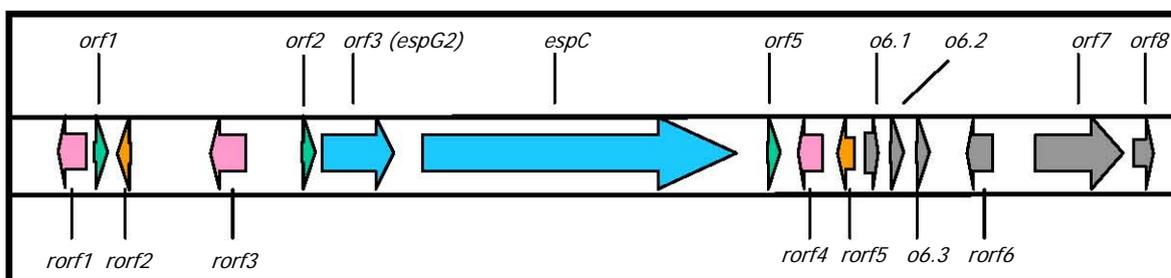


Fig. 4. Esquema de la isla de patogenicidad *espC*. Los genes que tienen similitud con factores de virulencia están en azul, los que tienen similitud con proteínas reguladoras están en anaranjado, los que tienen similitud con elementos genéticos móviles están en gris, los que no tienen similitud con ninguna proteína en la base de datos están en verde y los que tienen similitud con otras proteínas en la base de datos están en rosa. Modificado de Mellies *et al* (2001).

El primer gen en ser caracterizado fue *espC*, que codifica para la proteína EspC de 1,306 aminoácidos, de los cuales los primeros 53 no se encuentran en la proteína madura de 110 kDa. Estos aminoácidos tienen varias características encontradas en péptidos

señal, los cuales median la exportación Sec-dependiente a través de la membrana citoplasmática. Esta señal incluye un tramo de aminoácidos cargados positivamente (dominio N), seguido por una región más grande de aminoácidos hidrofóbicos (dominio H) y, finalmente, una región menos hidrofóbica (dominio C) que contiene un sitio de reconocimiento para la peptidasa señal (Mellies *et al.*, 2001). La forma madura de *espC* es secretada por el sistema de secreción tipo V o mecanismo autotransportador.

El mecanismo de autotransporte (Fig. 5) fue descrito por primera vez para la proteasa de IgA de *N. gonorrhoeae* (Henderson *et al.*, 1998; Pohlner *et al.*, 1987). La proteína precursora se exporta a través de la membrana citoplasmática de una manera dependiente del sistema Sec, acoplada al rompimiento del péptido señal. La proteína madura posee un dominio C-terminal que forma un barril β en la membrana externa y el dominio pasajero N-terminal es exportado a través del barril, para, posteriormente, ser procesado autocatalíticamente del barril y liberado (Henderson and Nataro, 2001).

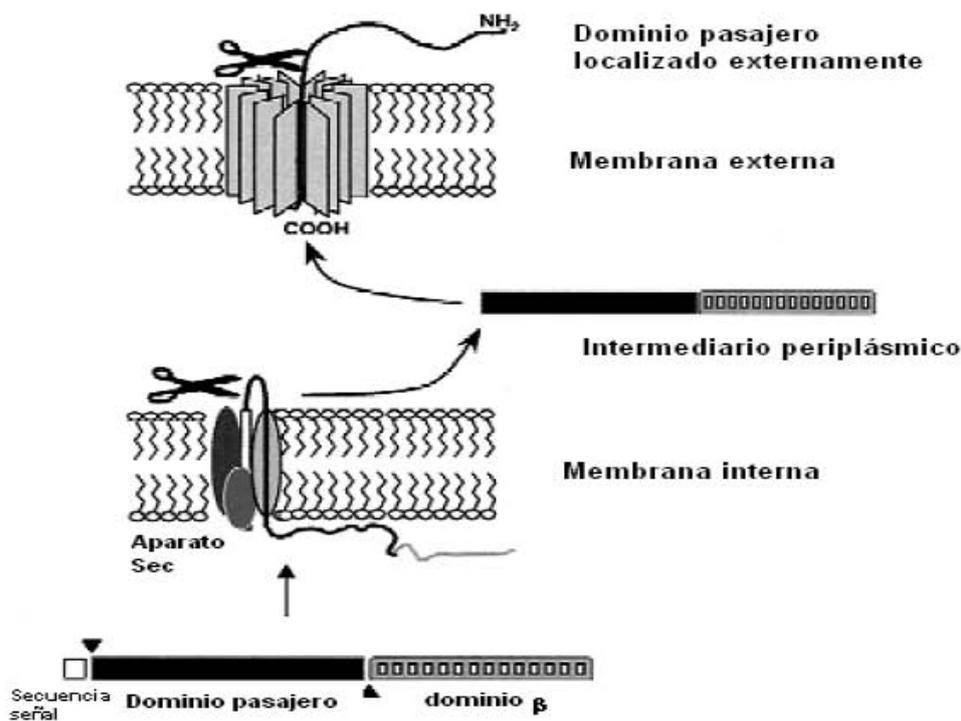


Fig. 5. Modelo del mecanismo de secreción de autotransportadores (tipo V). Las proteínas exportadas por este mecanismo poseen tres dominios (secuencia señal, dominio pasajero y dominio β). La secuencia señal dirige a la proteína al periplasma a través del sistema Sec y es cortada en la membrana interna por una peptidasa señal, liberando la porción restante en el periplasma. Aquí, el dominio β asume la estructura de un barril β que se inserta en la membrana externa para formar un poro. El dominio pasajero es translocado a la superficie celular bacteriana a través del poro y, posteriormente, es cortado y liberado. Modificado de Henderson y Nataro (2001).

Como ya se mencionó (Tabla 2), EspC tiene similitud con la proteína Pet de EAggEC, la cual tiene actividad enterotóxica en tejido intestinal (Mellies *et al.*, 2001). Interesantemente, una cepa mutante en *espC* no se distingue de la cepa isogénica en adherencia, invasión, rearrreglo de actina y fosforilación de Tir, eventos cruciales para la formación de la lesión AE (Stein *et al.*, 1996). Sin embargo, recientemente Navarro-García y colaboradores (2004) reportaron que EspC produce efectos citopáticos en células epiteliales parecidos a los reportados para Pet, aunque el daño celular se alcanzó sólo con una dosis equivalente a tres veces la concentración de Pet y un tiempo de incubación 2.5 veces mayor; es decir, mientras que con Pet se produce el efecto enterotóxico con 40 µg/ml después de 4 hr, con EspC se produce el mismo efecto pero con 120 µg/ml después de 10 hr, lo que indica que EspC es deficiente en su capacidad para internalizarse en células HEP-2 en comparación con Pet. Las diferencias en internalización, tráfico y actividad sobre la proteína blanco (fodrina) pueden explicar la habilidad reducida de EspC de provocar efectos citotóxicos. Al igual que con Pet, los efectos citopáticos consisten en contracción del citoesqueleto, pérdida de fibras de estrés de actina, formación de vacuolas en el citoplasma, contracción celular con aparente pérdida del citoplasma, redondeamiento de las células, formación de burbujas en la membrana y desprendimiento de las células. Estos efectos se deben a la disrupción del citoesqueleto de actina, ya que EspC corta en dos sitios a la fodrina, proteína que interactúa con la actina para mantener la integridad del citoesqueleto. Se sabe que esta actividad es realizada por el motivo de serín proteasa, debido a que el inhibidor de serín proteasas, PMSF, evita el daño al citoesqueleto producido por EspC; adicionalmente, una mutante en el motivo de serín proteasa es incapaz de causar daño al citoesqueleto. En lo que se refiere a la internalización de EspC, recientemente, Vidal y Navarro (2006) reportaron que es internalizada a la célula epitelial mediante pinocitosis cuando se utiliza proteína purificada. Esto se propuso debido a que diferentes inhibidores de endocitosis mediada por receptor no evitan los efectos producidos por EspC. Esta internalización no es mediada por ningún receptor, ya que no se detectó a EspC unida a la membrana, a diferencia de Pet, la cual si es detectada en la membrana de las células epiteliales y es internalizada por vesículas cubiertas de clatrina (Navarro-García *et al.*, sometido). Sin embargo, cuando las células epiteliales son infectadas con EPEC, EspC es internalizada de manera más eficiente, localizándose en la punta del pedestal, y después se distribuye uniformemente en el citoplasma. Así mismo, se desconoce el mecanismo por el que EspC es liberada al citosol de la célula hospedera, ya que drogas utilizadas para inhibir el

tráfico intracelular no impidieron los efectos citotóxicos producidos por EspC. Concluyen que la secreción de EspC es incrementada en presencia de células epiteliales y posteriormente es internalizada a la célula epitelial mediante un evento que tal vez requiera de otros factores bacterianos. La internalización ocurre justo por debajo del sitio donde la bacteria se adhiere a la célula epitelial y simultáneamente a la formación del pedestal.

El segundo gen de la isla en ser caracterizado es el gen *orf3*, que codifica para una proteína de 390 aminoácidos, la cual tiene similitud con la proteína VirA de *Shigella flexneri* y con la proteína EspG del LEE de EPEC (Tabla 2). Matsuzawa y colaboradores (2004) demostraron que tanto EspG como Orf3 están involucrados en la inducción de la formación de fibras de estrés de actina de manera independiente de la interacción Tir-intimina en células de fibroblasto de ratón. Ambos efectores inducen la disrupción de las redes de microtúbulos debajo de la bacteria por asociación directa con tubulinas, lo que induce la desestabilización de los microtúbulos y lleva a la liberación de GEF-H1 del citoesqueleto al citosol, lo cual puede activar la vía de señalización celular que involucra a GEF-H1, RhoA y ROCK. La activación de ROCK induce la formación de las fibras de estrés de actina (Fig. 6A). Interesantemente, ambas proteínas, son capaces de rescatar la habilidad de una mutante en VirA de *Shigella* de invadir células hospederas, lo que significa que comparten funciones similares a las de VirA, aunque su mecanismo de acción es diferente (Fig. 6). Posteriormente, Hardwidge y colaboradores (2005) observaron que una cepa de *Citrobacter rodentium* mutante en *espG* está disminuida en su capacidad para formar hiperplasia colónica y su habilidad para colonizar es retardada. Reportan que EspG es capaz de interactuar con la α -tubulina e inducir la depolimerización de los microtúbulos a través de un nuevo mecanismo distinto al de VirA. Recientemente, Tomson y colaboradores (2005) reportaron que una eliminación sencilla de *espG* en EPEC no tiene un fenotipo fisiológico aparente, mientras que la mutación de *espG* y *orf3* provoca un retraso significativo en la disrupción de la barrera de uniones estrechas en células humanas de epitelio intestinal. Posteriormente, Shaw y colaboradores (2005) reportaron que tanto EspG como Orf3 inducen la eliminación de microtúbulos, y este efecto sólo se elimina cuando ambos efectores están ausentes, por lo que renombraron a Orf3 como EspG2. Para coincidir con la literatura a partir de aquí se va a referir a este gen como *espG2*.

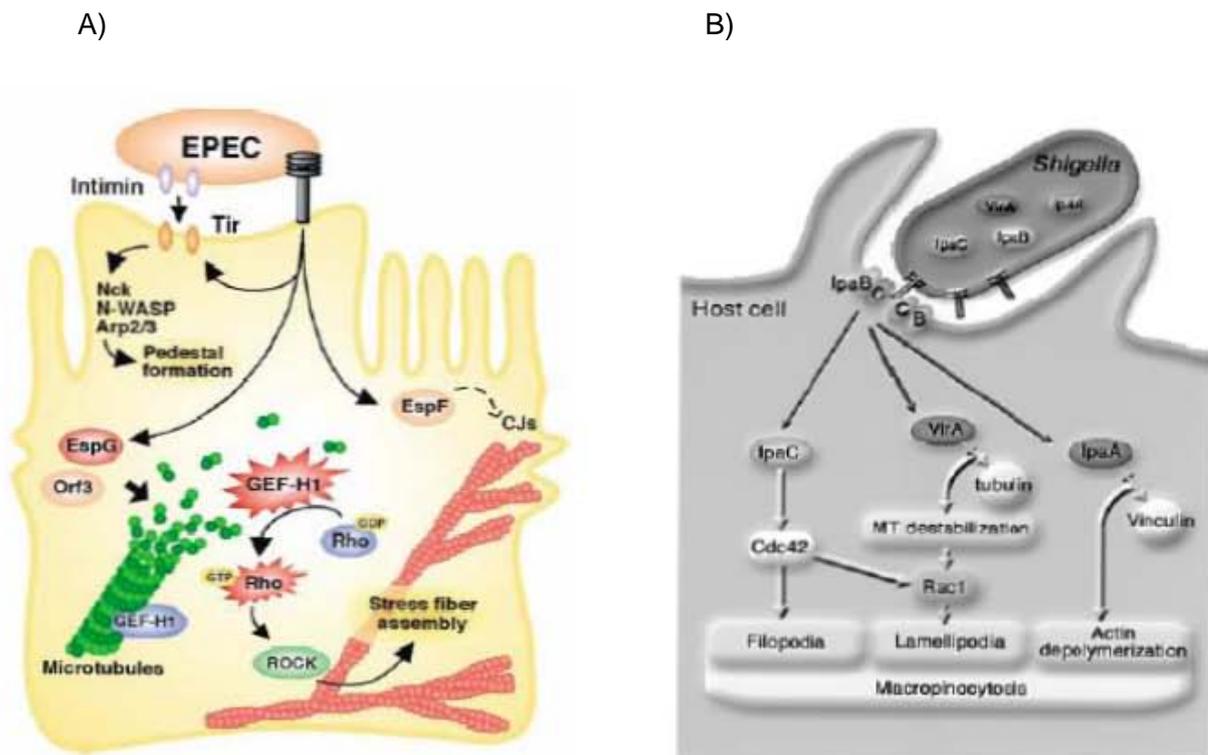


Fig. 6. Modelos probables de la acción de A) EspG/Orf3 y B) VirA. A) EPEC transloca a las proteínas efectoras hacia la célula hospedera mediante el sistema de secreción tipo III. La interacción de la proteína de membrana externa de la bacteria, intimina, con Tir dispara la vía de transducción de señales del enterocito, que incluye el reclutamiento de Nck, N-WASP, y el complejo Arp2/3, lo que lleva a la formación del pedestal. Por otro lado, es posible que EspF influya en la función de las uniones celulares (CJs). EspG y Orf3 se asocian con tubulinas, lo que lleva a la disrupción de las redes de microtúbulos. GEF-H1 cambia a su forma activa como resultado de su disociación de los microtúbulos. GEF-H1 activado promueve la unión de GTP a RhoA, activándola. Finalmente, la activación de ROCK por RhoA, induce el ensamblaje de las fibras de estrés de actina y, probablemente, tiene una influencia en la permeabilidad paracelular de la célula infectada. Tomado de Matsuzawa *et al* (2004). B) *Shigella* inyecta a la célula hospedera, entre otras, a la proteína efectora VirA a través de su sistema de secreción tipo III. VirA se une a los heterodímeros de α/β tubulina e induce la desestabilización de los microtúbulos. Esta desestabilización a su vez, lleva al crecimiento de los microtúbulos y a la estimulación de la actividad de Rac1 y provoca el plegamiento de la membrana. Tomado de Yoshida *et al* (2002).

Por otro lado, el gen *rorf5* se predijo que codifica para una proteína de 62 aminoácidos que tiene 53% de similitud con la proteína activadora NahR de *Pseudomonas putida* (Tabla 2). Esta proteína es el regulador transcripcional, que responde a salicilato, de dos operones involucrados en la degradación de naftaleno (Cebolla *et al.*, 1997) y es miembro de la familia de activadores transcripcionales parecidos a LysR. Las proteínas de esta familia activan la transcripción de operones y regulones involucrados en funciones

celulares extremadamente diversas, incluyendo fijación de nitrógeno, respuesta a estrés oxidativo y virulencia bacteriana (Zaim and Kierzek, 2003). Algunas controlan múltiples genes no relacionados, mientras que otras son reguladas por genes que forman redes reguladoras complejas (Schell, 1993). Muchas proteínas, al activar la expresión de sus genes blanco reprimen su propia expresión, ya que frecuentemente se transcriben a partir de un promotor divergente que está muy cercano, y por lo regular sobrelapado, con el promotor del gen al que regulan (Schell, 1993).

II. ANTECEDENTES

El primer dato que se tiene sobre la regulación de *espC* fue reportado por Elliott y colaboradores (2000). Ellos observaron que EspC estaba presente en preparaciones de proteínas secretadas de EPEC de cepas silvestres y cepas Δ/er complementadas con la proteína silvestre, pero no en sobrenadantes de mutantes en *ler*, por lo que propusieron que Ler es necesaria para su expresión. Para demostrar que Ler es capaz de activar a *espC*, construyeron una fusión al gen reportero *lacZ* (conteniendo al probable promotor y al menos 200 pb flanqueándolo) y, posteriormente, midieron la actividad de β -galactosidasa de la cepa EPEC Δ/er complementada con *ler* en un plásmido. Encontraron que Ler activa fuertemente la transcripción del promotor e incrementa los niveles de EspC secretada. Durante el trabajo realizado como parte de mi proyecto de tesis de licenciatura (Martínez-Santos, 2004), se obtuvieron resultados que permitieron confirmar y profundizar en esta observación y que sugieren que la regulación de *espC* por Ler es de manera directa.

Con el proyecto de licenciatura se determinó la localización del inicio de transcripción de *espC*, el cual corresponde a una G ubicada a 118 pb corriente arriba del codón de inicio del gen. Las cajas -10 y -35 del promotor tienen la secuencia consenso para promotores dependientes de σ^{70} . En ausencia de secuencias corriente arriba del promotor, éste se expresa en forma constitutiva, lo cual indica que existen elementos que deben estar involucrados en la regulación positiva y negativa. También se determinó que H-NS actúa como represor al ejercer un efecto negativo sobre la expresión de *espC* y que Ler actúa como desrepresor, ya que se requiere para eliminar la represión.

El análisis de fusiones transcripcionales que contienen recortes de la región reguladora de *espC* hacia el extremo 5' permitieron proponer que Ler se une entre las posiciones -287 y -210 , mientras que H-NS lo hace entre las posiciones -121 y -58 . Además es probable que ambas se unan corriente abajo del promotor. Sin embargo, dichas observaciones aún requieren confirmarse y analizarse en detalle para proponer el mecanismo de acción, lo cual se plantea como uno de los objetivos en el presente proyecto.

