



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Regulación transcripcional positiva y recíproca de Ler
y GrlA, los reguladores de los genes de virulencia de
Citrobacter rodentium

T E S I S

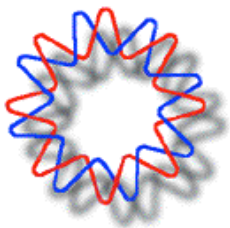
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

PRESENTA

Q.F.B Jeannette Barba León

Director de tesis: Dr. José Luis Puente García



Cuernavaca, Morelos

Agosto 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

*En el fondo,
los científicos somos gente con suerte:
podemos jugar a lo que queramos
durante toda la vida.*

Lee Smolin

El presente proyecto se realizó en el departamento de Microbiología del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. José Luis Puente García-

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dra. Gloria Soberón Chávez

Dr. Mario Soberón Chávez

Dr. José Luis Puente García

El jurado de tesis estuvo integrado por

Dra. Susana López Charreton

Dra. Katy Juárez López

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Dr. David R. Romero Camarena

Dr. Daniel Genaro Segura González

Durante el desarrollo de este trabajo recibí un beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 165484), y de la Dirección General de Estudios de Postgrado (DGEP) de la UNAM.

Agradecimientos

A todas aquellas personas, familiares y amigos, con lo que he tenido la ocasión de convivir y que han participado de alguna u otra manera en mi formación.

Al Dr. José Luis puente, por haberme brindado la oportunidad de realizar este proyecto en su grupo. Gracias por el tiempo brindado durante la realización de este trabajo y su amistad.

A los investigadores que participaron en la crítica y revisión de este escrito, Dra. Susana López Charreton, Dra. Katy Juárez López, Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos, Dr. Guillermo Gosset Lagarda, Dr. David R. Romero Camarena y Dr. Daniel Genaro Segura González. Sus observaciones fueron de gran ayuda en la conclusión de este documento.

De manera especial quiero agradecerles a: la Dra. Gloria Soberón, el Dr. Víctor H. Bustamante, el Dr. Mario A. Flores Valdez, el Dr. Ygnacio Martínez y el Dr. Mario Soberón, los cuales participaron activamente durante mi formación y me brindaron siempre buenas ideas para ir consolidando este proyecto.

A los Drs. Verónica Quintero, Alejandra Vázquez, José Antonio Ibarra y Ricardo Oropeza, quienes me brindaron su apoyo técnico a lo largo de la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio, tanto los que forman parte del grupo como lo que formaron parte del mismo. Gracias por su amistad, tiempo y valiosas opiniones. De manera particular quiero agradecer a nuestros técnicos laboratoristas, Elvira Villa y Patricia Jarillo, ya que gracias a su trabajo y desempeño pude sacar adelante mi proyecto.

A mis amigos Mariana R., Adriana L., Susana G., Miryam V., Dulce P., Verónica Q., Rivelino, Nora F., Mauricio R., José Luis M., Miguel Ángel de la Cruz y Rafael J. Gracias por compartir mi alegría y por contar con su apoyo en los momentos difíciles. Para ustedes mi amistad sincera.

A mis padres Gloria L., H. Eduardo B., y mis hermanos, Faby y Lalo, para ustedes mi profundo agradecimiento. Gracias por estar siempre a mi lado, aun a pesar de la distancia, y sobre todo por apoyarme e impulsarme a lograr todas la metas que me he propuesto.

Especialmente a mi esposo Mario, gracias por todo tu amor, apoyo y comprensión durante el tiempo que estuve en el Instituto. Espero que mi alegría de este momento retribuya en algo el tiempo que estuvimos separados. Para ti mi amor eterno.

Índice General

Tema	Página
Resumen	1
Abstract	2
I. Introducción	3
I.1. Patógenos que forman la lesión de Adherencia y Destrucción	3
I.2. El Locus de Destrucción del Enterocito	4
I.3. La regulación de Ler	7
II. Objetivos	10
III. Materiales y Métodos	11
III.1. Cepas bacterianas y plásmidos	11
III.2. Condiciones de crecimiento	11
III.3. Manipulaciones de DNA	11
III.4. Construcción de las fusiones de <i>ler</i> recortadas hacia el extremo 3´	12
III.5. Ensayo de CAT	12
III.6. Construcción de las mutantes en el HTH de GrlA	13
III.7. Construcción y purificación de MBP-CRGr1A	15
III.8. Transcripción <i>in vitro</i> (“Run off”)	16
III.9. Inmunodetección de proteínas por “Western Blot”	17
III.10. Ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética de <i>ler</i> de EPEC con H-NS	18
IV. Resultados	23
IV.1. GrlA: un nuevo regulador de la expresión de <i>ler</i>	23
IV.2. ¿Cómo regula GrlA la expresión de <i>ler</i> y Ler la expresión de <i>gr1A</i>	24
IV.3. La región no traducida de <i>ler</i> interviene en su regulación	26
IV.4. GrlA estimula la expresión de <i>ler</i> aún en ausencia de H-NS	29
IV.5. GrlA promueve de manera específica la transcripción de <i>ler in vitro</i>	31
IV.6. Residuos conservados en el dominio HTH de GrlA son indispensables para su actividad	34
IV.7. Diferencias en las regiones reguladoras de <i>ler</i> entre <i>C. rodentium</i> y EPEC36	

IV.8. Regulación transcripcional de <i>ler</i> en EPEC	37
IV.9. La expresión de <i>ler</i> es regulada por H-NS	40
IV.10. GrlA regula la expresión de <i>ler</i> en EPEC	42
V. Discusión	43
V.1. Descripción del circuito de regulación positiva entre Ler y GrlA	43
V.2. El efecto de H-NS sobre la expresión de <i>grlA</i>	45
V.3. Regulación de la expresión del operón <i>grlRA</i> por Ler	46
V.4. Otros reguladores negativos del operón <i>grlRA</i>	48
V.5. Regulación negativa de la expresión de <i>ler</i>	48
V.6. Elementos de regulación inherentes a la Región no Traducida de <i>ler</i>	49
VI. Conclusión	53
VII. Perspectivas	55
VIII. Bibliografía	56