III. HIPÓTESIS

Las interacciones de Ler y H-NS con la región reguladora de *espC* para regular positiva o negativamente su expresión, respectivamente, involucran sitios exclusivos de unión para Ler o para H-NS, así como sitios donde ambas sobrelapan. De forma similar Ler regula la expresión de otros genes de la isla como *espG2*.

IV. OBJETIVOS

GENERAL:

- Estudiar la regulación y organización transcripcional de los genes codificados en la isla de patogenicidad *espC* de EPEC.

PARTICULARES:

- Determinar los sitios de unión de las proteínas Ler y H-NS sobre la región reguladora del gen *espC*.
- Analizar la regulación de los genes *espG2*, *rorf4* y *rorf5* que son aledaños a *espC*.

ESPECIFICOS:

- Purificar las proteínas Ler-6XHIS y H-NS-6XHIS por columna de afinidad a níquel.
- Determinar los sitios de unión de Ler y H-NS por ensayos de retardamiento de banda y ensayos de protección a DNAsa I.
- Construir fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* con las regiones reguladoras de los genes *espG2*, *rorf4* y *rorf5*.
- Analizar la expresión de estas fusiones en las cepas de EPEC wt, Δ *ler* y *E. coli* MC4100 wt.
- Determinar los inicios de transcripción de estos genes y mapear sus promotores.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

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

Tabla 3. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

CEPAS	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
E2348/69	EPEC silvestre O127:H6	Nal ^r J. B. Kaper
Δler	E2348/69 con una eliminación en fase de <i>ler</i> .	Nal ^r Laboratorio
$\Delta hns::Km$	E2348/69 con una inserción <i>hns::Km</i>	Nal ^r , Km ^r Laboratorio
MC4100	F' <i>araD139</i> Δ (<i>argF-lac</i>) U169 <i>rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	Sm ^r Casadaban, M.J., 1976
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>)	Invitrogen
BL21	F' <i>ompT hsdS_B</i> (<i>r_B-m_B-</i>) <i>gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen
PLÁSMIDOS		
pMPM-T6	Vector de clonación derivado del p15A que contiene un promotor inducible por arabinosa.	Mayer, M.P., 1995
pT6HNS	Derivado del pMPM-T6 que expresa H-NS-His ₆ bajo el control de un promotor inducible por arabinosa.	Laboratorio
pT6Ler	Derivado del pMPM-T6 que expresa Ler-His ₆ bajo el control de un promotor inducible por arabinosa.	Laboratorio
pKK232-8	Derivado del pBR322 que contiene el gen <i>cat</i> (cloranfenicol acetil transferasa) sin promotor, utilizado para la construcción de fusiones transcripcionales.	Pharmacia Biotech
pESPC-401	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>espC-cat</i> de la región -401 a +143 con respecto al inicio de transcripción.	Martínez-Santos, 2004
pESPC-401+1	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>espC-cat</i> de la región -401 a +1 con respecto al inicio de transcripción.	Este estudio.

pESPC-43	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>espC-cat</i> de la región -43 a +143 con respecto al inicio de transcripción.	Martínez-Santos, 2004
pESPC-58	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>espC-cat</i> de la región -58 a +143 con respecto al inicio de transcripción.	Martínez-Santos, 2004
pESPC-58+1	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>espC-cat</i> de la región -58 a +1 con respecto al inicio de transcripción.	Este estudio.
pESPG2-735	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>espG2-cat</i> de la región -735 a +112 con respecto al inicio de la transcripción de <i>espG2</i> .	Este estudio.
pESPG2-404	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>espG2-cat</i> de la región -404 a +112 con respecto al inicio de la transcripción de <i>espG2</i> .	Este estudio.
pESPG2-126	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>espG2-cat</i> de la región -126 a +112 con respecto al inicio de la transcripción de <i>espG2</i> .	Este estudio.
pESPG2-126+344	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>espG2-cat</i> de la región -126 a +344 con respecto al inicio de la transcripción de <i>espG2</i> .	Este estudio.
pRORF4-510	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>rorf4-cat</i> de la región -510 a +35 con respecto al ATG de <i>rorf4</i> .	Este estudio.
pRORF4-152	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>rorf4-cat</i> de la región -152 a +35 con respecto al ATG de <i>rorf4</i> .	Este estudio.
pRORF5-186	Derivado del pKK232-8 que contiene la fusión transcripcional <i>rorf5-cat</i> de la región -186 a +42 con respecto al ATG de <i>rorf5</i> .	Este estudio.

V.2 Oligonucleótidos

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

Los oligonucleótidos pKK232-BHI-F y pKK232-H3-R (utilizados en la secuenciación de DNA), *ompA* y *orf3* (utilizados en la reacción de “primer extension”) se marcaron con [³²P]- γ ATP y con la enzima T4 polinucleótido cinasa (Amersham) con la siguiente mezcla de reacción:

Oligonucleótido (25 μ M)	0.4 μ l
Regulador de cinasa 10 x	1.0 μ l
[³² P]- γ ATP	0.6 μ l
Enzima T ₄ PNK (USB, 30 U/ μ l)	0.2 μ l
Agua	7.8 μ l

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

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

OLIGO.	SECUENCIA 5' - 3'	CARACTERÍSTICAS	USO	FRAGMENTO AMPLIFICADO
espC-1N	ATG-AGA-TGG-ATC-CGT-CGC-AAC-G	Genera un sitio de <i>Bam</i> HI. Fwd. ^a	pESPC-401+1	427 pb
espC-11	AAC-TAA-CAA-AGC-TTC-AAT-GTT	Genera un sitio de <i>Hind</i> III. Rev. ^b	pESPC-401+1	427 pb
orf2	TAT-ACT-ACC-GGA-TCC-AAT-TTT-GTT	Genera un sitio de <i>Bam</i> HI. Fwd.	pESPG2-735	850 pb
orf3	GAC-TGA-GCT-AAG-CTT-GAC-TGA-ATA	Genera un sitio de <i>Hind</i> III. Rev.	pESPG2-735 pESPG2-126	850 pb 240 pb
orf3-2	TTG-GCT-GTA-GGA-TCC-CCA-GCA-ATC	Genera un sitio de <i>Bam</i> HI. Fwd.	pESPG2-126 pESPG2-126+344	240 pb
orf3-3	CCA-TCC-GAA-AAG-CTT-GCC-TGC-ACT	Genera un sitio de <i>Hind</i> III. Rev.	pESPG2-126+344	470 pb
rorf4	TTA-TCA-GTA-AAG-CTT-GGA-ACA-AAA	Genera un sitio de <i>Hind</i> III. Rev.	pRORF4-510 pRORF4-152	540 pb 190 pb
rorf5	ATA-GTG-AAA-GGA-TCC-CTA-TGA-ATC	Genera un sitio de <i>Bam</i> HI. Fwd.	pRORF4-510 pRORF5-186	540 pb 230 pb
rorf4-F	GAT-AAA-CCA-GGA-TCC-CAC-AAC-GGT	Genera un sitio de <i>Bam</i> HI. Fwd.	pRORF4-152	190 pb
rorf5-R	AAT-GAT-AGT-AAG-CTT-ACT-GTT-GTT	Genera un sitio de <i>Hind</i> III. Rev.	pRORF5-186	230 pb
espC-43+1F	AAA-CAT-TGA-TGA-GTT-GTA-AGC-TTG-TGG-CTC-TTA-TGG-TTG-A	Genera un sitio de <i>Hind</i> III. Fwd. Complementario al siguiente.	pESPC-58+1	PCR inverso
espC-43+1R	TCA-ACC-ATA-AGA-GCC-ACA-AGC-TTA-CAA-CTC-ATC-AAT-GTT-T	Genera un sitio de <i>Hind</i> III. Rev. Complementario al anterior.	pESPC-58+1	PCR inverso
Ler-NCO	TTA-AAC-CAT-GGG-GAG-ATT-ATT-T	Región estructural de <i>ler</i> . Fwd.	EMSAs	410 pb
Ler-Xho	TTT-TCT-CGA-GAA-TAT-TTT-TCA-GCG-GTA-TTA	Región estructural de <i>ler</i> . Rev.	EMSAs	410 pb
pKK232-BHI-F	GGA-ATT-CTC-GGG-GAT	Incluye parte del pKK y el sitio de <i>Bam</i> HI. Fwd.	secuenciación de fusiones	-----
pKK232-H3-R	GTT-TTG-TCC-TAC-TCA-AGC	Incluye parte del pKK y el sitio de <i>Hind</i> III. Rev.	secuenciación de fusiones	-----
ompA	TTT-GCG-CCT-CGT-TAT-CAT-CCA-A	Región estructural de <i>ompA</i> .	"primer extension"	-----

a. A favor. b. Reverso.

V.3 Construcción de fusiones transcripcionales

Para la construcción de las fusiones espC-401+1, espG2-735, espG2-126, espG2-126+344, rorf4-510, rorf4-152 y rorf5-186 se utilizaron oligonucleótidos listados en la Tabla 4, con los cuales se realizaron las reacciones de PCR, utilizando como molde DNA genómico de la cepa EPEC E2348/69 NaI^r y la enzima *Taq* polimerasa (Altaenzymes).

Se utilizaron los siguientes ciclos:

94° C	5 min.	1 ciclo	* Estas condiciones variaron de acuerdo a la T _m de los oligonucleótidos y a los tamaños de los fragmentos, respectivamente.
94° C	1 min.	} 30 ciclos	
55° C*	1 min.		
70° C	1 min.*		
70° C	10 min.	1 ciclo	

Una vez obtenidos los productos de PCR, se precipitaron utilizando el método de cloroformo:alcohol isoamílico y acetato de potasio como se describe a continuación:

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

Después de resuspender los DNA's, se digirieron con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III (Invitrogen) de la siguiente manera: a 30 µl de DNA se le adicionaron 5 µl del regulador de *Hind*III 10 x, 14 µl de agua y 1 µl de *Hind*III, se incubó la reacción a 37°C por 3 hrs. Después se le agregó 1 µl de *Bam*HI y se incubó a 37°C por otras 3 hrs. Posteriormente, se concentró el DNA con una columna Microcon-100 (Amicon, Millipore),

de acuerdo a las instrucciones del fabricante. En seguida, se realizaron las reacciones de ligación con los insertos y el vector pKK232-8 digerido también con *Bam*HI y *Hind*III, en una relación 3:1 respectivamente, utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Promega) como se menciona a continuación:

Se prepararon las mezclas poniendo 3 μ l del vector, 1 μ l del inserto y 13 μ l de agua. Estas mezclas se incubaron 10 min a 65°C, luego 10 min a 4°C. Posteriormente se les añadió 4 μ l de regulador de ligasa 5X (Invitrogen) o 2 μ l de regulador 10X (Promega) y 1 μ l de enzima T4 DNA ligasa. Se mezclaron, se centrifugaron y finalmente se incubaron a 4°C toda la noche.

Se transformó la cepa de *E. coli* MC4100 (silvestre) con 10 μ l de cada reacción de ligación por electroporación, se recuperaron en medio SOC (contiene bacto triptona 2 g, extracto de levadura 0.5 g, NaCl 5 M 0.2 ml, KCl 1 M 0.25 ml, MgCl 1 M 1 ml, MgSO₄ 1 M 1 ml y glucosa 0.36 g aforado 100 ml) a 37°C por 3 horas, y se cultivaron en agar LB con ampicilina 100 μ g/ml para seleccionar aquellas que tuvieran el plásmido. Posteriormente, se eligieron varias colonias y se les extrajo el plásmido por Miniprep como se describe a continuación:

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

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

Para la construcción de la fusión espG2-404 se partió del plásmido pESPG2-735 purificado, el cual se digirió con las enzimas de restricción *Sma*I y *Eco*RV para recortar la región reguladora de *orf2*. Primero se trató con la enzima *Sma*I, para lo cual se preparó la mezcla añadiendo 80 μ l de DNA, 9 μ l de agua, 10 μ l del buffer de la enzima 10X y 1 μ l de enzima. La mezcla se incubó por 5 hr y media a 30°C. Posteriormente se le añadió 33.5 μ l de agua, 15 μ l del buffer de *Eco*RV 10X y 1.5 μ l de enzima. La mezcla se incubó toda la noche a 37°C. La digestión se analizó en un gel de agarosa al 1% para ver que liberara el fragmento. Después se purificó el plásmido digerido con el estuche Gene Clean II (Q-Bio-Gene) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Una vez que se tuvo el plásmido purificado se preparó la mezcla para la reacción de ligación: 10 μ l de plásmido, 5 μ l de agua, 4 μ l de buffer de ligasa 10X y 0.5 μ l de T4 DNA ligasa (Promega). La reacción se incubó toda la noche a 37°C. Posteriormente se transformó a la cepa MC4100 silvestre con 10 μ l de la ligación por electroporación, se recuperó en medio SOC por 2 hr y después se cultivó en LB agar con ampicilina. Se seleccionaron algunas clonas a las cuales se les extrajo el plásmido por Miniprep (como se mencionó anteriormente) y se analizaron en un gel de agarosa al 1%. Para seleccionar aquellas que tuvieran la fusión, se digirieron con las enzimas *Hind*III y *Bam*HI (como se mencionó anteriormente), se eligió aquella que no liberara un fragmento.

Todas las fusiones se secuenciaron, ya fuera por el método de terminación por dideoxinucleótidos de Sanger (Sanger *et al.*, 1977), utilizando el estuche de secuenciación Thermo Sequenase de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Amersham, Inc.), o fueron secuenciadas por la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM.

V.4 PCR inverso

La fusión espC-58+1 se construyó con los oligonucleótidos espC-43+1F y espC-43+1R (Tabla 4), los cuales son complementarios. Con estos oligonucleótidos se realizó la reacción de PCR inverso utilizando como molde DNA de la fusión espC-58 y la siguiente mezcla de reacción:

H ₂ O MQ	23.5 µl
Regulador de la enzima 10X	5.0 µl
MgSO ₄ (100 nM)	3.0 µl
dNTP's (5.2 mM)	5.0 µl
Oligo. 1 (100 ng/µl)	1.5 µl
Oligo. 2 (100 ng/µl)	1.5 µl
DNA (50 – 100 ng)	10.0 µl
<i>Pfu</i>	2.0 µl

Las condiciones que se utilizaron fueron las siguientes:

94° C	5 min	1 ciclo
94° C	45 seg	} 18 ciclos
60° C	1 min	
70° C	12 min	

Cuando se tuvo el PCR se le añadió 1.5 µl de la enzima *DpnI*, se incubó a 37° C por 1.5 hrs. Posteriormente se electroporaron 5 µl en la cepa de *E. coli* DH5α y se incubó por 2 hr a 37°C en medio SOC para recuperación. Después se cultivaron en agar LB suplementado con ampicilina para seleccionar a las colonias que tuvieran el plásmido. Se eligieron 30 colonias al azar y se les extrajo el plásmido por Miniprep como se mencionó anteriormente. Después se digirieron los plásmidos con la enzima *HindIII*: se puso 10 µl de DNA, 7 µl de agua, 2 µl de buffer 10X y 1 µl de enzima y se incubaron las reacciones a 37°C por 1.5 hr. Las digestiones se analizaron en un gel de acrilamida nativa (30.8%) al 6%. Se escogió un plásmido de los que liberaron un inserto y se secuenció para comprobar que estuviera bien. Para purificar el plásmido abierto se calentó por 10 min a

65°C y se cargó en un gel de agarosa al 1%, se cortó la banda y se purificó con el estuche Gene Clean II (Q-Bio-Gene) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Ya que se obtuvo el plásmido purificado se realizó la reacción de ligación: se pusieron 8 µl de agua y 7 µl del plásmido purificado, se incubó por 10 min a 65°C, luego 10 min a 4°C, se añadieron 4 µl del regulador de ligasa 5X y 1 µl de T4 DNA ligasa (Invitrogen). Se mezcló y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente se transformó a la cepa DH5α con 10 µl de la ligación, se incubó por 2 hr a 37°C en medio SOC y posteriormente se plaquearon 600 µl en medio con ampicilina para seleccionar las clonas que tuvieran el plásmido. Cuando se obtuvo la clona se le extrajo el plásmido y se secuenció para ver que estaba bien. Posteriormente se transformó a las cepas EPEC silvestre, Δler , Δhns y MC4100 silvestre con 4 ml del plásmido.

V.5 Ensayo de actividad de CAT

La determinación de la actividad de las fusiones transcripcionales al gen *cat* se realizó como se describió anteriormente (Puente *et al.*, 1996). Brevemente, las cepas transformadas con las fusiones se cultivaron en 50 ml de LB adicionado con Ap en un baño con agitación a 37°C toda la noche. Los cultivos se ajustaron a una DO₆₀₀ de 1.0 con regulador salino de fosfatos 1x (PBS, contiene 80 g NaCl, 6.1 g Na₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄, 2 g KCl en un litro, pH 7.4), se tomó 1 ml para inocular 50 ml de medio (DMEM) suplementado con Ap y se incubaron en agitación. Se tomó 1 ml de muestra de cada cultivo a las DO₆₀₀ de 0.8 y 1.0. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min a 4°C y las pastillas se lavaron con 800 µl de regulador TDTT (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, DTT 3µM) y, posteriormente, se resuspendieron en 300 µl de TDTT. Para obtener los extractos crudos las muestras se sonicaron con 3 pulsos de 1 min y se centrifugaron a 10,000 rpm por 25 min a 4°C.

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

KC3. La actividad específica de CAT se determinó dividiendo la actividad obtenida entre la concentración de proteína de cada extracto.

V.6 Purificación de proteínas Ler-6XHIS y H-NS-6XHIS

Las proteínas Ler y H-NS unidas a histidinas se purificaron como se describió anteriormente (Barba *et al.*, 2005). Brevemente, se cultivó a la cepa BL21 conteniendo a los plásmidos pT6Ler y pT6HNS (Tabla 1) en un tubo de ensayo con 5 ml de medio LB suplementado con tetraciclina y se incubó a 37°C en agitación toda la noche. Al día siguiente se inocularon 2 matraces con 100 ml de LB adicionados con tetraciclina y 1 ml del preinóculo y se incubaron a 37°C en agitación hasta una DO_{600} de 0.7. Posteriormente, se indujeron con L-(+)-arabinosa (Sigma-Aldrich) en una concentración final de 0.1% y se incubaron por 4 hr más. Después se empaquetaron las células centrifugando a 10,000 rpm por 5 min a 4°C. Se resuspendió la pastilla en 5 ml de solución de urea pH 8 (buffer de unión, ver apéndice 1) y se dividió en alícuotas de 750 μ l, las cuales se sonicaron con 5 pulsos de 45 segundos, después se centrifugaron 20 min a 10,000 rpm a 4°C. Con una jeringa se tomó el sobrenadante y se filtró con una membrana de 0.22 μ m (Millipore). Las muestras se purificaron bajo condiciones desnaturalizantes por cromatografía de afinidad utilizando una columna de sefarsa-níquel conectada a un minicromatógrafo ÄKTA prime (Amersham Pharmacia Biotech). Las proteínas se eluyeron con un gradiente de pH (pH 8.0 a 4.5) utilizando una solución de urea pH 4.5 (buffer de elución, apéndice 1). Las fracciones colectadas se etiquetaron y se guardaron a -20°C.

Posteriormente las fracciones que contenían a las proteínas se dializaron a 4°C en buffer de renaturalización conteniendo concentraciones decrecientes de urea (4 M, 1 M y 0.2 M) por 3 horas contra cada buffer, y por último, contra un buffer de almacenamiento sin urea (EDTA 3 mM) por 3 hr (ver apéndice 1). Una vez dializadas las fracciones se juntaron y se cuantificaron por el método de Bradford. La pureza se verificó por electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS. Posteriormente se hicieron alícuotas de 100 μ l y se almacenaron a -70°C.

V.7 Ensayo de retardamiento de banda (EMSA)

Los ensayos de retardamiento de banda, o ensayos de cambio en la movilidad electroforética (“Electrophoretic Motility Shift Assay”) proveen un método simple, rápido y extremadamente sensible para detectar la secuencia de DNA específica de unión de una proteína. Las proteínas que se unen específicamente a una secuencia de DNA retardan la movilidad del fragmento durante la electroforesis, resultando en bandas discretas que corresponden a los complejos DNA-proteína (Fried and Crothers, 1981).

Para la realización de estos ensayos se amplificaron los fragmentos donde se propone que se unen Ler y H-NS por PCR utilizando la siguiente mezcla de reacción:

H ₂ O MQ	62.6 µl
Regulador de enzima 10X	10.0 µl
MgSO ₄ (50 mM)	5.0 µl
dNTP's (5.2 mM)	16.0 µl
Oligonucleótido 1 (25 µM,)	2.0 µl
Oligonucleótido 2 (25 µM,)	2.0 µl
DNA (50-100 ng)	2.0 µl
<i>Taq</i> polimerasa (Altaenzymes)	0.4 µl

Posteriormente los productos se purificaron y concentraron usando una columna Microcon-100 (Amicon, Millipore) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los fragmentos concentrados se pusieron en contacto con concentraciones crecientes de Ler-6XHIS o H-NS-6XHIS (purificadas y dializadas) en regulador de unión (HEPES pH 7.8 40 mM, MgCl₂ 8 mM, KCl 45 mM, DTT 1 mM, NP₄O 0.05%, BSA 0.1 mg/ml). La reacción se incubó por 20 min a temperatura ambiente y, posteriormente, se cargaron las muestras en un gel de acrilamida nativa al 5% (acrilamida 30%, bisacrilamida 0.4%) y se corrieron a 97 V a temperatura ambiente en regulador de corrida TBE (0.5X). Al término, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador Alpha Imager.

El EMSA de competencia se realizó como se mencionó anteriormente con algunas modificaciones: primero se puso la reacción con una concentración fija de H-NS, se

incubó por 20 min a temperatura ambiente, después se añadió Ler en concentraciones crecientes y se incubó por otros 20 minutos, posteriormente las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida nativa al 5%. El gel se corrió a temperatura ambiente a 97 V, se tiñó con bromuro de etidio y se observó en un transiluminador Alpha Imager.

V.8 Determinación del inicio de transcripción por “primer extension”

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

Las reacciones de “primer extension” se hicieron como se describió anteriormente (Martínez-Laguna *et al.*, 1999) con algunas modificaciones. Para la reacción se utilizó el oligonucleótido marcado con ^{32}P (orf3) y 10 μ g de RNA en NaCl 5M, Tris H-Cl 1M pH 8, agua DEPC calentando 3 minutos a 90°C y después enfriando lentamente hasta 50°C. Las reacciones de transcripción se hicieron a 44°C por una hora y media con la enzima transcriptasa reversa AMV (Invitrogen) adicionando además DTT 100 mM y dNTP's 10 mM, así como inhibidor de RNasa (Invitrogen, 40 U/ μ l). Los productos se purificaron y concentraron usando una columna Microcon-30 (Amicon, Millipore), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Al final, se adicionaron 4 μ l de regulador de formamida. Las muestras fueron desnaturalizadas calentándolas a 80°C por 3 minutos y se corrieron en un gel de poliacrilamida 8%/ urea 7 M/ TBE. El gel se secó al vacío a 80°C y se expuso en una pantalla de PhosphorImager. Como control se utilizó el oligonucleótido ompA y RNA tanto de la cepa silvestre como de la mutante en *ler*.

Para las reacciones de secuencia se utilizaron los oligonucleótidos orf3 y pKK-H3R, así como DNA cromosomal de la cepa EPEC silvestre y DNA de las fusiones pORF3-1 y pORF3. Las reacciones se hicieron como se mencionó anteriormente.

VI. RESULTADOS

VI.1 La región no codificante de *espC* ejerce un efecto silenciador sobre la expresión del gen.

Previamente se determinó, mediante experimentos de “primer extension” y ensayos de inmunodetección, que Ler regula de manera positiva la expresión de *espC*, mientras que H-NS lo hace de manera negativa (Elliott *et al.*, 2000; Martínez-Santos, 2004). El análisis de la región reguladora de *espC* con fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* conteniendo recortes del extremo 5', permitió sugerir que el posible sitio de unión de Ler está localizado en la región comprendida entre las posiciones -287 y -210 y el de H-NS entre -121 y -58 (Martínez-Santos, 2004). En relación a lo anterior, el mecanismo de regulación propuesto para los operones *LEE2* y *LEE3*, los cuales también son regulados por Ler y H-NS, involucra sitios de unión para H-NS (denominados SRS1 y SRS2, por secuencia reguladora silenciadora) que flanquean la región reguladora divergente de ambos operones, y que permiten la generación de un complejo nucleopresor que reprime su expresión. Estos sitios se encuentran dentro de la secuencia codificante del primer gen (*orf12*) del operón *LEE3* (SRS1), o en la secuencia que se localiza corriente abajo del promotor de *sepZ*, el primer gen del operón *LEE2* (SRS2). Así mismo, involucra un sitio de unión de Ler en la misma región donde se localiza uno de los sitios de unión de H-NS (SRS1), el cual permite que la interacción de Ler desestabilice al complejo represor dando lugar a la expresión de los genes blanco (Bustamante *et al.*, 2001 y datos no publicados). Tomando esto en consideración, para determinar si en el caso de *espC*, además de los sitios previamente identificados corriente arriba del promotor, existen motivos involucrados en la regulación del gen corriente abajo del promotor, o dentro de la región estructural, se construyeron las fusiones transcripcionales *espC*-401+1 y *espC*-58+1 (Fig. 7), las cuales carecen de dichas secuencias.

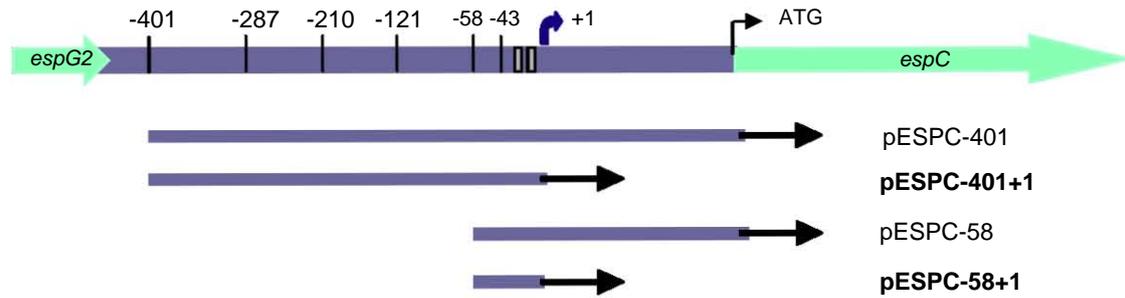


Fig. 7. Esquema de las fusiones transcripcionales de *espC* utilizadas en este estudio. Se indican las posiciones que abarcan con respecto al inicio de transcripción. Las fusiones construidas en este trabajo se indican en negritas.

Como se puede observar en la figura 8, la fusión *espC*-401 (que abarca la región reguladora completa) tiene una actividad de aproximadamente 600 unidades en la cepa de EPEC silvestre crecida en condiciones de inducción (DMEM a 37°C en agitación), mientras que no se expresa en un fondo mutante en *ler* y su actividad aumenta aproximadamente 4 veces en un fondo mutante en *hns*. Al comparar su actividad con la de la fusión *espC*-401+1, la cual no contiene la región transcrita no codificante de *espC* (posiciones +1 a +118), se observa que en la cepa silvestre su expresión aumenta aproximadamente 4 veces con respecto a la fusión *espC*-401, además de que muestra una actividad de aproximadamente 300 unidades en ausencia de Ler (como 15% de la actividad en la cepa silvestre), lo que sugiere que a la fusión *espC*-401+1 se le está eliminando un sitio de regulación negativa. En la cepa mutante en *hns* esta fusión tiene un aumento de aproximadamente 57% con respecto a su actividad en la cepa silvestre. Estos resultados indican que el sitio eliminado participa parcialmente en la regulación negativa de *espC*; sin embargo, esta regulación es, aparentemente, independiente de H-NS y Ler, ya que la regulación mediada por estas dos proteínas es proporcionalmente similar a la observada con la fusión *espC*-401. A diferencia de lo observado para los operones *LEE2* y *LEE3*, el mecanismo de regulación de *espC* por Ler y H-NS parece involucrar solamente sitios localizados corriente arriba del inicio de transcripción.

Por otro lado, la fusión *espC*-58, como ya se había visto, se expresa aproximadamente 3 veces más con respecto a la fusión *espC*-401 en el fondo silvestre y, a diferencia de esta fusión, su expresión es independiente de Ler, presentando la misma

actividad tanto en la cepa silvestre como en la Δler (Fig. 8). Sin embargo, su expresión aumenta aproximadamente 2.5 veces en la cepa Δhns con respecto a su actividad en la cepa silvestre. El aumento de actividad de la fusión espC-58 con respecto a la fusión espC-401 parece deberse a que la primera carece del probable sitio de unión de H-NS previamente propuesto, aunque el aumento adicional en la expresión en la cepa Δhns no descarta que H-NS siga actuando alrededor del promotor. Sin embargo, el que la expresión de esta fusión sea independiente de Ler en ausencia de dicha región, sugiere que el papel de Ler, al igual que para los operones *LEE2* y *LEE3*, es el de eliminar la represión ejercida por H-NS como propusimos anteriormente (Martínez-Santos, 2004). Al igual que lo ocurrido con la fusión espC-401+1, cuando a la fusión espC-58 se le elimina la región no codificante para crear la fusión espC-58+1, se observa un incremento de la actividad en los tres fondos genéticos probados. La actividad aumenta poco más de dos veces con respecto a la actividad de la fusión espC-58 en el fondo silvestre y sigue siendo independiente de Ler, pero su actividad en la cepa Δhns aumenta aproximadamente 47%.

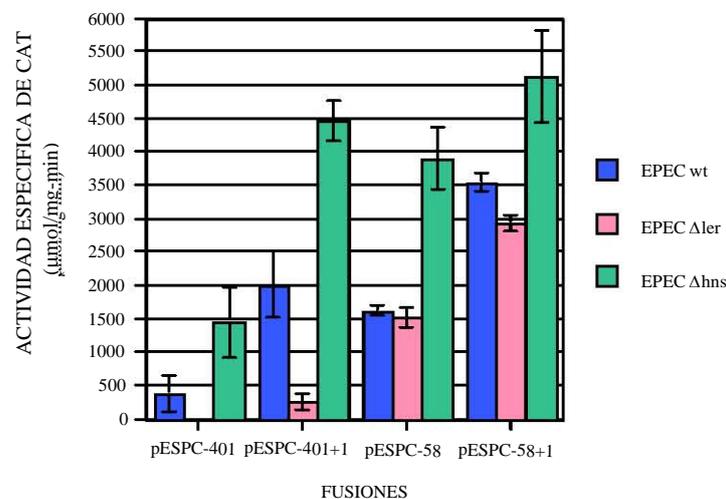


Fig. 8. Ensayo de actividad de CAT. Las cepas de EPEC E2348/69 silvestre, Δler y Δhns fueron transformadas con las fusiones espC-401, espC-401+1, espC-58 y espC-58+1 y cultivadas en medio DMEM en agitación a 37°C. Las barras representan las actividades obtenidas de muestras tomadas a una $DO_{600} = 1.0$ y son el resultado promedio de tres ensayos independientes con duplicado. Con cada barra se muestra la desviación estándar.

El aumento en la expresión de las fusiones espC-401+1 y espC-58+1 con respecto a las fusiones espC-401 y espC-58, respectivamente, sugiere que a las primeras se les

está eliminando un sitio de regulación negativa, el cual corresponde a la región no codificante de *espC* de 118 pb de largo. Esta región podría ser un sitio de unión de H-NS; sin embargo, como se muestra más adelante, H-NS no se une a un fragmento que abarca dicha región. Alternativamente, dada la longitud de esta región, cabe la posibilidad de que al ser transcrita forme una estructura secundaria que actúe como atenuador de la expresión de *espC*.

Existen varios reportes de genes cuyas regiones líderes son inusualmente largas, y las estructuras encontradas en estas regiones no traducidas por lo regular están involucradas en regulación tanto a nivel transcripcional como traduccional (Lesnik *et al.*, 2005). Para determinar si la región no codificante de *espC* puede formar alguna estructura, se realizó un análisis de predicción de estructura secundaria de RNA con el software "Mfold web server" (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>) (Zuker, 2003). De acuerdo a los resultados de este análisis, al parecer esta región tiene el potencial de formar una estructura secundaria (datos no mostrados). Sin embargo, harían falta más experimentos para demostrar su papel en la regulación y definir el mecanismo.

Con el fin de determinar si sobre la región estructural de *espC* existen sitios de unión para las proteínas reguladoras Ler y H-NS, se construyó la fusión *espC*-43+330, la cual abarca aproximadamente 200 pb más dentro de la región estructural que las fusiones analizadas previamente (*espC*-401 y *espC*-58). Esta fusión se utilizó para realizar ensayos de actividad de CAT, utilizando como controles las fusiones *espC*-401 y *espC*-43 (datos no mostrados). El resultado de este ensayo no mostró ninguna diferencia en el patrón de expresión de la fusión *espC*-43+330 con respecto a la fusión *espC*-43 en ninguno de los 3 fondos genéticos (EPEC silvestre, Δ *ler* y Δ *hns*), ya que al igual que ésta, su expresión es independiente de Ler y aumenta en ausencia de H-NS. Esto sugiere que sobre la región estructural de *espC* no existen elementos involucrados en regulación.

Juntos, estos resultados nos indican que además de los sitios de unión de Ler y H-NS corriente arriba del promotor, la región no traducida también interviene en la regulación de *espC* modulando negativamente su expresión, mientras que en la región estructural no se encuentran elementos reguladores.

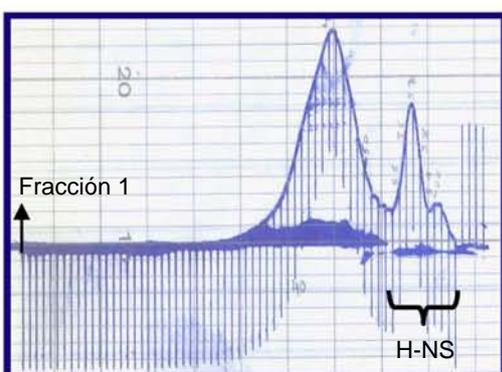
VI.2 Purificación de Ler-6XHIS y H-NS-6XHIS

Para poder localizar los sitios de unión de Ler y H-NS y determinar si en la región no traducida existe otro sitio de unión de H-NS, se decidió hacer ensayos de retardamiento de movilidad electroforética (EMSA). Para esto, primero se purificaron las proteínas Ler-6XHIS y H-NS-6XHIS bajo condiciones desnaturalizantes por cromatografía de afinidad a níquel utilizando un minicromatógrafo ÄKTA prime system (Amersham Pharmacia Biotech) (como se menciona en Materiales y Métodos). En los cromatogramas (Fig. 9A y C) se pueden observar dos picos, el primero corresponde a las proteínas presentes en el extracto total de la bacteria, mientras que el segundo corresponde a las fracciones donde se tiene a la proteína de interés pura. En base a estas gráficas se tomaron las fracciones que forman el segundo pico y se analizaron por SDS-PAGE en un gel de acrilamida al 12%. Como se puede ver en las figuras 9B y 9D las proteínas de interés (H-NS y Ler, respectivamente), fueron purificadas con un buen nivel de pureza. Posteriormente, de cada proteína se tomaron las 4 fracciones más enriquecidas (indicadas en negritas) y se dializaron como se mencionó en Materiales y Métodos. Dichas fracciones se juntaron y se les añadió DTT y β -mercaptoetanol en una concentración final de 3 mM y 30 mM, respectivamente, para después almacenarlas a -70°C . Ambas proteínas se cuantificaron por el método de Bradford, dando las siguientes concentraciones:

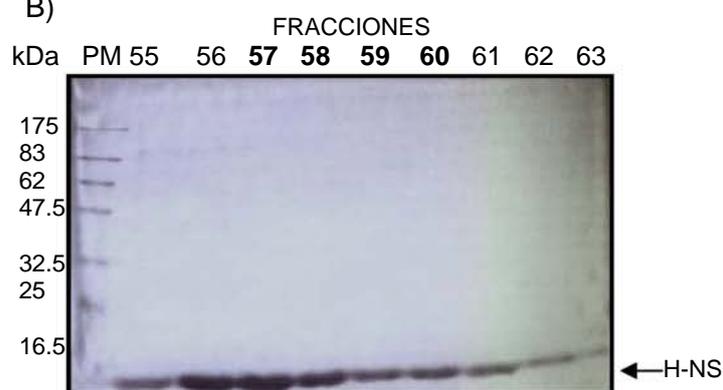
Ler = $5.26 \mu\text{g} / \text{ml}$

H-NS = $68.2 \mu\text{g} / \text{ml}$

A)



B)



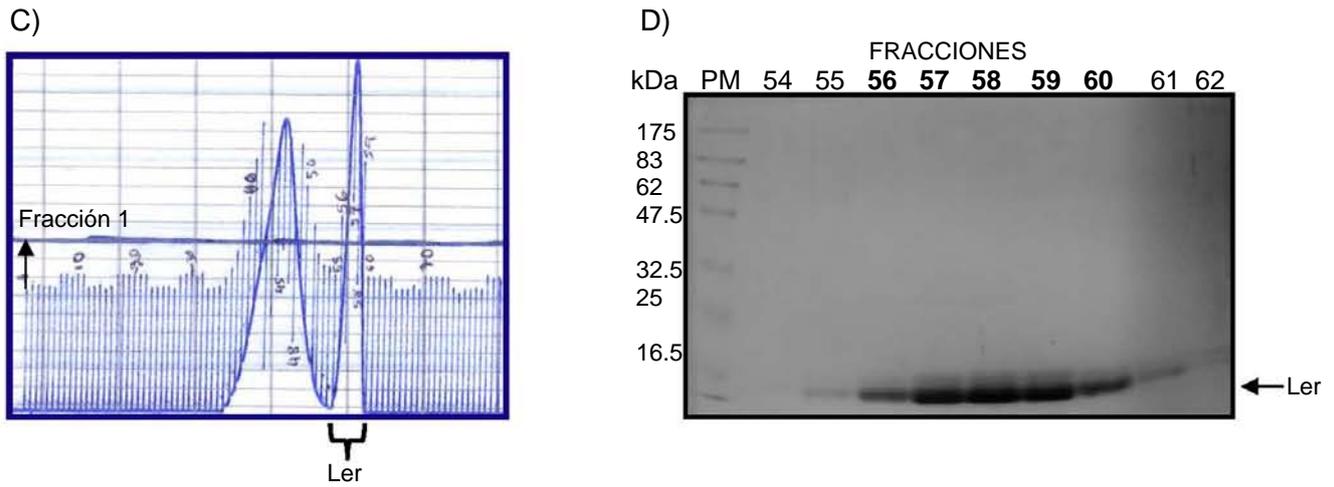


Fig. 9. Purificación de las proteínas H-NS-6XHIS y Ler-6XHIS. A) y C) Cromatogramas de la purificación de H-NS y Ler, respectivamente. El segundo pico indica las fracciones donde se tiene a la proteína pura. B) y D) SDS-PAGE al 12%. Se cargaron 30 μ l de cada una de las fracciones que forman el segundo pico. En negritas se indican las fracciones que se dializaron. PM corresponde al marcador de peso molecular, a un lado se indican los pesos moleculares de cada banda expresados en kDa.