Lista de Figuras y Tablas

Título	Página
Fig. 1. La lesión A/E	4
Fig. 2. Resumen de las proteínas que forman el Sistema de Secreción Tipo III, el translocón y las proteínas efectoras	5
Fig. 3. El Locus de Destrucción del Enterocito	6
Tabla 1a. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este estudio	20
Tabla 2b. Oligos utilizados en este estudio	22
Fig. 4. Elementos de regulación en <i>cis</i> que controlan la expresión de <i>ler</i> de <i>C. rodentium</i>	28
Fig. 5. GrlA estimula la expresión de <i>ler</i> aún en ausencia de H-NS	30
Tabla 3. GrlA estimula la expresión de <i>ler</i> aún en ausencia de H-NS	30
Fig. 6. GrlA posee un probable HTH	31
Fig. 7. Purificación de MBP-GrlA	32
Fig. 8. GrlA incrementa los niveles de transcripción de <i>ler in vitro</i>	33
Fig. 9. Mutantes sitio específicas en el dominio HTH de GrlA afectan su función	35
Fig. 10. Diferencias entre la región reguladora de <i>ler</i> entre EPEC y <i>C. rodentium</i>	36
Fig. 11. Determinación de los elementos en <i>cis</i> que regulan la expresión de <i>ler</i> en EPEC	39
Fig. 12. La expresión de <i>ler</i> de EPEC es regulada por H-NS	40
Fig. 13. H-NS se une específicamente a la región reguladora de <i>ler</i>	41
Fig. 14. La expresión de <i>ler</i> de EPEC es regulada por GrlA	42
Fig. 15. Modelado de las UTR de <i>ler</i>	51
Fig. 16. Modelo de la regulación del LEE en los patógenos que desarrollan la lesión A/E	54

Lista de Abreviaturas más relevante

- A/E: por sus siglas en inglés, lesión de Adherencia y Destrucción.
- Cif: por sus siglas en inglés, factor inhibidor del crecimiento celular
- Esc: por sus siglas en inglés, proteína involucrada constituyente del aparato de secreción tipo III de *E. coli*
- Esp: por sus siglas en inglés, proteína secretada de *E. coli*
- GrlA: por sus siglas en inglés, regulador global del LEE (Activador)
- GrlR: por sus siglas en inglés, regulador global del LEE (Represor)
- H-NS: por sus siglas en inglés, proteína de asociación y de estructuración del nucleóide
- HTH: por sus siglas en inglés, hélice-vuelta-hélice
- IHF: por sus siglas en inglés, factor de integración al hospedante
- LEE: por sus siglas en inglés, Locus de Destrucción del Enterocito
- Ler: por sus siglas en inglés, regulador codificado en el LEE
- Map: por sus siglas en inglés. Proteína asociada a la mitocondria
- MBP: por sus siglas en inglés, proteína de unión a maltosa
- Nle: por sus siglas en inglés, efector no codificado en el LEE
- NRS: por sus siglas en inglés, secuencia de regulación negativa
- PCR: por sus siglas en inglés, reacción en cadena de la polimerasa
- PRS: por sus siglas en inglés, secuencia de regulación positiva
- SRN: secuencia de regulación negativa
- SRP: secuencia de regulación positiva
- Tir: por sus siglas en inglés, receptor translocado para intimina

Resumen

La formación de la lesión de Adherencia y Destrucción (A/E “Attaching and Effacing”) en las células intestinales es un paso esencial en la infección producida por los patógenos de humanos, causantes de diarrea, *Escherichia coli* enteropatógena, *E. coli* enterohemorrágica y el patógeno de ratones *Citrobacter rodentium*. Los genes requeridos para el desarrollo de la lesión A/E están localizados dentro de una isla de patogenicidad conocida como Locus de Destrucción del Enterocito (LEE “Locus of Enterocyte Effacement”). Ler (“LEE encoded regulator”) y GrlA (“Global regulator of lee Activator”) controlan positivamente la expresión de los genes localizados en el LEE. Este estudio describe los mecanismos que controlan la expresión de Ler y GrlA, utilizando para ello a *C. rodentium* como modelo de estudio. Diversas estrategias utilizadas en el transcurso de este trabajo tales como: el uso de fusiones transcripcionales, experimentos de complementación, ensayos de transcripción *in vitro* y retardamientos de la movilidad electroforética, confirmaron que GrlA se requiere para la activación de *ler*, además, también mostraron que Ler es requerido para la expresión del operon *grlRA*. Los datos obtenidos revelaron un novedoso mecanismo de regulación transcripcional positiva, recíproca y directa, que controla la expresión óptima de los genes de virulencia encontrados en los patógenos A/E. Nuestros resultados también indican, que Ler y GrlA inducen la expresión de *grlRA* y *ler*, respectivamente, por contender, al menos en parte, con la represión mediada por H-NS. Sin embargo, GrlA, a diferencia de Ler, se requiere para la expresión óptima de *ler* aún en ausencia de H-NS.

Abstract

Formation of the attaching and effacing (A/E) lesion on intestinal epithelial cells is an essential step in the pathogenesis of human enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* and of the mouse pathogen *Citrobacter rodentium*. The genes required for the development of the A/E phenotype are located within a pathogenicity island known as the locus of enterocyte effacement (LEE). The LEE-encoded transcriptional regulators Ler, an H-NS-like protein, and GrlA, a member of a novel family of transcriptional activators, positively control the expression of the genes located in the LEE and also corresponding virulence. In this study, we used *C. rodentium* as a model to study the mechanisms that controlling the expression of Ler and GrlA. By deletion analysis of the *ler* and *grlRA* regulatory regions and complementation experiments, negative and positive *cis*-acting regulatory motifs were identified that are essential for the regulation of both genes. This analysis confirmed that GrlA is required for the activation of *ler*, but also showed that Ler is required for the expression of *grlRA*, revealing a novel regulatory loop controlling the optimal expression of virulence genes in A/E pathogens. Furthermore, our results indicate that Ler and GrlA induce expression of each other by, at least in part, counteracting the repression mediated by H-NS. However, whereas GrlA is still required for the optimal expression of *ler* even in the absence of H-NS, Ler is not needed for expression of *grlRA* in the absence of H-NS. This type of transcriptional positive regulatory loop represents a novel mechanism in pathogenic bacteria that is likely required to maintain an appropriate spatiotemporal transcriptional response during infection.