VI.3 Ler se une sobre la región reguladora de *espC* entre las posiciones -287 y -210

Una vez obtenidas las proteínas puras y renaturalizadas se procedió a realizar los ensayos de retardamiento. Para confirmar que Ler se une a la región reguladora de *espC* y empezar a mapear su sitio de unión, se realizó un ensayo de retardamiento con el fragmento *espC*-401, el cual abarca toda la región reguladora de *espC* (desde la posición -401 a +143) (Fig. 10).

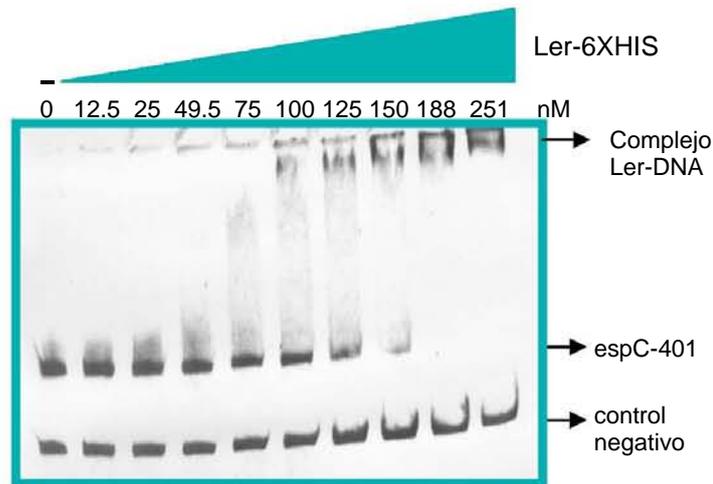


Fig. 10. EMSA con el fragmento espC-401 y Ler. La proteína Ler purificada se incubó con el fragmento espC-401 a temperatura ambiente. La interacción se analizó en un gel de acrilamida al 5%, se tiñó con bromuro de etidio y se observó con un transiluminador Alpha-Imager. Como control negativo se utilizó la región estructural del gen *ler*, a la cual ya se ha visto que Ler no se une. En la parte de arriba se indican las concentraciones (nM) de Ler utilizadas.

Como se puede apreciar en la figura 10, Ler se une a la región reguladora completa de *espC*, la cual empieza a retardar a partir de una concentración de 100 nM y se observa un retardo completo con una concentración de 188 nM. Esto corrobora que en la región reguladora de *espC* existe un sitio de unión para Ler. Como control negativo se utilizó un fragmento que contiene la región estructural del gen *ler*, la cual se ha visto que no contiene sitios de unión de Ler y por tanto no retarda (Carrillo-Sánchez, datos no publicados). Para corroborar la localización del sitio de unión corriente arriba del promotor y determinar si existe otro sitio de unión corriente abajo de éste, se realizó un ensayo de retardamiento utilizando los fragmentos espC-401+1 y espC-43. El primero abarca la región reguladora hasta el promotor, mientras que el segundo abarca del promotor hacia el inicio de la región estructural. Como control positivo se utilizó el fragmento espC-401 (Fig. 11).

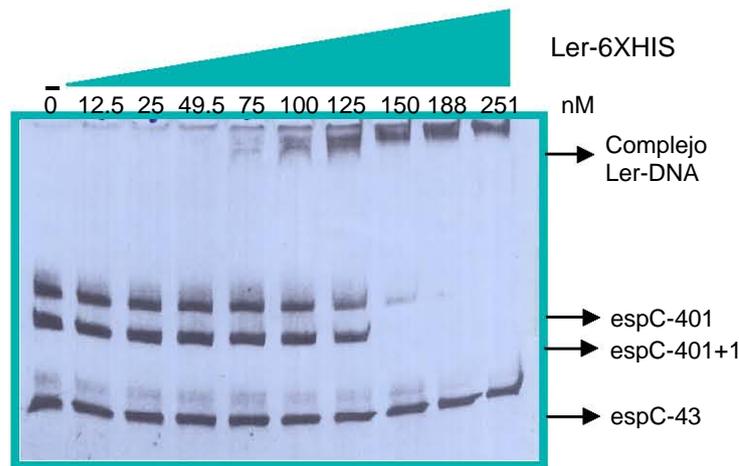


Fig. 11. EMSA con los fragmentos espC-401+1 y espC-43 y Ler. La proteína Ler purificada se incubó con los fragmentos espC-401+1 y espC-43 a temperatura ambiente. La interacción se analizó en un gel de acrilamida al 5%, se tiñó con bromuro de etidio y se observó con un transiluminador Alpha-Imager. Como control positivo se utilizó el fragmento espC-401. En la parte de arriba se indican las concentraciones (nM) de Ler utilizadas.

Como se puede ver en la figura 11, los fragmentos espC-401+1 y espC-401 se retardan de manera similar a una concentración entre 150 y 188 nM. Por su parte, se observa que el fragmento espC-43 no retarda, lo cual sugiere que en este fragmento no existe un sitio de unión de Ler. Estos resultados nos corroboran que el sitio de unión de Ler se encuentra corriente arriba del promotor; sin embargo, con estos ensayos no se definió con mayor precisión su localización. Para tratar de delimitar el sitio de unión de Ler se hizo un ensayo de retardamiento con los fragmentos espC-287, espC-210 y espC-121 (Fig. 12). Anteriormente se determinó, mediante análisis de fusiones transcripcionales, que Ler podría unirse alrededor de las posiciones -287 y -210 (Martínez-Santos, 2004). Los resultados de este análisis mostraron que la actividad de las fusiones que abarcan hasta las posiciones -401 y -287 (con respecto al sitio de inicio de la transcripción), es tres veces mayor que fusiones que abarcan hasta las posiciones -210 y -121, sugiriendo que entre las posiciones -287 y -210 existe un sitio involucrado en la regulación positiva, probablemente necesario para la unión de Ler. Estos antecedentes permiten predecir que el fragmento espC-287 se retardaría de manera similar que el fragmento espC-401, mientras que el fragmento espC-210 debería retardar menos y el espC-121 no se retardaría.

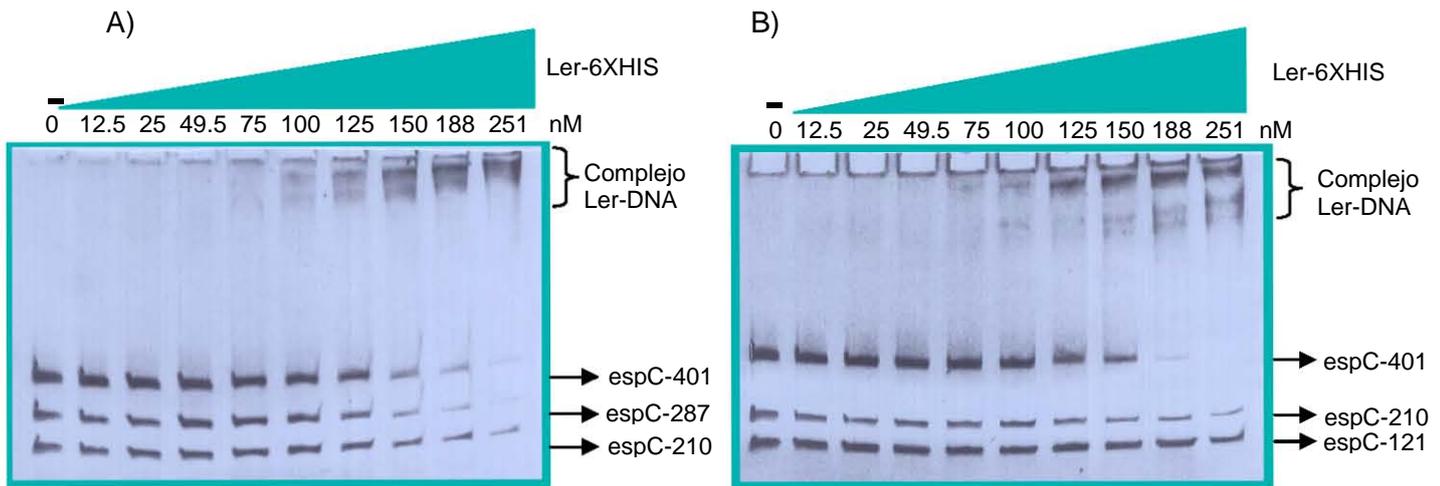


Fig. 12. EMSA con los fragmentos espC-287, espC-210 y espC-121 y Ler. La proteína Ler purificada se incubó con los fragmentos espC-287 y espC-210 (panel A) y espC-210 y espC-121 (panel B) a temperatura ambiente. La interacción se analizó en un gel de acrilamida al 5%, se tiñó con bromuro de etidio y se observó con un transiluminador Alpha-Imager. Como control positivo se utilizó el fragmento espC-401. En la parte de arriba se indican las concentraciones (nM) utilizadas de Ler.

En la figura 12A, se puede observar que efectivamente el fragmento espC-287 retarda de manera similar que el fragmento espC-401, mientras que el fragmento espC-210 retarda menos. Al hacer el retardo con el fragmento espC-121 se observa que prácticamente no se retarda (Fig. 12B). Estos resultados nos confirman que el sitio de unión de Ler se localiza alrededor de las posiciones -287 y -210 .

VI.4 H-NS se une entre las posiciones -210 y -121 de la región reguladora de *espC*

Como se mencionó anteriormente, durante mi trabajo de tesis de licenciatura se determinó que H-NS regula de manera negativa la expresión de *espC*, ya que en un fondo mutante en *hns* de EPEC o de *E. coli* MC4100, la actividad de las fusiones transcripcionales que llevan recortes de la región reguladora de *espC* no solo aumenta con respecto a la cepa silvestre, sino que es similar para todas las fusiones (Martínez-Santos, 2004). Se observó también que en la cepa silvestre la fusión -58 presenta un incremento de actividad de aproximadamente 10 veces con respecto a la de la fusión espC-121, la cual aparentemente carece del sitio de unión de Ler como se describe

arriba. Así mismo, presenta la mayor actividad en la cepa mutante en *ler*, donde se observa una actividad transcripcional independiente de Ler incluso desde la fusión -210 (Martínez-Santos, 2004). Por lo anterior, se propuso que entre las posiciones -210 y -58 se encuentra un sitio de regulación negativa, probablemente de pegado de H-NS.

Para determinar si H-NS se une a la región reguladora de *espC* y delimitar dónde, se hizo un ensayo de retardamiento con los fragmentos *espC*-401, *espC*-401+1 y *espC*-43. En la figura 13 se muestra que el frgamento -401, que contiene toda la región reguladora de *espC*, incluyendo parte del gen estructural (hasta la posición +143), se empieza a retardar con una concentración de 262 nM y retarda completamente a 502 nM.

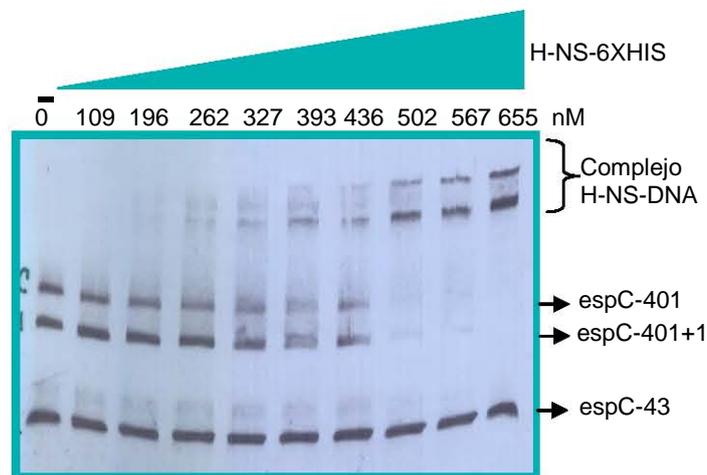


Fig. 13. EMSA con los fragmentos *espC*-401+1 y *espC*-43 y H-NS. La proteína H-NS purificada se incubó con los fragmentos *espC*-401, *espC*-401+1 y *espC*-43 a temperatura ambiente. La interacción se analizó en un gel de acrilamida al 5%, se tiñó con bromuro de etidio y se observó con un transiluminador Alpha-Imager. Se indican las concentraciones (nM) de H-NS utilizadas.

El retardamiento del fragmento *espC*-401+1 es similar al del fragmento *espC*-401, mientras que el fragmento *espC*-43 no se retarda. Por su parte, el fragmento *espC*-43+330, el cual contiene una porción mayor del gen estructural a la contenida en el fragmento *espC*-43, no se retarda (datos no mostrados).

Para delimitar el sitio de unión de H-NS corriente arriba del promotor se realizaron ensayos de retardamiento con los fragmentos espC-287, espC-210 y espC-121 (Fig. 14).

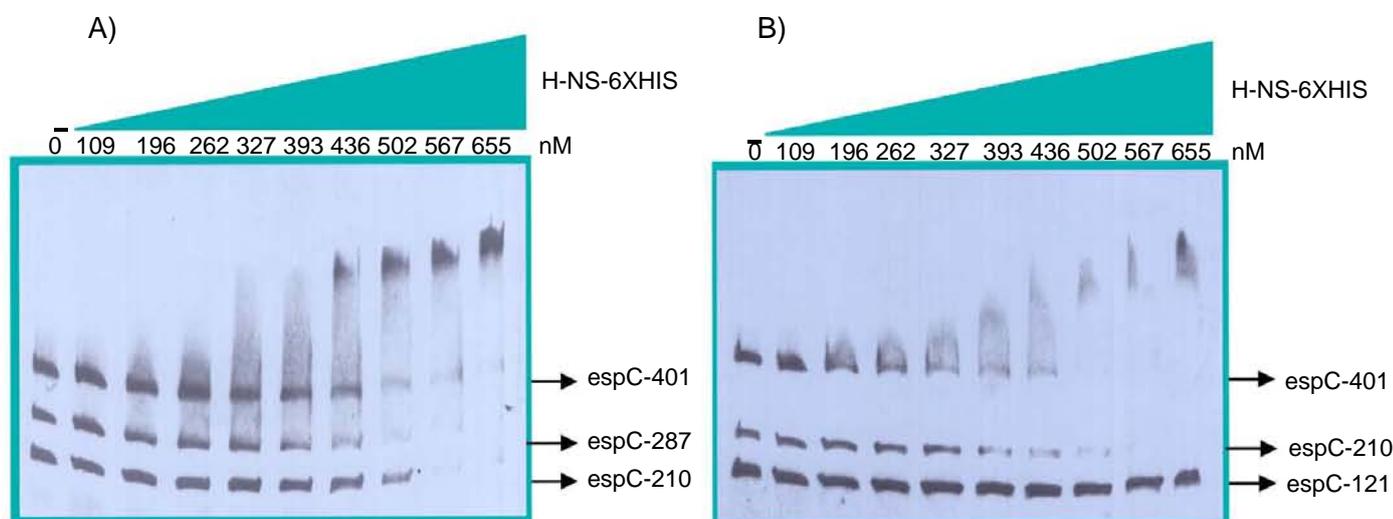


Fig. 14. EMSA con los fragmentos espC-287, espC-210 y espC-121 y H-NS. La proteína H-NS purificada se incubó con los fragmentos espC-287 y espC-210 (panel A) y espC-210 y espC-121 (panel B) a temperatura ambiente. La interacción se analizó en un gel de acrilamida al 5%, se tiñó con bromuro de etidio y se observó con un transiluminador Alpha-Imager. Como control positivo se utilizó el fragmento espC-401. Arriba se indican las concentraciones (nM) de H-NS utilizadas.

Como se puede observar en la figura 14A, los fragmentos espC-401 y espC-287 retardan de manera similar, observándose la formación de un complejo a partir de una concentración de 436 nM, mientras que el fragmento espC-210 empieza a retardar con una concentración de 567 nM. Para los tres fragmentos se observa retardo casi por completo con una concentración de 655 nM. Este resultado sugiere que el sitio de unión de H-NS abarca un poco corriente arriba de -210 y se extiende hacia abajo de esta posición. Por otro lado, cuando se probó el fragmento espC-121 no se observó un retardo (Fig. 14B), lo cual contrasta con la poca actividad que esta fusión presenta en comparación a la espC-58, la cual muestra mayor actividad incluso en ausencia de Ler (Martínez-Santos, 2004). Lo anterior puede deberse a que la región comprendida entre las posiciones -210 a -58 incluye un sitio de nucleación para H-NS, el cual se requiere para la eficiente represión de *espC*. Así, para el fragmento espC-121, que es una molécula lineal, el sitio de unión de H-NS carece de las secuencias corriente arriba de esta posición, por lo que la proteína podría no pegarse establemente y se desprenda del DNA durante el ensayo. En el contexto de la fusión transcripcional las secuencias del vector darían algo de estabilidad a la unión *in vivo* y, por lo tanto, represión parcial.

Juntos, estos resultados nos sugieren que H-NS tiene sólo un sitio de unión o nucleación localizado corriente arriba del promotor alrededor de las posiciones –210 y –58.

VI.5 Ler complementa la actividad de *espC* en *E. coli* K12

Con el fin de determinar si Ler es el único regulador positivo necesario para la expresión de *espC*, se realizó un ensayo de complementación proveyendo a Ler a partir de un plásmido. Para esto se transformó a la cepa de *E. coli* K12 MC4100 silvestre con las fusiones *espC*-401, *espC*-121 y *espC*-58. Posteriormente, las cepas resultantes se transformaron con el plásmido pMPM-T3-*ler*, que contiene al gen que codifica para la proteína Ler de EPEC, así como con el vector pMPM-T3 como control. Como se observa en la figura 15A, la fusión *espC*-401 no se expresa en ausencia de Ler, pero cuando se complementa la actividad de la fusión aumenta hasta aproximadamente 600 unidades, que es similar a la actividad que presenta en EPEC silvestre (Martínez-Santos, 2004; Fig. 8) y a la actividad independiente de Ler que presenta la fusión *espC*-58 (que es la fusión más activa) en la cepa MC4100. Cabe señalar que el aumento en la expresión no se debe a un efecto del vector, ya que cuando se complementa con éste no se observa ningún aumento. Este resultado confirma el papel de Ler como regulador positivo de *espC*. Sin embargo, llama la atención que la fusión *espC*-58 no alcanza la actividad que presenta en la cepa Δ *ler* de EPEC, la cual es aproximadamente 3.5 veces más alta que la observada para la fusión *espC*-401 en la cepa silvestre (Fig. 8) o la observada en *E. coli* K12 en ausencia de H-NS, la cual es 5 veces más alta (Martínez-Santos, 2004). Esto sugiere que en EPEC podría haber un factor adicional específico, además de Ler, que se requiere para la óptima expresión de *espC*.

Como se esperaba, la complementación de las fusiones *espC*-121 y *espC*-58 con Ler no modifica su actividad con respecto a la observada en ausencia de Ler. La fusión *espC*-121 al carecer del sitio de unión de Ler, pero no del de H-NS, se mantiene reprimida, mientras que la fusión *espC*-58, al carecer de ambos sitios se expresa independientemente de Ler. Este resultado corrobora que el sitio de unión de Ler se encuentra corriente arriba de la posición –121. Como control positivo se utilizó la fusión de *LEE2*, *sepZ*-11 (Bustamante *et al.*, 2001), la cual es regulada por Ler, y como se

puede observar en la figura 15B, aumenta considerablemente su expresión cuando se complementa con el plásmido que codifica para Ler, demostrando su funcionalidad.

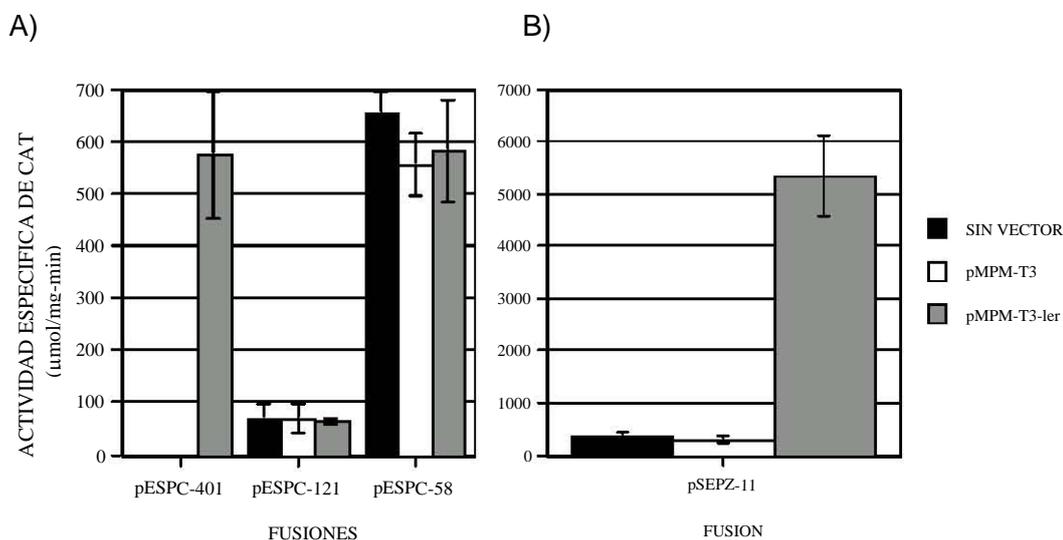


Fig. 15. Ensayo de complementación en *E. coli* MC4100. El plásmido pMPM-T3-ler y el vector pMPM-T3 fueron introducidos en la cepa MC4100 silvestre conteniendo las fusiones espC-401, espC-121 y espC-58 (panel A). Las cepas se cultivaron en DMEM a 37°C con agitación. Las barras representan las actividades obtenidas de muestras tomadas a una DO₆₀₀ de 1.0 y son el resultado promedio de tres experimentos independientes con duplicado. Con cada barra se muestra la desviación estándar. Como control se utilizó la fusión sepZ-11 (Bustamante *et al.*, 2001) (panel B).

VI.6 La unión de Ler provoca la desestabilización de los complejos formados por H-NS.

En nuestro laboratorio se ha propuesto que el mecanismo por el cual Ler elimina la represión ejercida por H-NS sobre los promotores de los operones *LEE2* y *LEE3* involucra que Ler al unirse provoca, en parte, la disociación de H-NS de algunos de sus sitios de unión al DNA en el SRS1, así como un cambio en la conformación del DNA que desfasa las moléculas de H-NS aún unidas al SRS1, con respecto a las del SRS2 evitando la formación del complejo nucleopresor. Con el fin de evaluar cual es el mecanismo por el que Ler elimina la represión mediada por H-NS sobre la región contenida entre las posiciones -210 a -58, se realizó un ensayo de competencia mediante EMSA utilizando ambas proteínas y el fragmento espC-401+1. Se espera que si

al unirse Ler, H-NS se disocia del DNA por completo, entonces se observará la formación gradual de un complejo con Ler y la desaparición gradual del complejo con H-NS. Sin embargo, si los sitios primarios de unión de Ler son diferentes a los de H-NS y su unión al DNA no disocia por completo a H-NS, pero induce un cambio conformacional del complejo, entonces podría observarse la formación de un complejo intermedio al formado por cada proteína individualmente.

Para esto se realizó un ensayo de retardamiento en gel preparando primero la reacción de interacción con H-NS a una concentración fija de 727 nM. Posteriormente, se agregaron concentraciones crecientes de Ler y se volvieron a incubar para permitir que Ler se uniera. Como se observa en la figura 16, en presencia sólo de H-NS (carril 2) se observa la formación de un complejo, mientras que cuando se pone únicamente Ler en una concentración de 25 nM (carril 3) no se forma ningún complejo, pero a una concentración de 100 nM (carril 4) se observa el complejo que migra justo debajo de la entrada del pozo del gel, lo cual lo distingue del formado por H-NS. Cuando al complejo preformado con H-NS se le agrega Ler en una concentración de 25 nM (carril 5) se sigue observando principalmente el complejo de H-NS, sin embargo, también se inicia la formación de un complejo con Ler, el cual curiosamente no se observa con Ler sola a esta concentración. Esto sugiere que la unión de H-NS al DNA expone mejor los sitios de unión de Ler, aumentando ligeramente su afinidad. Con una concentración de Ler de 49.5 nM (carril 6) se observa un complejo un poco más intenso a la entrada del pozo. Cuando se agregan concentraciones más altas de Ler (75.3 y 100 nM) se observa la formación de un complejo más pesado que se mantiene cerca del pozo del gel, mientras que el complejo con H-NS se va desestabilizando. A concentraciones de 150 y 200 nM de Ler, el complejo preformado parece migrar ligeramente por arriba de donde migra el complejo sólo con H-NS.

La formación de un complejo intermedio se ha observado anteriormente (Ibarra et al., datos no publicados) al hacer un ensayo parecido con un fragmento que contiene la SRS1, una región localizada sobre la secuencia estructural del gen *orf12*, el primer gen del operón *LEE3*, donde se unen Ler y H-NS. Al hacer un ensayo de inmunodetección con anticuerpos contra H-NS biotinilada y Ler, observan que en este complejo intermedio se encuentran tanto Ler como H-NS, aunque parte de H-NS se disocia del DNA. El resultado mostrado en la figura 16 sugiere que la unión de Ler sobre el DNA provoca

principalmente la disociación de H-NS, ya que se forma un complejo que migra a la altura del formado únicamente por Ler, aunque no es capaz de quitar completamente a H-NS, por lo que se forman complejos aparentemente híbridos. Cabe señalar que en este experimento se utiliza una concentración de H-NS que podría estar saturando al DNA, lo cual podría dificultar que Ler la desplace por completo.

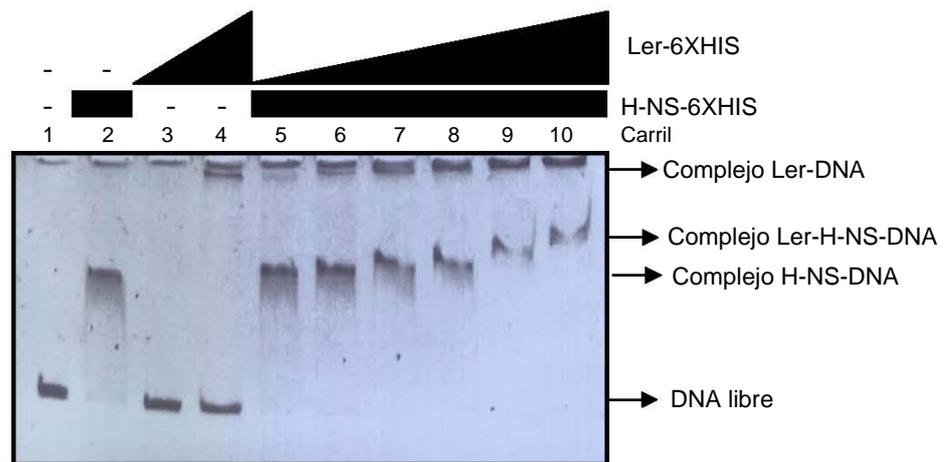


Fig. 16. Ensayo de competencia con Ler y H-NS. Para la realización de este ensayo se utilizó el fragmento *espC*-401+1. H-NS se utilizó a una concentración fija de 727 nM (carriles 2 y 5-10); y Ler a concentraciones crecientes: 0 nM (carriles 1 y 2), 25 nM (carril 3), 100 nM (carril 4), 25 nM (carril 5), 49.5 nM (carril 6), 75.3 nM (carril 7), 100 nM (carril 8), 150 nM (carril 9), 200 nM (carril 10). H-NS se incubó primero con el DNA para preformar el complejo H-NS-DNA. Posteriormente, se adicionaron las diferentes concentraciones de Ler.

Este resultado sugiere que Ler elimina la represión por H-NS provocando su disociación del DNA.

VI.7 Análisis de la regulación de genes aledaños a *espC*

En Noviembre del 2000, Elliott y colaboradores reportaron que, además de regular a los genes de la isla LEE, Ler regula la expresión de fenotipos y proteínas codificadas fuera de esta isla, entre ellos *EspC*. Posteriormente, Grant y colaboradores (2003) al analizar el papel de la GTPasa BipA en la regulación de *ler* y de otros genes por RT-PCR,

observan que la transcripción de *espC* disminuye considerablemente en ausencia de BipA, mientras que la de *espG2* disminuye sólo ligeramente y la de *orf7* (de la misma isla) no se ve afectada. Concluyen que BipA regula positivamente la expresión de al menos 2 genes de la isla *espC* a través de Ler. Con el fin de corroborar este antecedente y determinar si, además de *espC*, en esta isla existen otros genes regulados por Ler, nos dimos a la tarea de analizar la regulación de los genes *espG2*, *rorf4* y *rorf5* que son aledaños a *espC*.

VI.8 Determinación del sitio de inicio de la transcripción de *espG2*

Como se mencionó anteriormente, el gen *espG2* codifica para una proteína de 390 aminoácidos que comparte el 63% de similitud con la proteína EspG de EPEC. EspG2 es secretada por el sistema de secreción tipo III codificado en el LEE (Matsuzawa *et al.*, 2004; Shaw *et al.*, 2005) y su gen se localiza a aproximadamente 450 pb corriente arriba de *espC* (Fig. 4). Setenta y siete pares de bases corriente arriba de *espG2* se encuentra un probable ORF denominado *orf2* de 162 pb (Fig. 4 y 17), el cual se ha visto que no tiene similitud con proteínas en la base de datos (Tabla 2). Corriente arriba de *orf2* está *rorf3*, el cual tiene similitud con una endopeptidasa neutral de *Lactococcus lactis* (Tabla 2). La región intergénica entre ambos genes es de 564 pb.

Debido a la poca distancia que existe entre el codón de paro de *orf2* y el codón de inicio de *espG2* se propuso que pudieran estar formando un operón, por lo que antes de iniciar con el análisis de la regulación de *espG2*, se decidió determinar su sitio de inicio de la transcripción y mapear su promotor. Para esto se realizó un experimento de “primer extension” utilizando RNA total de la cepa EPEC silvestre, crecida en medio DMEM a 37°C en agitación, y el oligonucleótido *orf3* (Tabla 3), el cual corresponde a la secuencia del gen cromosomal. De acuerdo al resultado de la figura 17A, el promotor de *espG2* tiene como sitio de inicio de la transcripción una A localizada a 72 pares de bases corriente arriba del sitio de inicio de la traducción de *espG2*. Con base en esto se localizaron las probables cajas -10 (TACAAT) y -35 (IGGAGG), las cuales contienen 5 y 3 (subrayadas), respectivamente, de las 6 bases presentes en secuencias -10 y -35 consenso para promotores dependientes de σ^{-} en *E. coli*. Cabe señalar que ambas cajas

se localizan dentro de la región estructural propuesta de *orf2*, ya que la caja -10 se localiza justo corriente arriba del codón de paro, mientras que la caja -35 se localiza 19 bases corriente arriba de la caja -10 (Fig. 17B). Este resultado indica que *espG2* se transcribe a partir de su propio promotor.

Con el fin de corroborar lo reportado por Grant y colaboradores, se incluyó en este experimento una reacción utilizando RNA total de la cepa EPEC E2348/69 Δ/er , sin embargo, la señal obtenida de ambas cepas es muy similar, sugiriendo que la expresión de *espG2* no depende de *Ler*. Como control se utilizó un oligonucleótido dirigido contra el transcrito del gen *ompA*, el cual posee un promotor constitutivo, para demostrar que se utilizó una concentración similar de RNA en ambas reacciones.

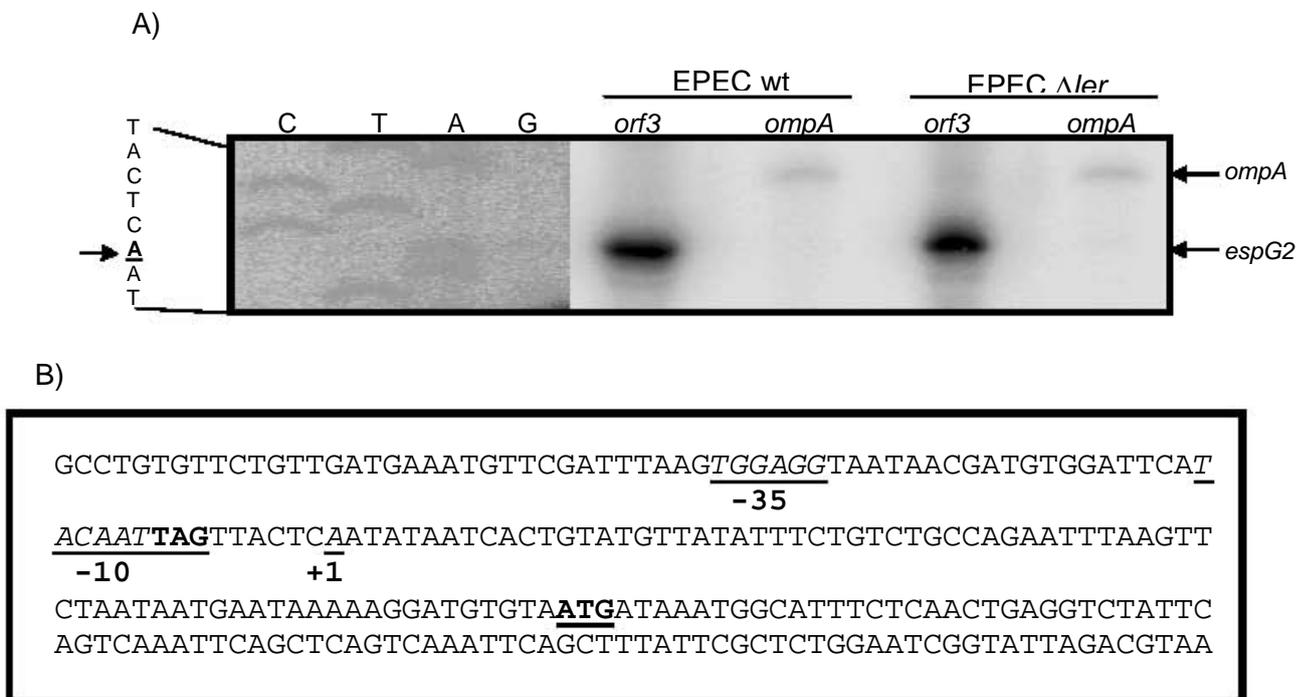


Fig. 17. Localización del promotor de *espG2*. A) "Primer extension" de *espG2*. Este experimento se realizó con RNA total de las cepas E2348/69 silvestre y Δ/er , extraído de muestras de cultivos en DMEM colectadas a una DO_{600} de 1.0. Para ambas muestras se utilizaron los oligonucleótidos *orf3* y *ompA* y 10 μ g de RNA para la reacción de transcripción reversa. La flecha indica el sitio de inicio de la transcripción. B) Secuencia nucleotídica de la región intergénica entre *orf2* y *espG2*. En negritas y subrayado se muestra el codón de inicio de *espG2* (ATG) y el codón de término de *orf2* (TAG). En cursiva y subrayado se indican el inicio de transcripción de *espG2* (+1) y las probables cajas -10 y -35.