Introducción

Patógenos que forman la lesión de Adherencia y Destrucción

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) son bacilos Gram negativos, que pueden producir cuadros entéricos severos en diferentes grupos de la población mundial. EPEC es un agente etiológico que provoca diarrea, principalmente en niños menores de 6 meses nacidos en países en vías de desarrollo. EHEC es el principal causante de brotes diarreicos en países desarrollados, asociados frecuentemente con comida y agua contaminada. Además, de la diarrea causada por EHEC, esta bacteria puede producir severas complicaciones tales como colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (42).

EPEC, EHEC y *Citrobacter rodentium* pertenecen a la familia de patógenos bacterianos que causan una lesión destructiva en el enterocito, conocida como lesión de adherencia y destrucción (“attaching and effacing lesion”, A/E) (42). Debido a que EPEC y EHEC tienen especificidad por los humanos, los modelos que explican las interacciones patógeno-hospedante, han sido desarrollados basados en estudios *in vitro* realizados en células epiteliales en cultivo. Por tal motivo, en años recientes la infección producida por *C. rodentium* en ratones, ha llegado a ser aceptado como un sistema de experimentación que permite estudiar el mecanismo que conlleva a la producción de la lesión A/E *in vivo* (18).

La lesión A/E se caracteriza por la degeneración de las microvellosidades del enterocito alrededor del sitio donde se adhiere la bacteria, lo que resulta en la pérdida de la superficie de absorción (31). También implica la elevación de la membrana de la célula hospedante, debida a la acumulación de proteínas del citoesqueleto por debajo de la bacteria adherente, dando forma a una estructura rica en actina parecida a la de una copa o pedestal, lo que permite que la bacteria se encuentre en asociación íntima con el enterocito (Fig. 1).



Fig. 1. La lesión A/E. Micrografía que muestra en naranja, la estructura de copa o pedestal que proviene de la reorganización del citoesqueleto de la célula eucarionte. En rosa se muestra la bacteria que está en unión íntima con la célula blanco (tomada por Rosenshine *et al.* 1996. 48).

El Locus de Destrucción del Enterocito

Los genes responsables de producir la lesión A/E se encuentran codificados en un isla de patogenicidad denominada Locus de Destrucción del Enterocito o LEE (“Locus of Enterocyte Effacement”) (Fig. 3) (revisado en 42) . No obstante, recientemente se han encontrado nuevos efectores involucrados en la patogénesis de EPEC, EHEC y *C. rodentium*, tales como NleA/EspI, EspFu/TccP, EspJ y Cif, los cuales aunque se encuentran codificados fuera del LEE, también se secretan y se translocan a la célula hospedante a través del aparato de secreción tipo III codificado en el LEE, donde afectan diferentes procesos de señalización (Fig. 2) (revisado en 15).

En la figura 2 se muestra un esquema y un pequeño resumen de la función de las proteínas que constituyen el sistema de secreción tipo III, las que forman el aparato de translocación y las proteínas efectoras.

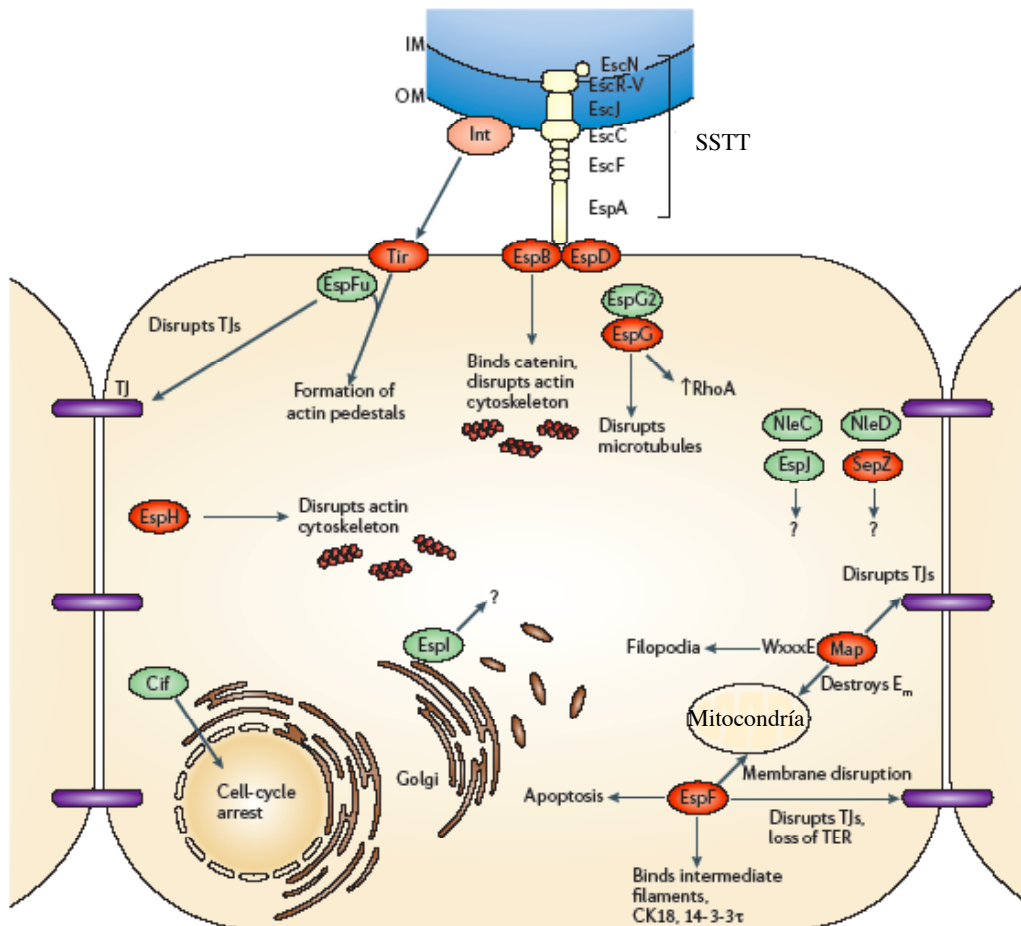


Fig. 2. Las bacterias que forman la lesión A/E inyectan a las células epiteliales un serie de proteínas efectoras. El Sistema de Secreción Tipo III (SSTT) forma un complejo de aguja compuesto por las proteínas Esc, las cuales se insertan en las membranas interna (IM), externa (OM) y el espacio periplásmico de la bacteria. Una característica única de los SSTT de los organismos A/E es la presencia de un extensión filamentosa, compuesta por la polimerización de la proteína EspA, a través de la cual las proteínas efectoras son secretadas. Las proteínas translocadoras EspB y EspD, forman un poro en la membrana de la célula eucariota y son esenciales para la liberación de las proteínas efectoras. EspF y Map (“Mitochondrial-associated protein”) interrumpen las uniones estrechas y la función de la mitocondria, respectivamente, mientras que EspG y EspG2 afectan a los microtúbulos e indirectamente activan a RhoA. Map, también estimula la formación de filopodios por mimetizar la señalización inducida por Cdc42 activada. EspH, sutilmente modula la cinética de ensamble del pedestal, posiblemente por inhibir a Cdc42. Adicionalmente, efectores codificados en profagos tales como Cif (“cell-cycle-inhibitory factor”) y EspJ aumentan la patogenicidad de algunos aislados de *E. coli*, lo cual muestra que las cepas silvestres codifican un repertorio de factores de virulencia. EspI/NleA (“non-locus-of-enterocyte-effacement-encoded-effector A”) se localiza con el complejo de Golgi. EspFu/TccP es un efector sólo encontrado en EHEC y participa activamente en la formación del pedestal. NleC y NleD son proteínas translocadas pero su papel aún es desconocido. Las proteínas efectoras codificadas en el LEE o en profagos, son mostrados en color rojo y verde, respectivamente. Em significa potencial de la membrana mitocondrial, Int: intimina, TER: resistencia eléctrica transepitelial, Tir: “translocated intimin receptor”, TJ: uniones estrechas (tomado de Hayward *et al.* 2006. 30).

El LEE se encuentra ampliamente conservado entre EPEC, EHEC y *C. rodentium*, (similitud superior al 85%) (16, 23, 44). Así mismo, contiene 41 genes, que se encuentran organizados en tres dominios funcionales, de acuerdo al tipo de proteínas para las que codifican: un sistema de secreción tipo III (proteínas Esc y Sep); una región involucrada en la adherencia íntima (Intimina y Tir “Translocated intimin receptor”) (revisado en 42), y la región que codifica para las proteínas translocadoras (EspA, EspB y EspD) (revisado en 59), las efectoras (EspF, EspG, Map, Tir, EspH) (13, 21, 34, 55) y sus presuntas chaperonas (CesD1, CesD2, CesF, CesT) (revisado en 59) (Fig. 3).

A nivel molecular los genes del LEE se agrupan en cinco operones principales, denominados *LEE1* a *LEE5*, dos operones bicistrónicos y cuatro unidades monocistrónicas (Fig. 3).

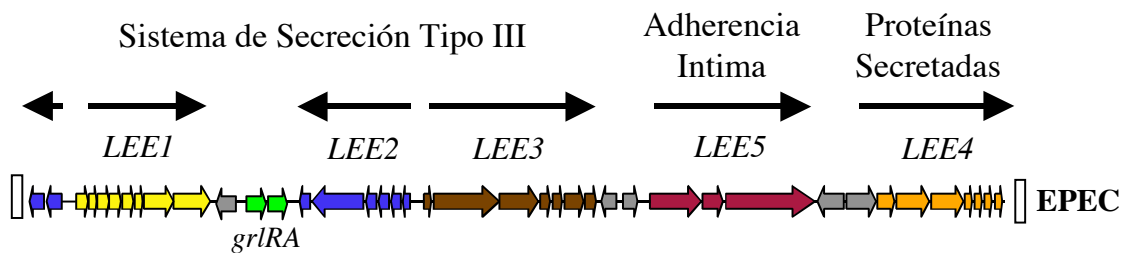


Fig. 3. El Locus de Destrucción del Enterocito. Se muestra un esquema del LEE el cual posee 41 genes, la mayor parte de ellos se organizan en cinco grandes operones. Los operones *LEE1*, *LEE2* y *LEE3* contienen a los genes que codifican para las proteínas que conforman el sistema de secreción tipo III. Los genes involucrados en la adherencia íntima se encuentran en el operón *LEE5*, y el operón *LEE4* contiene a los genes que codifican para las proteínas translocadoras.

La expresión de los operones *LEE2-LEE5* y *espC*, un gen no codificado en el LEE, depende de la proteína **Ler** (LEE-encoded regulator) (11, 22, 40, 50), (Martínez-Laguna *et al.* datos no publicados, Martínez-Santos *et al.* datos no publicados). Así mismo, estudios recientes han demostrado que H-NS (“Histone-like Nucleoid Structuring”) reprime la expresión de los operones *LEE2*, *LEE3*, *LEE4* y *LEE5* (10, 29, 56).

Se propone, que el mecanismo por el cual Ler conduce la expresión de los operones *LEE2-LEE5* involucra la competencia por los sitios de unión de H-NS al DNA, lo cual permite la eliminación de un complejo represor formado por esta proteína sobre

dichos operones. Basados en esta idea, diferentes autores proponen que Ler funciona como una proteína desrepresora y no como una proteína activadora (10, 29).

Adicionalmente, se ha observado que la expresión de los genes contenidos en el LEE se regula, *in vitro*, por las condiciones de crecimiento, induciéndose sólo en medio de cultivo de células a 37°C y reprimiéndose en medio LB o cuando el crecimiento se lleva a cabo a 29°C o a 42°C en medio de cultivo de células (11, Bustamante *et al.* datos no publicados, Martínez-Laguna *et al.* datos no publicados).