VI.9 Análisis de la regulación de *espG2*

Para analizar la regulación de *espG2* se construyeron 4 fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* en el vector pKK232-8. Las fusiones *espG2*-735, *espG2*-404, *espG2*-126 y *espG2*-126+344 fueron generadas como se describe en “Materiales y Métodos”. Las tres primeras contienen fragmentos con un extremo 3' común cuyo límite es la posición +112 (con respecto al inicio de la transcripción de *espG2*). En particular, la fusión *espG2*-735 comprende desde la posición -735, la fusión *espG2*-404 comprende desde la posición -404 y la fusión *espG2*-126 comprende desde la posición -126 (con respecto al inicio de la transcripción de *espG2*), o el codón 16 de *orf2*. La cuarta fusión, *espG2*-126+344, comprende desde la posición -126 hasta +344 (codón 91) con respecto al inicio de la transcripción de *espG2*. En la figura 18 se muestra el esquema de las fusiones.

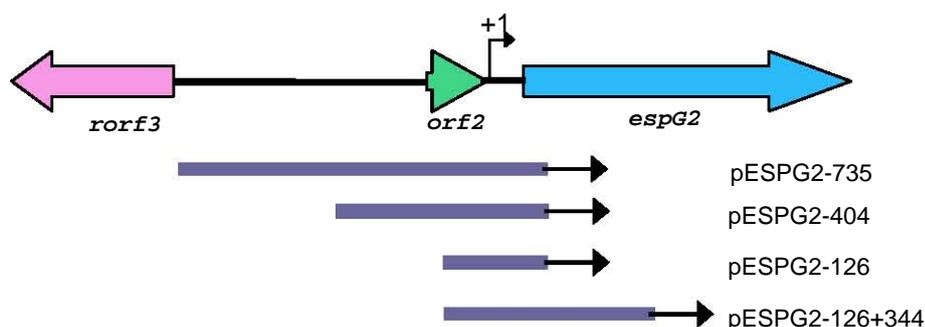


Fig. 18. Esquema de las fusiones transcripcionales de *espG2* al gen reportero *cat*. Se indica el sitio de inicio de la transcripción.

Una vez obtenidas, las fusiones de *espG2* fueron introducidas en las cepas EPEC E2348/69 silvestre y Δler y en la cepa silvestre de *E. coli* K12 MC4100. Las cepas resultantes se cultivaron en medio de cultivo para células eucariontes DMEM a 37°C en agitación, condiciones previamente reportadas como óptimas para la expresión de factores de virulencia en EPEC (Martínez-Laguna *et al.*, 1999; Puente *et al.*, 1996). Posteriormente se determinó la actividad específica para cada fusión a partir de muestras tomadas a diferentes densidades ópticas (Fig. 19).

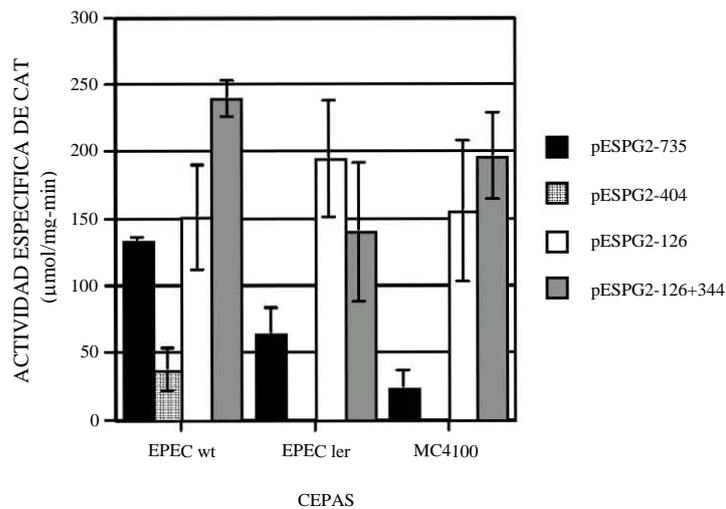


Fig. 19. Ensayo de actividad de CAT con las fusiones de *espG2*. Las cepas EPEC E2348/69 silvestre y Δ/ler y *E. coli* MC4100 silvestre fueron transformadas con las fusiones *espG2*-735, *espG2*-404, *espG2*-126 y *espG2*-126+344, y cultivadas en DMEM a 37°C en agitación. Las barras representan las actividades obtenidas de muestras tomadas a una DO_{600} de 1.0 y son el resultado promedio de tres ensayos independientes con duplicado. Con cada barra se muestra la desviación estándar.

La fusión más larga (*espG2*-735) muestra una expresión de aproximadamente 135 unidades en la cepa EPEC silvestre. Esta actividad se reduce a la mitad en la cepa Δ/ler y alrededor de 5 veces en la cepa MC4100, lo que sugiere que Ler participa en la regulación de *espG2*, aunque su expresión no depende tanto de Ler como *espC* (Figs. 8 y 15). En apoyo a lo anterior, la fusión *espG2*-404 no se expresa en las cepas MC4100 y EPEC Δ/ler pero sí en la cepa silvestre de EPEC, alcanzando una actividad de aproximadamente 40 unidades. La disminución de la actividad de esta fusión con respecto a la de la fusión *espG2*-735 en la cepa silvestre, sugiere que carece de un sitio de regulación positiva, y apoya la idea de que *espG2* es regulado por Ler. Por su parte, las fusiones *espG2*-126 y *espG2*-126+344 muestran una actividad similar o ligeramente mayor a la obtenida con la fusión más larga (*espG2*-735) en la cepa EPEC silvestre. Dicha actividad se mantiene también en la cepa mutante en *ler* y en la MC4100, sugiriendo que estas fusiones ya no dependen de Ler y, a su vez, que ya no están sujetas a algún tipo de regulación negativa. El aumento de actividad de las fusiones *espG2*-126 y *espG2*-126+344 con respecto a la fusión *espG2*-404, aún en ausencia de Ler, sugiere que corriente arriba de -126 se localiza un posible sitio de regulación negativa.

Estos resultados sugieren que la expresión de *espG2* es regulada por Ler, lo cual concuerda con lo reportado anteriormente (Grant *et al.*, 2003).

VI.10 Ler se une sobre la región reguladora de *espG2*

Debido a que el resultado del "primer extension" contrasta con el resultado de las fusiones y con lo reportado anteriormente, se decidió realizar un ensayo de retardamiento en gel para determinar si Ler se une sobre la región reguladora de *espG2*. Para este experimento se utilizó el fragmento de la fusión más larga (*espG2*-735), como control positivo se utilizó el fragmento *espC*-401 y como control negativo el fragmento *espC*-43. La interacción se llevó a cabo como se describe en "Materiales y Métodos". Como se observa en la figura 20, el fragmento *espG2*-735 se retarda por Ler aunque con una afinidad menor con respecto al fragmento *espC*-401, ya que éste empieza a retardarse a una concentración aproximada de 50 nM, mientras que el de *espG2* lo hace a una concentración de aproximadamente 100 nM.

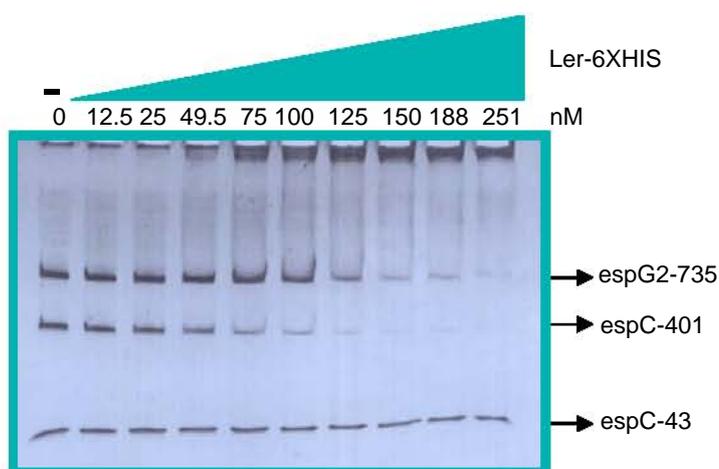


Fig. 20. Interacción de Ler con la región reguladora de *espG2*. El fragmento *espG2*-735 se incubó con concentraciones crecientes de Ler-6XHis purificada a temperatura ambiente. La interacción se analizó en un gel de acrilamida al 5%, se tiñó con bromuro de etidio y se observó con un transiluminador Alpha-Imager. Como control positivo se utilizó el fragmento *espC*-401 (correspondiente a la región reguladora de *espC*) y como control negativo el fragmento *espC*-43. Se indican las concentraciones de Ler utilizadas en nM.

Este resultado indica que Ler tiene la capacidad de interactuar con la región reguladora de *espG2* y, probablemente, que esta interacción es responsable de la regulación reportada anteriormente por Grant y colaboradores (2003) y observada con el resultado del ensayo de actividad de las fusiones (Fig. 19). Sin embargo, queda por aclarar la discrepancia observada con los experimentos de “primer extension”, donde la regulación mediada por Ler no es tan evidente.

VI.11 *espG2* no es reprimido por crecimiento en medio rico

Con el fin de determinar si, al igual que otros genes de virulencia de EPEC, *espG2* es reprimido por crecimiento en medio de cultivo rico, se llevó a cabo un ensayo utilizando a la cepa EPEC E2348/69 transformada con las fusiones *espG2*-735, *espG2*-404 y *espG2*-126. Las cepas resultantes se cultivaron en DMEM y LB a 37°C en agitación y, posteriormente, se determinó la actividad específica de cada fusión a partir de muestras obtenidas a una D.O. de 1.0 (Fig. 21).

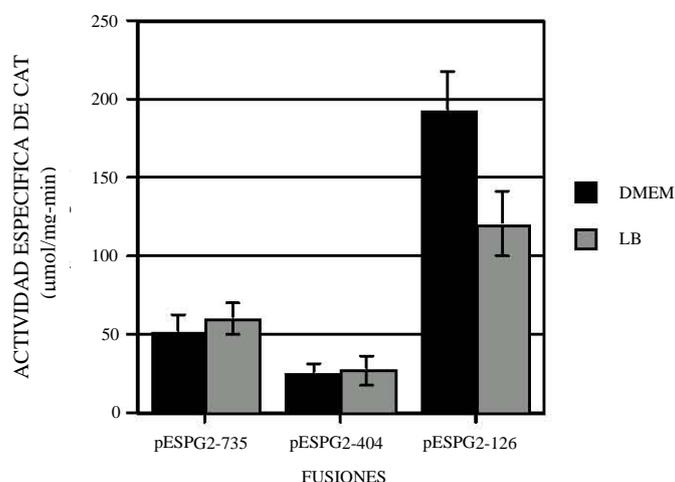


Fig. 21. Ensayo de actividad de CAT en DMEM y LB con las fusiones de *espG2*. La cepa EPEC E2348/69 silvestre se transformó con las fusiones *espG2*-735, *espG2*-404 y *espG2*-126 y se creció en DMEM o LB a 37°C en agitación. Las barras representan las actividades obtenidas de muestras tomadas a una DO_{600} de 1.0 y son el resultado promedio de tres ensayos independientes con duplicado. Con cada barra se muestra la desviación estándar.

La actividad de las fusiones *espG2-735* y *espG2-404* es similar en ambos medios. Como se señaló anteriormente, la fusión *espG2-126* es más activa que las dos primeras en DMEM y aunque lo sigue siendo en LB, en este medio muestra una ligera disminución.

Este resultado nos sugiere que *espG2* no presenta regulación por medio de cultivo como otros factores de virulencia, como por ejemplo *espC*, cuya actividad se reprime más del 70% en medio LB (Martínez-Santos, 2004).

VI.12 *rorf4* no es regulado por Ler, pero sí por crecimiento en medio rico

Los otros genes aledaños a *espC* que se analizaron fueron *rorf4* y *rorf5*, los cuales se localizan corriente abajo de *espC* (Fig. 4). Como se menciona en la introducción, *rorf5* tiene similitud con la proteína activadora NahR de *Pseudomonas putida*, mientras que *rorf4* tiene similitud con el citocromo b de *Anthropoides virgo* (Tabla 2). La región estructural de *rorf4* es de 380 pb. Corriente arriba se localiza *rorf5*, cuya región estructural es de 188 pb y la región intergénica entre ambos es de 134 pb. Ciento noventa pares de bases corriente arriba de *rorf5* se localiza *orf6.1*, el cual tiene similitud con 2 probables transposasas (Tabla 2).

Para analizar la regulación de *rorf4* y *rorf5* se construyeron 3 fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* en el vector pKK232-8. Las fusiones pRORF4-510, pRORF4-152 y pRORF5-186 fueron generadas como se describe en “Materiales y Métodos”. En particular, la fusión más larga (pRORF4-510) comprende desde la posición -510 a +35 con respecto al inicio de la traducción de *rorf4*, la fusión pRORF4-152 tiene el mismo límite que la anterior hacia el extremo 3' y abarca hasta la posición -152, incluyendo los últimos 5 codones de *rorf5*; mientras que la fusión pRORF5-186 comprende de las posiciones -186 hasta la posición +42 con respecto al inicio de la traducción de *rorf5* (incluyendo los primeros 13 codones del gen). En la figura 22 se muestra el esquema de las fusiones.

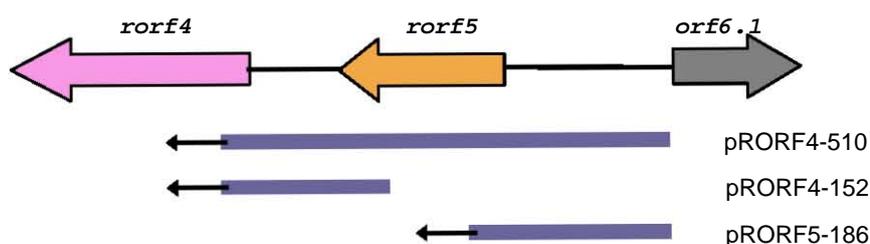


Fig. 22. Esquema de las fusiones transcripcionales de *rorf4* y *rorf5*.

Una vez obtenidas las fusiones se hicieron ensayos de actividad de CAT a partir de muestras de cultivos de las cepas EPEC E2348/69 y *E. coli* MC4100 transformadas con las fusiones arriba mencionadas, en DMEM y LB a 37°C en agitación (Fig. 23).

La fusión más larga (pRORF4-510) presenta una actividad de aproximadamente 180 unidades en EPEC crecida en DMEM, mientras que la fusión pRORF4-152 tiene una actividad de aproximadamente 500 unidades en la misma cepa (Fig. 23A). Este incremento de alrededor de 2.5 veces sugiere que entre las posiciones -510 y -152 existe una secuencia que permite modular negativamente la expresión de *rorf4*; sin embargo, no se puede descartar que la presencia de *rorf5* en la fusión más larga influya artificialmente en la actividad alcanzada por esta fusión. Estas fusiones presentan un perfil de expresión similar en *E. coli* MC4100, donde incluso la actividad aumenta de 1.5 a 2 veces. En contraste a lo observado para *espC*, estos datos sugieren que *rorf4* no es regulado por factores específicos de EPEC, aunque no podemos descartar que las fusiones carezcan de otros elementos importantes, por ejemplo contenidos dentro del gen estructural de *rorf4*, como se ha visto anteriormente para otros promotores regulados por Ler del LEE, como es el caso del primer gen del operón *LEE3* (Bustamante *et al.*, 2001). Por otro lado, la fusión pRORF5-186 no presenta actividad en ninguna cepa, lo cual puede deberse a varias alternativas, por ejemplo, que éste no es un gen funcional, que la fusión no contiene al promotor completo, o que no se utilizaron las condiciones de crecimiento adecuadas.

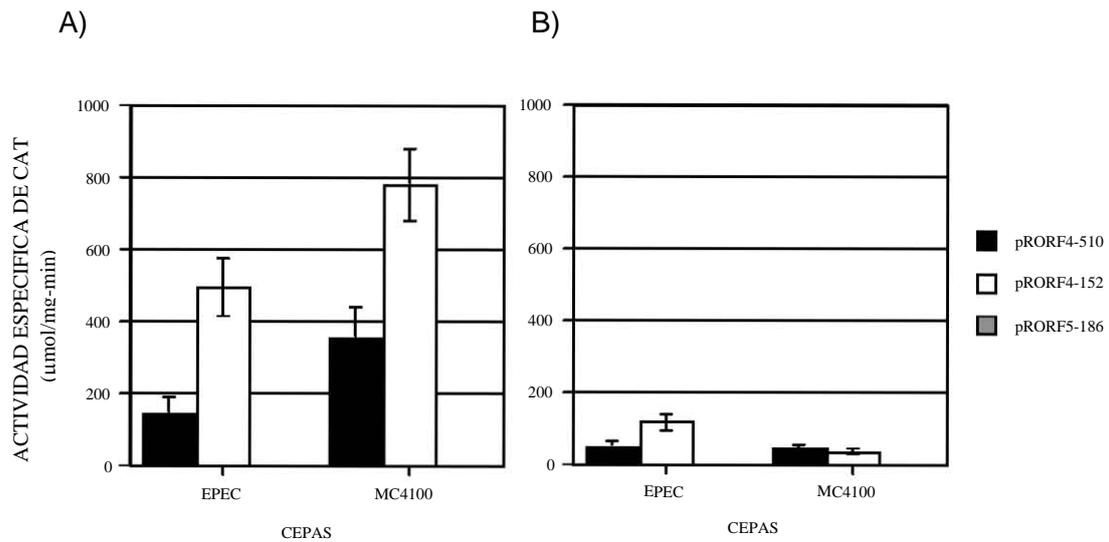


Fig. 23. Ensayo de actividad de CAT con las fusiones correspondientes a los genes *rorf4* y *rorf5*. Las cepas EPEC E2348/69 y *E. coli* MC4100 fueron transformadas con las fusiones pRORF4-510, pRORF4-152 y pRORF5-186 y cultivadas en medio A) DMEM o B) LB a 37°C en agitación. Las barras representan las actividades obtenidas de muestras tomadas a una DO_{600} de 1.0. y son el resultado promedio de tres ensayos independientes con duplicado. Con cada barra se muestra la desviación estándar. EPEC: EPEC E2348/69 silvestre, MC4100: *E. coli* K12 MC4100 silvestre.

Estos resultados indican que *rorf4* no es regulado por Ler, ya que en lugar de observarse una disminución de la expresión en la cepa MC4100, lo que se observa es un incremento. A diferencia de lo que ocurre con *espG2*, *rorf4* sí presenta regulación dependiente del medio de cultivo ya que la actividad de sus fusiones disminuye considerablemente, alrededor del 70% en medio LB con respecto a las actividades obtenidas de muestras en DMEM.