La regulación de la expresión de Ler

Ler es una proteína de 15 kDa que exhibe una alta identidad, a nivel de aminoácidos, con el dominio de unión a DNA correspondiente a la familia de las proteínas asociadas al nucleóide (H-NS, StpA, etc.) (22). Ler es codificada por el primer gen del operón *LEE1*, y es una proteína clave en la expresión de los genes de virulencia de EPEC, EHEC y *C. rodentium*. Por tal motivo, suponemos que la expresión de *ler* está sujeta a un mecanismo de regulación muy fino, el cual, a la fecha, ha sido motivo de estudio por parte de nuestro grupo y otros más.

Se ha reportado que el promotor de *ler* en EPEC, EHEC y *C. rodentium*, es dependiente de sigma 70 (17, 40) y se encuentran altamente conservado entre los tres microorganismos, sin embargo, una diferencia a resaltar entre EPEC, EHEC y *C. rodentium* es el contexto del LEE en el que se encuentra *ler*, ya que mientras EPEC y en EHEC se encuentra flanqueado por *espG* y *orf2*, en *C. rodentium*, *ler* está flanqueado por la secuencia de inserción 679 (SI679) y el gen *orf2* (Fig. 10) (16, 23)

Diferentes estudios en EPEC y EHEC, han mostrado que la expresión de *ler* la modulan un gran grupo de reguladores tanto globales como específicos de los patógenos que forman la lesión A/E. El regulador global IHF (Integration Host Factor), el cual directamente se une a la región que precede al promotor de *ler*, es esencial para la activación del mismo en EPEC (26). A *ler* también lo regulan, positivamente, otros reguladores globales tales como BipA, un miembro de la superfamilia de la GTPasas de

unión a ribosomas (28); Fis (Factor for Inversion Stimulation), una proteína bacteriana asociada al nucleoide (27); y QseA (Quorum-sensing *E. coli* Regulator A), un factor involucrado en la regulación por “quorum sensing” (54). Las proteínas de unión al nucleoide H-NS y Hha tienen un papel negativo en la expresión de *ler*, ambas pegándose directamente a su región reguladora (53, 56). Además, existen reguladores específicos tales como PerC, el producto del tercer gen del locus *per* localizado en el plásmido EAF (EPEC adherence factor), el cual puede activar directamente la expresión de *ler* (11, 40, 45, 46). Así mismo, proteínas similares a PerC también se han identificado en EHEC y están involucradas en la expresión de *ler* (32, 45). Por otro lado, Berdichevsky y col. reportaron que Ler se une a su propia región reguladora y reprime su transcripción en una manera dependiente de su concentración (7).

Recientemente, por trabajos realizados en *C. rodentium*, se identificaron dos nuevos reguladores codificados en el LEE, GrlA (Global regulator of LEE-Activator, antes conocido como Orf11) y GrlR (Represor; Orf10), los cuales están conservados en todos los patógenos A/E (17). Estas proteínas se encuentran codificadas en un presunto operón, localizado entre el gen *rorf3* y el operón *LEE2* del LEE (Fig. 3). Se ha descrito, GrlR afecta negativamente la expresión de los genes de LEE (17, 33, 38), por un mecanismo que aún no está bien definido mientras que GrlA es un regulador positivo de *ler* (17).

El homólogo más cercano de GrlA es un presunto regulador transcripcional, no caracterizado, de *Salmonella enterica* (37% de identidad). Así mismo, GrlA es 23% idéntica a CaiF, el miembro mejor caracterizado de esta nueva familia de reguladores transcripcionales. CaiF es una proteína reguladora responsable de la inducción de los operones *cai* y *fix*, bajo condiciones de anaerobiosis y dependiente de carnitina en *E. coli*. (20). Una búsqueda de motivos reveló la presencia de un posible motivo de unión a DNA del tipo HTH (“helix-turn-helix”), donde se encuentra mucha de la similitud entre CaiF, GrlA y el homólogo de *S. enterica* (17).

Debido al grado de identidad de los genes contenidos en el LEE entre las bacterias causantes de la lesión A/E, proponemos que el estudio de los mecanismos de la regulación que permiten la expresión de los genes de virulencia en *C. rodentium*, pueden ser extrapolables a EPEC y EHEC, con la ventaja de que *C. rodentium* nos permite evaluarlos *in vivo*.

Objetivos

Objetivo General

Estudiar la regulación de los genes involucrados en la virulencia de organismos enteropatógenos que desarrollan la lesión de Adherencia y Destrucción.

Objetivo Particular

Definir el mecanismo por el cual GrlA regula la expresión de *ler* en *Citrobacter rodentium*.

Objetivos Específicos

- Caracterizar el efecto de GrlA en la expresión transcripcional de *ler*.
- Identificar los elementos reguladores en *cis* que permiten la expresión de *ler*.
- Definir la organización y regulación transcripcional de los genes *grlR* y *grlA*.
- Evaluar la posible unión de GrlA a la región reguladora de *ler*.
- Precisar el papel de H-NS en la regulación de *ler* y *grlA*.

Materiales y Métodos ¹

Cepas bacterianas y plásmidos.

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este estudio se encuentran enlistados en la tabla 1 del artículo publicado en el “Journal of Bacteriology” y en la tabla 1a de este documento.

Condiciones de crecimiento

Medios de cultivo

Luria-Bertani (LB): Triptona (10 g l⁻¹), extracto de levadura (5 g l⁻¹) y NaCl (5 g l⁻¹); ajustado a un pH de 7.4.

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM): Distribuido comercialmente por Gibco (Invitrogen corporation) y complementado con bicarbonato de sodio (3.7 g l⁻¹) y piridoxal (25 µg µl⁻¹).

Medio 2xYT (2xYT): Triptona (16 g l⁻¹), NaCl (5 g l⁻¹) y extracto de levadura (10 g l⁻¹).

Concentraciones de antibióticos

Medio LB: ampicilina (Ap) 100 µg ml⁻¹, carbenicilina (Cb) 100 µg ml⁻¹, kanamicina (Km) 25 µg ml⁻¹, tetraciclina (Tc) 12 µg ml⁻¹, estreptomycin (St) 100 µg ml⁻¹ y ácido nalidixico (Nal) 40 µg ml⁻¹.

DMEM: Ap 50 µg ml⁻¹, Cb 50 µg ml⁻¹ y Tc 2.4 µg ml⁻¹.

Condiciones de cultivo

Todas las bacterias cultivadas en LB, a menos que se indique lo contrario, se crecieron con agitación a 37°C. Cuando se utilizó DMEM las bacterias se crecieron en condiciones estáticas a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5%, las cuales permiten la inducción de los genes de virulencia de *C. rodentium* (condiciones de inducción).

Manipulaciones de DNA

Las técnicas de DNA recombinante fueron realizadas de acuerdo a protocolos estándar previamente reportados (4, 49). Las enzimas de restricción se obtuvieron de las compañías Invitrogen y de New England Biolabs, y se usaron bajo las condiciones recomendadas por los proveedores. Las reacciones de secuencia y los oligos utilizados en

las reacciones de amplificación por PCR (“polymerase chain reaction”) se sintetizaron por la Unidad de Secuencia y la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología/UNAM. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Eppendorf mastercycler gradient, en un volumen final de 100 μ l, utilizando para la elongación una mezcla de 1.5:1 de las polimerasas *AmpliTaq* y *Pfu*, cuando se utilizó DNA cromosomal como templado y sólo *Pfu* cuando se utilizó DNA plasmídico.

Construcción de las fusiones de *ler* recortadas hacia el extremo 3’

Para la construcción de las fusiones se amplificaron por PCR, fragmentos de DNA que comprenden la región no traducida y/o codificante de *ler*, utilizando como templado la fusión transcripcional pCRler-200 (Tabla 1a). Estos fragmentos se digirieron con las enzimas de restricción BamHI y HindIII, para posteriormente ligarse al vector pKK232-8 (Pharmacia LKB Biotechnology), previamente digerido con el mismo par de enzimas. Este vector contiene el gen *cat*, sin promotor, el cual codifica para la enzima Cloranfenicol Acetil Transferasa (CAT). La construcción de las fusiones pCRler-200/+40, +80, +120 y +160 resultó de la combinación de un oligo común en el extremo 5’ CRler-200 (Tabla 2. Barba *et al.* 2005) (5) y de los oligos específicos al extremo 3’ CRler+40RH3, CRler+80RH3, CRler+120RH3 y CRler+160RH3 (Tabla 2a), respectivamente. La construcción pCRler-200/+216 es equivalente a la fusión pCRler-200 (Tabla 1a).

Ensayo de CAT

Una vez transformadas las cepas a evaluar con los plásmidos deseados, se crecieron durante toda la noche en tubos de vidrio con 5 ml de LB y los antibióticos correspondientes (preinoculo). Posteriormente, matraces de 250 ml con 50 ml de DMEM precondicionado (DMEM almacenado al menos 12 h en condiciones de inducción y sin antibiótico) se inocularon con 1 ml del preinoculo correspondiente y los antibióticos adecuados. Los cultivos en DMEM se dejaron crecer 6 h, tiempo al cual todas la cepas alcanzan una lectura de densidad óptica a 600 nm ($D.O_{600}$) similar. Transcurridas las 6 horas, se obtuvo una muestra de 1 ml de cada uno de los cultivos, para realizar la cuantificación de CAT. Las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm y 4°C durante 5 min;

se lavaron con 1 ml de solución de TDTT (20 mM de Tris-HCl 1M pH 7.8 y 30 μ M de ditioneitol); se centrifugaron nuevamente a las mismas condiciones descritas arriba, se desechó el sobrenadante y las bacterias se resuspendieron en 230 μ l de solución de TDTT para romperlas por sonicación (Soniprep 150) utilizando pulsos de 9.9 s y descansos de 9.0 s durante 4 min. Posterior a este tratamiento, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm y 4°C durante 25 min y se recuperó el sobrenadante.

Una vez obtenido el sobrenadante de cada muestra se procedió a determinar la actividad de CAT y la concentración total de proteínas como a continuación se describe:

Actividad de CAT. En placas de 96 pozos se colocaron 5 μ l de cada muestra por duplicado. Posteriormente, se agregaron 200 μ l de la mezcla de reacción (0.1M de Tris-HCl pH 7.8, 1mM de DTNB (5,5'-ditio-bis (2-ácido nitro benzoico)), 0.1mM de acetil coenzima A y 0.1mM de cloranfenicol). La curva de actividad se midió a una absorbancia de 410 nm, leyendo cada 5 segundos durante 5 minutos con el paquete computacional KC3 jr en un lector de ELISA modelo CERES 900C.

Proteínas totales. En placas de 96 pozos se colocaron 10 μ l de cada muestra por duplicado. Posteriormente, se agregaron 200 μ l de la mezcla de reacción (25 ml de la solución A + 500 μ l de la solución B, del kit comercial BCA* Protein Assay Reagent (Pierce)), y se incubó a 37°C por 30 min. Después se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 562 nm en el lector automatizado de placas CERES 900C con el paquete computacional KC3 jr.

Para ambos casos, la actividad de CAT o la concentración total de proteínas, se obtuvo por la interpolación de los valores de absorbancia contra una curva estándar previamente establecida. La actividad específica de la enzima, para cada muestra, se determinó por la división de la actividad de CAT entre la concentración total de proteínas.