VII. DISCUSIÓN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es un patógeno entérico importante en humanos, ya que es la bacteria causante de diarrea más común en infantes (Nataro and Kaper, 1998). La virulencia de EPEC depende de un sistema de secreción tipo III codificado en la isla LEE, la cual también codifica para la proteína reguladora Ler (“LEE-encoded regulator”), que activa la expresión de varios operones policistrónicos y genes individuales dentro de la isla, así como la expresión de genes localizados fuera de ésta, entre ellos *espC*. Al igual que para la expresión de los operones *LEE2* y *LEE3* (Bustamante *et al.*, 2001), Ler parece antagonizar la represión ejercida por H-NS sobre el promotor de *espC* (Martínez-Santos, 2004); sin embargo, los detalles del mecanismo no se conocen. El análisis de este mecanismo, así como el papel de Ler en la regulación de otros genes de la isla *espC*, fueron los objetivos del presente trabajo.

Ensayos de retardamiento en gel (EMSA) confirmaron que Ler tiene un sitio de unión sobre la región reguladora de *espC* que se localiza corriente arriba del promotor, específicamente alrededor de las posiciones -287 y -210, el cual hemos denominado LBS (por “Ler binding site”). De acuerdo al análisis de la región reguladora de *espC* mediante fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* (Martínez-Santos, 2004), este sitio de unión es importante para la regulación positiva mediada por Ler, ya que fusiones a las que se les eliminó esta región (*espC*-210 y *espC*-121) mostraron niveles reducidos de actividad. Así mismo, fusiones que contienen esta región (*espC*-401, *espC*-287 y *espC*-401+1) necesitan de Ler para expresarse (Martínez-Santos, 2004; Fig. 15). Este dominio se localiza corriente arriba de una secuencia involucrada en la regulación negativa de *espC*, localizada alrededor de las posiciones -210 y -58, cuya eliminación permite niveles más altos de activación del promotor en ausencia de Ler. La importancia del LBS en la regulación positiva de *espC* concuerda con la alta afinidad que muestra Ler por esta región. Así mismo, tanto ensayos de retardamiento como ensayos de actividad de CAT realizados con la fusión *espC*-43+330 (datos no mostrados), indican que no existe un sitio de unión de Ler adicional corriente abajo del promotor.

H-NS también se une sobre la región reguladora de *espC*, específicamente, alrededor de las posiciones -210 y -58, a este sitio se le denominó HBS (por “H-NS binding site”). Al igual que Ler, H-NS parece sólo tener un sitio de unión, ya que en el EMSA mostrado

en la figura 13 no se observó retardo con el fragmento espC-43, como tampoco con el fragmento espC-43+330 (datos no mostrados). Sin embargo, todas las fusiones utilizadas a lo largo de este proyecto aumentan su actividad en un fondo mutante en *hns* (Martínez-Santos, 2004; Fig. 8), lo cual nos sugiere que esta proteína podría estar actuando directamente sobre el promotor o corriente abajo de éste. Aunque no fue posible detectar unión de H-NS sobre el promotor o la región no traducida de *espC* en los ensayos de retardamiento, debido a la evidencia experimental obtenida *in vivo* no podemos descartar que H-NS se una sobre esta región. Diferentes posibilidades podrían explicar la falta de unión *in vitro*, por ejemplo, los fragmentos lineales utilizados para los EMSAs podrían no adquirir la estructura que reconoce H-NS *in vivo* que permita que la interacción se lleve a acabo o sea suficientemente estable, como sucedería en el contexto de las fusiones; alternativamente, H-NS podría estar actuando sobre el promotor durante o después de la formación del complejo cerrado de transcripción, donde la interacción de la RNA polimerasa puede generar cambios estructurales importantes en la región que permitan ahora la interacción de H-NS. Sin embargo, éstas y otras posibilidades tendrán que ser evaluadas experimentalmente en el futuro. El HBS identificado tiene un papel importante en la represión de *espC*, ya que la expresión de fusiones a las que se les eliminó esta región (espC-43, espC-58 y espC-58+1), es más alta con respecto a la de las fusiones que sí la contienen, incluyendo a aquellas que también contienen el LBS.

Se han realizados experimentos tipo “footprinting” para mapear con precisión las secuencias reconocidas por ambas proteínas; sin embargo, a la fecha no se han obtenido resultados claros. Cabe señalar que la definición de sitios de unión, tanto para Ler como para H-NS, en diferentes regiones reguladoras mediante “footprinting” no ha sido tarea fácil por la tendencia que tienen estas proteínas a formar estructuras oligoméricas que cubren amplias zonas en el DNA, dificultando la definición de los sitios primarios de unión.

De acuerdo a los datos obtenidos, el LBS sería necesario para permitir la activación del promotor de *espC* sólo cuando está presente el HBS, ya que Ler es dispensable para fusiones que no contienen el HBS o para cualquier fusión en una cepa que carece de H-NS (Martínez-Santos, 2004; Fig. 8).

Además de las regiones involucradas en la unión de las proteínas Ler y H-NS, la región reguladora de *espC* también contiene otro elemento involucrado en la regulación. Esto se determinó al evaluar el papel que juega la región transcrita no traducida de *espC* de 118 pb. Los resultados obtenidos con fusiones que la contienen o no (Fig. 8), indicaron que esta secuencia ejerce un efecto silenciador sobre la expresión de *espC*, ya que al eliminarla se observa un aumento de actividad de alrededor de tres veces con respecto a las fusiones que no la contienen. Sin embargo, conservan el perfil de regulación mediado por Ler y H-NS, sugiriendo que el mecanismo depende posiblemente de estructuras adoptadas por la región líder del mensajero de *espC*. Utilizando el programa “Mfold web server” (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold>) (Zuker, 2003) se puede predecir que esta región adopta una estructura secundaria relativamente estable (datos no mostrados); sin embargo, su papel en la regulación requiere ser evaluada mediante la generación de mutaciones puntuales que la desestabilicen.

Estos resultados nos permiten proponer un esquema de las regiones necesarias para la regulación de *espC* más detallado que el propuesto anteriormente (Martínez-Santos, 2004) (Fig. 24). Así, tenemos que hasta la posición –287 se tiene la región reguladora mínima que comprende todos los elementos necesarios para la regulación, tanto positiva como negativa, de *espC*. Alrededor de las posiciones –287 y –210 se encuentra el LBS, mientras que alrededor de las posiciones –210 y –58 se encuentra el HBS. En base a los resultados con los EMSAs se propone que ambos sitios estarían sobrelapando alrededor de la posición –210, aunque se requieren más experimentos para determinar las secuencias de unión con mayor definición. Hasta la posición –58 se tiene al promotor funcional óptimo, el cual en ausencia del LBS y del HBS se expresa en forma desregulada en cualquier cepa, aunque aumenta su actividad un poco más en ausencia de H-NS. Por último, la región no traducida también interviene en la regulación silenciando parcialmente la expresión de *espC*.

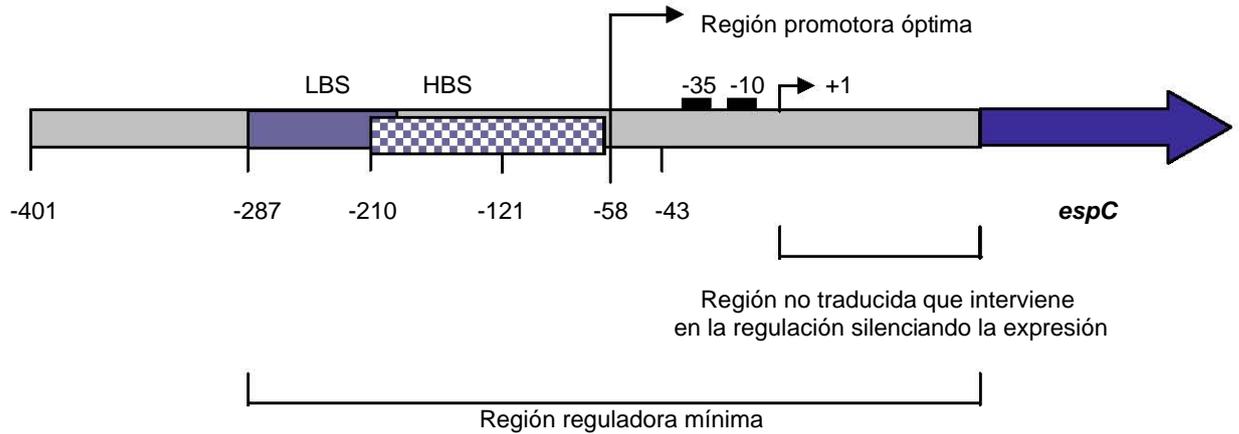


Fig. 24. Representación esquemática de las regiones necesarias para la regulación de *espC*.

Estos resultados nos permiten proponer el siguiente modelo de regulación (Fig. 25). En ausencia de Ler, H-NS se asocia a su sitio de unión (HBS), a partir del cual oligomeriza hasta cubrir el promotor, impidiendo el acceso de la RNA polimerasa. Alternativamente, podría formar un “loop” represor uniéndose también a un segundo sitio de menor afinidad localizado sobre la región no codificante de *espC*, que impide el acceso a la RNA polimerasa o la atrapa en un complejo represor, como se ha propuesto para la represión de los promotores de los operones *LEE2-LEE3* (Bustamante et al., datos no publicados). En condiciones de inducción, como el crecimiento en DMEM a 37°C, el gen que codifica para Ler se activa aumentando la concentración intracelular de la proteína, lo cual permite que ésta interactúe con su sitio de unión (LBS), provocando que H-NS se disocie del DNA o que se modifique el complejo nucleorepresor, lo que permitiría el acceso a la RNA polimerasa y, por tanto, la expresión del gen.

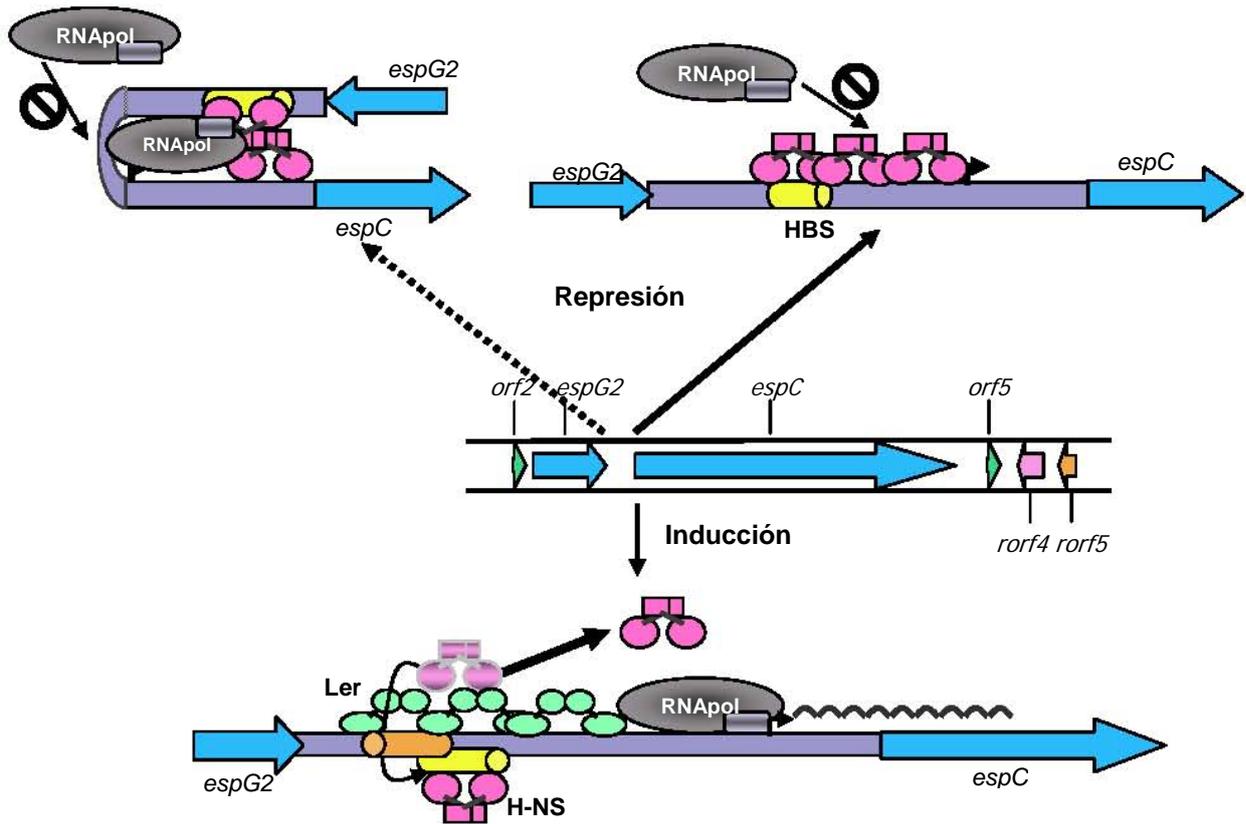


Fig. 25. Modelo de regulación de la expresión de *espC*. Para la explicación referirse al texto. En amarillo se indica el HBS, en anaranjado el LBS, las figuras rosas representan moléculas de H-NS, las figuras verdes representan a Ler.

De acuerdo a este modelo, la interacción de Ler con un complejo preformado entre la región reguladora de *espC* y H-NS, provoca que éste se desestabilice y dé lugar a la formación de un complejo accesible para la RNA polimerasa que podría sólo contener a Ler, o a la formación de un complejo híbrido donde aparentemente se encuentran ambas proteínas (Fig.16). Esto sugiere que la unión de Ler provoca que H-NS se disocie del DNA parcialmente y que, a su vez, algunas moléculas sigan unidas al DNA pero en una conformación que no permite la formación del complejo represor.

La posible presencia de sólo un sitio de unión de H-NS en la región reguladora de *espC* contrasta con lo observado por Bustamante y colaboradores (2001 y datos no publicados), quienes describen que H-NS se une con afinidad similar sobre dos sitios localizados flanqueando a los promotores de los operones *LEE2* y *LEE3*. Estas

observaciones los llevaron a proponer que H-NS se une sobre estas secuencias para formar un asa represora e impedir el acceso de la RNA polimerasa, o bien, atraparla en un complejo represor. Este modelo fue posteriormente propuesto también para la regulación del promotor del operón *LEE5*, el cual no es divergente (Haack *et al.*, 2003).

En este trabajo también se exploró la posibilidad de que Ler regule genes aledaños a *espC*. Uno de estos genes fue *orf3*, recientemente renombrado como *espG2* (Shaw *et al.*, 2005). Estos autores demostraron que el producto de este gen (EspG2) es translocado hacia la célula epitelial a través del sistema de secreción tipo III codificado en la isla LEE y que, junto con EspG (codificada también por el LEE), provoca la disrupción de microtúbulos. El hecho de que también sea secretada por el SSTT sugiere que podría ser regulada por Ler, ya que esta proteína regula positivamente tanto a los genes que codifican para el sistema de secreción como a las proteínas efectoras codificadas en la isla LEE.

La región intergénica entre *espG2* y *orf2*, que se localiza corriente arriba, es pequeña (77 pb), por lo que se pensó que pudieran estar formando un operón. De acuerdo al resultado obtenido por experimentos de "primer extension", el inicio de transcripción del promotor de *espG2*, corresponde a una A localizada a 72 pb del codón de inicio (Fig. 17). La probable caja -10 contiene 5 de 6 bases y la -35 contiene 3 de 6 bases con respecto al consenso para promotores dependientes de σ^{70} en *E. coli*. Cabe mencionar que estas probables cajas caen dentro de la región estructural de *orf2*. Debido a la separación entre las cajas, a que la caja -35 está poco conservada y a que las fusiones no muestran actividad a una DO_{600} de 0.4 (datos no mostrados), se sugirió que *espG2* pudiera depender de σ^S ; sin embargo, al hacer un análisis de la región promotora se observó que no posee las secuencias consenso de promotores activados por σ^S (Hengge-Aronis, 2002), aunque habría que analizar la actividad de la fusión en una mutante para eliminar por completo esta posibilidad.

En estos experimentos se incluyeron muestras de RNA total de la cepa EPEC Δ/ler para analizar el papel de Ler en la regulación de *espG2*, lo cual había sido propuesto previamente. Sin embargo, la señal obtenida para la mutante es muy similar a la obtenida para la cepa silvestre, lo cual en primera instancia indica que este gen no se regula por Ler, al menos en las condiciones probadas en este estudio. Dada la discrepancia con lo

reportado en la literatura, se llevó a cabo un ensayo de actividad de CAT con fusiones transcripcionales, así como un ensayo de retardamiento en gel con la proteína Ler pura, los cuales mostraron que *espG2* es regulado por Ler (Figs. 19 y 20). Las diferencias observadas entre los resultados obtenidos mediante experimentos de "primer extension" y los obtenidos con las fusiones y el EMSA, son intrigantes. Ler se une en forma clara y específicamente a la región reguladora de *espG2* (Fig. 18), y el efecto a nivel transcripcional, aunque se trata de un promotor débil, es aparente para las fusiones más largas (pESPG2-735 y pESPG2-404) cuya actividad se reduce o es nula en ausencia de Ler (Fig. 19). Así, es posible que al tratarse de un promotor débil el "primer extension" no tenga la sensibilidad necesaria para detectar la diferencia de actividad en presencia y ausencia de Ler o que haya que reanalizarlo en otras condiciones, incluyendo el uso de un primer diferente o la utilización de muestras obtenidas a otras densidades ópticas. Adicionalmente, se determinó que la expresión de este gen no se reprime cuando las bacterias se crecen en medio rico (LB), lo cual es una característica de los genes que están regulados por Ler (Bustamante *et al.*, 1998; Bustamante *et al.*, 2001; Sánchez-SanMartín *et al.*, 2001). Las actividades alcanzadas en los ensayos de CAT (Fig. 19 y 21), nos indican que el promotor de *espG2* es un promotor débil que probablemente requiera de otras condiciones para expresarse mejor.

Los otros dos genes de la isla *espC* cuya regulación se analizó fueron *rorf4* y *rorf5*. Los primeros estudios mostraron que la expresión de *rorf4* es incluso un poco mayor en el fondo de *E. coli* K12 que en EPEC, lo cual indica que no requiere de Ler o algún otro regulador de EPEC, aunque no se descarta la posibilidad de que a las fusiones generadas les haga falta un elemento requerido para la regulación como, por ejemplo, parte del gen estructural. La expresión de *rorf5* no se pudo determinar debido a que la fusión que contiene sólo la región que podría corresponder al promotor de este gen (pRORF5-186) no es activa. Es posible que esta fusión no contenga la región promotora, la cual podría estar localizada sobre la región estructural de *orf6.1*; sin embargo, también existe la posibilidad de que *rorf5* no sea un gen activo, al menos en las condiciones probadas en este estudio. Interesantemente, *rorf4* aunque no es regulado por Ler sí muestra regulación por medio de cultivo, siendo reprimido en medio rico y expresándose mejor en DMEM.