Construcción de las mutantes en el HTH de GrlA

Para construir las versiones recombinantes de GrlA que contuvieran mutaciones sitio específicas en residuos conservados en el dominio HTH predicho (I42G, F46A, I48G y R52G), se realizaron PCRs sobrelapados como se describió previamente (49),

utilizando como templado el plásmido pTCRGrIA1 (Tabla 1a). Para ello, se diseñaron los oligos CrAI42G-F, CrAI42G-R, CrAF46A-F, CrAF46A-R, CrAI48G-F, CrAI48G-R, CrAR52G-F y CrAR52G-R (Tabla 2a) los cuales son complementarios a la región codificante de *grlA* e introducen en el sitio adecuado la mutación deseada. Los brazos de DNA de cada una de las mutantes se amplificaron por PCR que contenían parcialmente a GrIA, llevando de manera independiente una de las mutaciones deseadas. Así, se utilizó la combinación de cada uno de los oligos mutantes -F (CrAa.a#a.a-F) o -R (CrAa.a#a.a-R) con los oligos PMPM3-FW1 y PMPM3-RV1, respectivamente, los cuales son complementarios al vector pMPM-T3 (39). Una vez que se contó con los brazos de cada mutante se amplificó, por PCR, un sólo fragmento que contuviera a GrIA mutada, utilizando como templado los brazos de DNA previamente obtenidos y el par del oligos CROrf11Xho (Tabla 2a) y EpCiorf11-H3 (Tabla 2. Barba *et al.* 2005) (5). Los fragmentos resultantes (GrIA mutada) se digirieron con las enzimas de restricción XhoI y HindIII y fueron ligados en el vector pMPM-T3 (39), previamente digerido con la misma combinación de enzimas. Una vez terminado el proceso, se obtuvieron los plásmidos pTCRGrIA-1/ I42G, /F46A, /I48G y /R52G (Tabla 1a). La identidad de los insertos se confirmó por secuencia.

Posteriormente, las distintas versiones mutantes de GrIA se fusionaron, por su extremo amino, a la proteína de unión a maltosa (MBP “maltose binding protein”) en el vector de clonación pMal-c2X (New England Biolabs) el cual contiene un promotor *taq* inducible por IPTG (isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido). Para obtener dichas fusiones se amplificó por PCR la región codificante de las distintas versiones de las mutantes de GrIA utilizando el par de oligos MBPCRgrIAF (Tabla 2a) y EpCiorf11R-H3 (Tabla 2. Barba *et al.* 2005) (5). El producto de PCR resultante se digirió con las enzimas de restricción XbaI y HindIII, para posteriormente ligarlo al vector pMal-c2X previamente cortado con el mismo par de enzimas. Los plásmidos resultantes se denominaron como: pMBP-CRGrIAI42G, F46A, I48G y R52G. La identidad de los fragmentos se verificó por secuenciación.

Construcción y purificación de MBP-CRGrIA

La región codificante de *grlA* de *C. rodentium* se amplificó por PCR utilizando como templado DNA cromosomal de *C. rodentium* y el par de los oligos Orf11-NcoI (Tabla 2b) y EpCiorf11R-H3 (Tabla 2. Barba *et al.* 2005) (5). El producto de PCR obtenido se digirió con las enzimas BamHI y HindIII, y se ligó en el vector pMal-c2X previamente cortado con las misma enzimas. El resultado fue la obtención del plásmido MBP-CRGrIA, donde GrIA se fusionó por su extremo amino a MBP. La identidad del inserto fue evaluada por secuenciación

Para la purificación de la proteína de fusión, la cepa BL21/pLys (Tabla 1b) conteniendo a MBP-CRGrIA, se cultivó toda la noche en 50 ml de LB con Ap y 0.2% de glucosa (preinoculo). Posteriormente, el preinoculo se diluyó 1:100 en 500 ml de 2xYT conteniendo Ap ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) y 0.2% de glucosa y se dejó crecer a 37°C en agitación hasta que alcanzara un $\text{D.O.}_{600} = 0.6$. En ese punto se indujo la producción de la proteína de fusión por la adición de 0.3 mM de IPTG (Sigma-Aldrich). Así mismo, para asegurar el mantenimiento del plásmido se volvió a agregar Ap ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$) y se dejó crecer toda la noche, en agitación, a 30°C . Al día siguiente, se empaquetaron todas las células por medio de centrifugación a 10,000 rpm y 4°C durante 15 min. La pastilla se resuspendió en 13 ml de buffer de columna (20 mM de Tris-HCl pH 7.4, 0.2 M de NaCl, 1 mM de EDTA, 10mM de β -mercaptoetanol). Esta suspensión se pasó, al menos 2 veces, por la prensa francesa (Thermo Spectronic) para asegurar el rompimiento de las células. Para el procesamiento de la muestra se utilizó la “minicell” de 5 ml, previamente enfriada a 4°C , utilizando para el rompimiento, una presión de 10,000 Pa. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 12,000 rpm y 4°C durante 20 min para separar el sobrenadante de los restos celulares. El sobrenadante recuperado se filtró a través de una membrana de $0.22 \mu\text{m}$ (Millipore), y se cargo a una columna (Sigma) de 4 ml empaquetada manualmente con la resina de amilosa (Amylose Resin High Flow, New England BioLabs), la cual se encuentra conectada al cromatógrafo ÄKTA prime system (Amersham Pharmacia Biotech). El programa que se utilizó para purificar la proteína fue el No. 10, el cual ha sido previamente descrito en detalle (36) con la variante del volumen de lavado, el cual se cambió de 330 ml a 730 ml. Finalmente, la proteína se eluyó con maltosa (10 mM). La

purificación de la proteína se verificó por el corrimiento de las distintas fracciones en un gel de poliacrilimida (12%), bajo condiciones desnaturalizantes (Tris-glicina 1x y 0.1% de SDS).

Transcripción *in vitro* (“Run off”)

Para los experimentos de “run off”, primero se amplificó por PCR el fragmento Crler-40, que contiene la región promotora de *ler*, utilizando como templado la fusión pCRler-40 (Tabla 1. Anexo 2) y el par de oligos Crler-40 y Orf1-H3-R (Tabla 2. Barba *et al.* 2005) (5). Una vez obtenido el fragmento de DNA, se limpió como se describe a continuación:

- Por cada 100 μ l de reacción de PCR se adicionaron 15 volúmenes de butanol, y se mezcló vigorosamente.
- Posteriormente se centrifugó a 13,000 rpm a temperatura ambiente durante 35 min para obtener el DNA deshidratado (se observa como una pequeña pastilla blanca).
- Se desechó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70% por medio de centrifugación a 12,000 rpm a temperatura ambiente durante 25 min.
- Una vez seco el DNA se hidrató con agua DEPC estéril (1 μ l de dietil pirocarbonato (Sigma-Aldrich)/ 1 ml de Agua bidestilada).