VIII. CONCLUSIÓN

De estos resultados se puede concluir que tanto Ler como H-NS tienen un sitio de unión sobre la región reguladora de *espC* localizado corriente arriba del promotor, específicamente entre las posiciones -287 y -210 para Ler y -210 y -58 para H-NS. La unión de Ler desestabiliza a los complejos formados por H-NS, formando principalmente complejos sólo con Ler, aunque también se forman complejos híbridos. Además de la regulación ejercida por estas proteínas, la región no codificante del líder ejerce un efecto de silenciador sobre la expresión de *espC*.

De los genes aledaños a *espC*, *espG2* (antes *orf3*), cuyo producto es secretado por el SSTT, parece ser co-regulado por Ler, a diferencia de *rorf4*, cuya expresión no depende de Ler.

Los resultados obtenidos indican que *espC* es un gen altamente regulado, por un lado H-NS ejerce una fuerte represión, no permitiendo la expresión del gen en ausencia de Ler ni siquiera a los niveles basales reportados para *LEE2* (Fig. 15; Bustamante *et al.*, 2001). Por otro lado, la región no traducida modula de manera negativa la expresión del gen independientemente de Ler y H-NS. Por su parte, *espG2*, aunque no muestra una regulación clara por Ler, también es regulado por esta proteína, lo cual concuerda con el hecho de que su producto es secretado por el sistema de secreción tipo III y actúa junto con EspG (una proteína claramente regulada por Ler) para desestabilizar a los microtúbulos. La regulación mediada por Ler de dos factores de virulencia localizados fuera de la isla LEE (EspC y EspG2) sugiere que estas proteínas le son de utilidad a la bacteria durante la infección, por lo que evolucionaron para ser co-reguladas por el regulador maestro de los genes de virulencia, de esta manera EPEC puede expresar los genes de virulencia de manera coordinada. Esto es más evidente en el caso de EspC, la cual se ha visto que es internalizada a la célula epitelial más eficientemente durante la formación del pedestal (Vidal and Navarro-García, 2006), por lo que tiene que expresarse simultáneamente con los genes que intervienen en este proceso.

IX. PERSPECTIVAS

1) Hacer ensayos de protección a DNAsa I para localizar de manera más precisa los sitios de unión para Ler y H-NS.

2) Introducir mutaciones en la secuencia correspondiente a la región no codificante de *espC* que modifiquen la formación de la estructura secundaria, para definir si es la formación de una estructura determinada lo que interviene en la regulación de *espC*.

3) Analizar con más detalle el mecanismo por el cual Ler elimina la represión por H-NS, realizando por ejemplo ensayos de competencia utilizando H-NS o Ler marcadas (por ejemplo con biotina) o anticuerpos específicos para cada una de ellas para aclarar si la interacción de Ler forma complejos híbridos con H-NS y/o desplaza por completo a H-NS del DNA.

4) Confirmar el inicio de transcripción de *espG2*.

5) Analizar de manera integral la regulación de los genes de la isla *espC*, mediante el uso de microarreglos o PCR en tiempo real, para determinar qué otros genes son regulados por Ler.

X. APÉNDICE

◆ Solución de urea pH 8 (buffer de unión)

*20 mM fosfato de sodio, 8 M urea, Tris-HCl 2M pH 8.0. pH final = 8.0

	[Stock]	[Final]	Cantidad	
Na ₂ HPO ₄	1 M	20 mM	10 ml	Se afora a 500 ml y se ajusta el pH a 8.0. Desgasificar.
Urea	8 M		240.24 gr	
Tris-HCl	2 M	10 mM	2.5 ml	

◆ Solución de urea pH 4.5 (buffer de elución)

*20 mM fosfato de sodio, 8 M urea, Tris-HCl 2 M pH 7.5. pH final = 4.5

	[Stock]	[Final]	Cantidad	
Na ₂ HPO ₄	1 M	20 mM	10 ml	Se afora a 500 ml y se ajusta el pH a 4.5. Desgasificar.
Urea	8 M		240.24 gr	
Tris-HCl	2 M	10 mM	2.5 ml	

* Las soluciones deben estar estériles y filtradas.

◆ Buffer de urea 4 M (primer buffer de diálisis)

	[Stock]	[Final]	Cantidad	
Tris-HCl pH 8.0	2 M	50 mM	40 ml	Aforar a 1.6 lt y ajustar el pH a 8.0.
MgCl ₂	1 M	10 mM	16 ml	
Glicerol	100 %	20 %	320 ml	
NaCl	5 M	500 mM	160 ml	
Tritón X-100	100 %	0.1 %	1.6 ml	
Urea			384.64 gr	

◆ Buffer de urea 1 M (segundo buffer de diálisis)

	[Stock]	[Final]	Cantidad	
Tris-HCl pH 8.0	2 M	50 mM	40 ml	Aforar a 1.6 lt y ajustar el pH a 8.0.
MgCl ₂	1 M	10 mM	16 ml	
Glicerol	100 %	20 %	320 ml	
NaCl	5 M	500 mM	160 ml	
Tritón X-100	100 %	0.1 %	1.6 ml	
Urea			96.06 gr	

◆ **Buffer de urea 0.2 M (tercer buffer de diálisis)**

	[Stock]	[Final]	Cantidad	
Tris-HCl pH 8.0	2 M	50 mM	40 ml	Aforar a 1.6 lt y ajustar pH a 8.0.
MgCl ₂	1 M	10 mM	16 ml	
el				
Glicerol	100 %	20 %	320 ml	
NaCl	5 M	500 mM	160 ml	
Tritón X-100	100 %	0.1 %	1.6 ml	
Urea			19.2 gr	

◆ **Buffer de EDTA 3 mM (cuarto buffer de diálisis)**

	[Stock]	[Final]	Cantidad	
Tris-HCl pH 8.0	2 M	30 mM	24 ml	Aforar a 1.6 lt y ajustar pH a 8.0.
MgCl ₂	1 M	10 mM	16 ml	
el				
Glicerol	100 %	20 %	320 ml	
NaCl	5 M	500 mM	160 ml	
Tritón X-100	100 %	0.1 %	1.6 ml	
EDTA	0.5 M	3 mM	9.6 ml	

XI. BIBLIOGRAFIA

- Atlung, T., and Ingmer, H. (1997) H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. *Mol Microbiol* **24**: 7-17.
- Baldini, M.M., Kaper, J.B., Levine, M.M., and Moon, H.W. (1983) Molecular nature of adhesion in enteropathogenic Escherichia coli. *Lancet* **2**: 218.
- Baldwin, T.J., Brooks, S.F., Knutton, S., Manjarréz Hernández, H.A., Aitken, A., and Williams, P.H. (1990) Protein phosphorylation by protein kinase C in HEp-2 cells infected with enteropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* **58**: 761-765.
- Baldwin, T.J., Ward, W., Aitken, A., Knutton, S., and Williams, P.H. (1991) Elevation of intracellular free calcium levels in HEp-2 cells infected with enteropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* **59**: 1599-1604.
- Barba, J., Bustamante, V.H., Flores-Valdéz, M.A., Deng, W., Finlay, B.B., and Puente, J.L. (2005) A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *J Bacteriol* **187**: 7918-7930.
- Bustamante, V.H., Calva, E., and Puente, J.L. (1998) Analysis of cis-acting elements required for bfpA expression in enteropathogenic Escherichia coli. *J Bacteriol* **180**: 3013-3016.
- Bustamante, V.H., Santana, F.J., Calva, E., and Puente, J.L. (2001) Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic Escherichia coli: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* **39**: 664-678.
- Campellone, K.G., and Leong, J.M. (2003) Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic E. coli and enterohemorrhagic E. coli O157:H7. *Curr Opin Microbiol* **6**: 82-90.
- Cebolla, A., Sousa, C., and de Lorenzo, V. (1997) Effector specificity mutants of the transcriptional activator NahR of naphthalene degrading Pseudomonas define protein sites involved in binding of aromatic inducers. *J Biol Chem* **272**: 3986-3992.
- Clarke, S.C., Haigh, R.D., Freestone, P.P., and Williams, P.H. (2003) Virulence of enteropathogenic Escherichia coli, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* **16**: 365-378.
- Crane, J.K., and Oh, J.S. (1997) Activation of host cell protein kinase C by enteropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* **65**: 3277-3285.
- Creasey, E.A., Delahay, R.M., Daniell, S.J., and Frankel, G. (2003) Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic Escherichia coli. *Microbiology* **149**: 2093-2106.
- Deng, W., Puente, J.L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B.A., Vázquez, A., Barba, J., Ibarra, J.A., O'Donnell, P., Metalnikov, P., Ashman, K., Lee, S., Goode, D., Pawson, T.,

and Finlay, B.B. (2004) Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 3597-3602.

Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., and Finlay, B.B. (1997) Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol* **5**: 109-114.

Dytoc, M., Fedorko, L., and Sherman, P.M. (1994) Signal transduction in human epithelial cells infected with attaching and effacing *Escherichia coli* in vitro. *Gastroenterology* **106**: 1150-1161.

Elliott, S.J., Wainwright, L.A., McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Deng, Y.K., Lai, L.C., McNamara, B.P., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1998) The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* **28**: 1-4.

Elliott, S.J., Sperandio, V., Girón, J.A., Shin, S., Mellies, J.L., Wainwright, L., Hutcheson, S.W., McDaniel, T.K., and Kaper, J.B. (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., Krejany, E.O., Mellies, J.L., Robins-Browne, R.M., Sasakawa, C., and Kaper, J.B. (2001) EspG, a novel type III system-secreted protein from enteropathogenic *Escherichia coli* with similarities to VirA of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **69**: 4027-4033.

Falconi, M., Gualtieri, M.T., La Teana, A., Losso, M.A., and Pon, C.L. (1988) Proteins from the prokaryotic nucleoid: primary and quaternary structure of the 15-kD *Escherichia coli* DNA binding protein H-NS. *Mol Microbiol* **2**: 323-329.

Fried, M., and Crothers, D.M. (1981) Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* **9**: 6505-6525.

Friedberg, D., Umanski, T., Fang, Y., and Rosenshine, I. (1999) Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **34**: 941-952.

Girón, J.A., Ho, A.S., and Schoolnik, G.K. (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**: 710-713.

Gómez-Duarte, O.G., and Kaper, J.B. (1995) A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**: 1767-1776.

Grant, A.J., Farris, M., Alefounder, P., Williams, P.H., Woodward, M.J., and O'Connor, C.D. (2003) Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Mol Microbiol* **48**: 507-521.

Gruenheid, S., DeVinney, R., Bladt, F., Goosney, D., Gelkop, S., Gish, G.D., Pawson, T., and Finlay, B.B. (2001) Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nat Cell Biol* **3**: 856-859.

- Haack, K.R., Robinson, C.L., Miller, K.J., Fowlkes, J.W., and Mellies, J.L. (2003) Interaction of Ler at the LEE5 (tir) operon of enteropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* **71**: 384-392.
- Hardwidge, P.R., Deng, W., Vallance, B.A., Rodriguez-Escudero, I., Cid, V.J., Molina, M., and Finlay, B.B. (2005) Modulation of host cytoskeleton function by the enteropathogenic Escherichia coli and Citrobacter rodentium effector protein EspG. *Infect Immun* **73**: 2586-2594.
- Henderson, I.R., Navarro-García, F., and Nataro, J.P. (1998) The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **6**: 370-378.
- Henderson, I.R., and Nataro, J.P. (2001) Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* **69**: 1231-1243.
- Hengge-Aronis, R. (2002) Stationary phase gene regulation: what makes an Escherichia coli promoter sigmaS-selective? *Curr Opin Microbiol* **5**: 591-595.
- Ibarra, J.A., Villalba, M.I., and Puente, J.L. (2003) Identification of the DNA binding sites of PerA, the transcriptional activator of the bfp and per operons in enteropathogenic Escherichia coli. *J Bacteriol* **185**: 2835-2847.
- Kalman, D., Weiner, O.D., Goosney, D.L., Sedat, J.W., Finlay, B.B., Abo, A., and Bishop, J.M. (1999) Enteropathogenic E. coli acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. *Nat Cell Biol* **1**: 389-391.
- Kenny, B., Abe, A., Stein, M., and Finlay, B.B. (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. (1999) Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol Microbiol* **31**: 1229-1241.
- Lesnik, E.A., Fogel, G.B., Weekes, D., Henderson, T.J., Levene, H.B., Sampath, R., and Ecker, D.J. (2005) Identification of conserved regulatory RNA structures in prokaryotic metabolic pathway genes. *Biosystems* **80**: 145-154.
- Lommel, S., Benesch, S., Rottner, K., Franz, T., Wehland, J., and Kuhn, R. (2001) Actin pedestal formation by enteropathogenic Escherichia coli and intracellular motility of Shigella flexneri are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO Rep* **2**: 850-857.
- Manjarréz-Hernández, H.A., Baldwin, T.J., Williams, P.H., Haigh, R., Knutton, S., and Aitken, A. (1996) Phosphorylation of myosin light chain at distinct sites and its association with the cytoskeleton during enteropathogenic Escherichia coli infection. *Infect Immun* **64**: 2368-2370.
- Martínez-Laguna, Y., Calva, E., and Puente, J.L. (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.

Martínez-Santos, V.I. (2004) Estudio de la regulación transcripcional del gen *espC* de *Escherichia coli* enteropatógena. In *Facultad de Ciencias México*, D.F.: UNAM, pp. 63.

Matsuzawa, T., Kuwae, A., Yoshida, S., Sasakawa, C., and Abe, A. (2004) Enteropathogenic *Escherichia coli* activates the RhoA signaling pathway via the stimulation of GEF-H1. *Embo J* **23**: 3570-3582.

Mellies, J.L., Elliott, S.J., Sperandio, V., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1999) The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* **33**: 296-306.

Mellies, J.L., Navarro-García, F., Okeke, I., Frederickson, J., Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (2001) *espC* pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. *Infect Immun* **69**: 315-324.

Nataro, J.P., Scaletsky, I.C., Kaper, J.B., Levine, M.M., and Trabulsi, L.R. (1985) Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **48**: 378-383.

Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201.

Navarro-García, F., Canizález-Román, A., Sui, B.Q., Nataro, J.P., and Azamar, Y. (2004) The serine protease motif of *EspC* from enteropathogenic *Escherichia coli* produces epithelial damage by a mechanism different from that of *Pet* toxin from enteroaggregative *E. coli*. *Infect Immun* **72**: 3609-3621.

Nougayrede, J.P., Fernandes, P.J., and Donnenberg, M.S. (2003) Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol* **5**: 359-372.

Phillips, N., Hayward, R.D., and Koronakis, V. (2004) Phosphorylation of the enteropathogenic *E. coli* receptor by the Src-family kinase c-Fyn triggers actin pedestal formation. *Nat Cell Biol* **6**: 618-625.

Philpott, D.J., McKay, D.M., Sherman, P.M., and Perdue, M.H. (1996) Infection of T84 cells with enteropathogenic *Escherichia coli* alters barrier and transport functions. *Am J Physiol* **270**: G634-645.

Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K., and Meyer, T.F. (1987) Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**: 458-462.

Porter, M.E., Mitchell, P., Free, A., Smith, D.G., and Gally, D.L. (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.

Puente, J.L., Bieber, D., Ramer, S.W., Murray, W., and Schoolnik, G.K. (1996) The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol* **20**: 87-100.

Puente, J.L.a.B.B.F. (2001) Pathogenic *Escherichia coli*. In *Principles of bacterial pathogenesis*. Groissman, E.A. (ed): Academic Press, pp. 388-390, 398-408.

Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., López, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M.W. (1999) The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* **97**: 221-231.

Rosenshine, I., Ruschkowski, S., Stein, M., Reinscheid, D.J., Mills, S.D., and Finlay, B.B. (1996) A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *Embo J* **15**: 2613-2624.

Sánchez-SanMartín, C., Bustamante, V.H., Calva, E., and Puente, J.L. (2001) Transcriptional regulation of the orf19 gene and the tir-cesT-eae operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 2823-2833.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 5463-5467.

Schell, M.A. (1993) Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **47**: 597-626.

Shaw, R.K., Smollett, K., Cleary, J., Garmendia, J., Straatman-Iwanowska, A., Frankel, G., and Knutton, S. (2005) Enteropathogenic *Escherichia coli* type III effectors EspG and EspG2 disrupt the microtubule network of intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **73**: 4385-4390.

Shin, S., Castanie-Cornet, M.P., Foster, J.W., Crawford, J.A., Brinkley, C., and Kaper, J.B. (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.

Sohel, I., Puente, J.L., Ramer, S.W., Bieber, D., Wu, C.Y., and Schoolnik, G.K. (1996) Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J Bacteriol* **178**: 2613-2628.

Sperandio, V., Mellies, J.L., Delahay, R.M., Frankel, G., Crawford, J.A., Nguyen, W., and Kaper, J.B. (2000) Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler. *Mol Microbiol* **38**: 781-793.

Stein, M., Kenny, B., Stein, M.A., and Finlay, B.B. (1996) Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. *J Bacteriol* **178**: 6546-6554.

Stone, K.D., Zhang, H.Z., Carlson, L.K., and Sonnenberg, M.S. (1996) A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Mol Microbiol* **20**: 325-337.

Tobe, T., Schoolnik, G.K., Sohel, I., Bustamante, V.H., and Puente, J.L. (1996) Cloning and characterization of bfpTVW, genes required for the transcriptional activation of bfpA in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**: 963-975.

Tomson, F.L., Viswanathan, V.K., Kanack, K.J., Kanteti, R.P., Straub, K.V., Menet, M., Kaper, J.B., and Hecht, G. (2005) Enteropathogenic *Escherichia coli* EspG disrupts

microtubules and in conjunction with Orf3 enhances perturbation of the tight junction barrier. *Mol Microbiol* **56**: 447-464.

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

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

Vidal, J.E., and Navarro-García, F. (2006) Efficient translocation of EspC into epithelial cells depends on enteropathogenic *Escherichia coli* and host cell contact. *Infect Immun* **74**: 2293-2303.

Yoshida, S., Katayama, E., Kuwae, A., Mimuro, H., Suzuki, T., and Sasakawa, C. (2002) *Shigella* deliver an effector protein to trigger host microtubule destabilization, which promotes Rac1 activity and efficient bacterial internalization. *Embo J* **21**: 2923-2935.

Zaim, J., and Kierzek, A.M. (2003) The structure of full-length LysR-type transcriptional regulators. Modeling of the full-length OxyR transcription factor dimer. *Nucleic Acids Res* **31**: 1444-1454.

Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**: 3406-3415.