Contando con el DNA limpio y la proteína purificada se procedió a hacer los ensayos de “run off” como a continuación se describe:

- Se mezclaron, aproximadamente, 340 ng de DNA (1.80 μ M) con 2.66 U/ μ l de Inhibidor de Rnasa (Rnase OUT (Invitrogen)), Buffer de transcripción (BT) (6.66 mM de KCl, 2.6 mM de Tris-acetatos pH 7.9, 0.66 mM de MgCl₂, 66.66 μ M de DTT, 3.33 ng de BSA), concentraciones crecientes de MBP-CRGr1A y agua DEPC estéril (lo suficiente para 15 μ l, considerando el volumen de la RNAP y los nucleótidos).
- Una vez hecha la mezcla se dejó interactuar el DNA con la proteína por 25 min a temperatura ambiente.
- Transcurrido ese tiempo se adicionaron los nucleótidos (MAXIscript (Ambion)) a las siguientes concentraciones: 200 μ M de ATP, CTP y GTP, y sólo 10 μ M de UTP más 5 μ Ci ó 40 μ M de [α^{32} -P] UTP. Así mismo, también se agregaron 0.066 U/ μ l de RNA

polimerasa (MAXIscript (Ambion))

- La reacción anterior se mezcló suavemente y se dejó incubando aproximadamente a 23°C durante 30 min.
- Transcurrido el tiempo de incubación se detuvo la reacción por la adición de 12 µl de Buffer de paro (cantidades para 1 ml: 1 µg de Xilen-cyanol (Bio-Rad), 1 µg de azul de bromofenol (Bio-Rad), 10 mM de EDTA pH 8 y 980 µl de formamida desionizada (Research Organics)).
- Posteriormente, el total de la reacción se resolvió en un gel de poliacrilamida para secuencia 8% (Concentraciones finales: Urea 8 M, Acrilamida 7.6%/Bis-acrilamida 0.4%, Tris-base 0.325 mM, ácido bórico 0.1 mM, EDTA 6.999 µM), con al menos 30 min de corrimiento previo (pre-corrido), utilizando para el corrimiento el buffer TBE para secuencia pH 8 1x (Tris-base 130 mM, ácido bórico 40 mM, EDTA 2.799 mM).
- Una vez deshidratado el gel se expuso en una pantalla de PhosphorScreen (Molecular Dynamics) para ser visualizado por el PhosphorImager Scanner (Molecular Dynamics).

Nota: Las concentraciones del BT están dadas por µl de la reacción, tomando como base un volumen final de 15 µl.

Inmunodetección de proteínas por “Western Blot”

Las cepas a evaluar se crecieron bajo condiciones de inducción durante 8 h. Posteriormente se obtuvo la pastilla bacteriana de 3 ml de cultivo (centrifugar a 12000 rpm durante 2 min), se lavó con 1 ml de TDTT, se resuspendió en 500 µl de TDTT, y se procedió a romper las células por medio de sonicación (Soniprep 150), para posteriormente separar el sobrenadante de los restos celulares (centrifugar a 12000 rpm durante 20 min).

Posteriormente, 20 µl de los sobrenadantes obtenidos se resolvieron por electroforesis (20 mA/gel) en un gel de poliacrilamida al 12% (acrilamida 30%/bis-acrilamida 0.8%), bajo condiciones desnaturalizantes y teñidos con Coomassie G-250 (Bio-Rad), para ajustar la concentración de proteínas. Una vez ajustada la concentración de proteínas, las muestras se corrieron nuevamente en geles de poliacrilamida al 12% y condiciones

desnaturalizantes para hacer la transferencia como se describe a continuación:

1. Previo a la transferencia el gel, la membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm de poro (Amersham) y 3 pares de papel filtro de tamaño adecuado, fueron equilibrados en buffer de transferencia (40 mM de Tris base, 39 mM de glicina, 0.375% de SDS, 20% de metanol) durante 15 min.
2. Posteriormente, el gel y la membrana se colocaron en la cámara para “western blot” semiseca (BIORAD), en donde se llevó a cabo la transferencia, por medio de la aplicación de 15 V durante 45 minutos.
3. Una vez terminada la transferencia, la membrana se bloqueó con leche descremada Carnation Clavel al 5% en PBS-Tween (para 1 l de solución: 0.203 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{H}_2\text{O}$, 1.149 g de NaH_2PO_4 , 8.5 g de NaCl y 3 ml de Tween 20 (Bio-Rad)) durante 3 h. Después de este tiempo, la membrana se lavó 3x/10 min con PBS-Tween, se agregaron los anticuerpos diluidos a la concentración adecuada, en PBS-Tween y se dejó toda la noche en agitación a 4°C. Los anticuerpos utilizados en este estudio fueron: αTir , anticuerpo policlonal generosamente donado por el grupo del Dr. Brett Finlay, αMBP (monoclonal) y αDnaK (monoclonal), estos dos últimos obtenidos de la compañía New England Biolabs.
4. Al día siguiente, la membrana se lavó 3x/10 min con PBS-Tween y se agregó el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (Biomeda), diluido a la concentración adecuada en PBS-Tween y se incubó por 2 h en agitación a 4°C. Transcurrido el tiempo de incubación, se lavó la membrana como se mencionó anteriormente.
5. Para revelar, a la membrana se adicionó 1 ml del reactivo Western Lightning (Perkin-Elmer), preparado según las indicaciones del fabricante, y se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 minutos en agitación. La membrana se expuso a una película fotográfica (Kodak), durante tiempos adecuados de exposición dependiendo del anticuerpo utilizado.

Ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética de *ler* de EPEC con H-NS

Para los ensayos de retardamiento se amplificó, por PCR, un fragmento de 584 pb (de -368 a +216) el cual comprende, parcialmente, la región reguladora y codificante de

ler. Este fragmento se obtuvo con el par de oligos Orf1A (Tabla 2b) y Orf1-H3-R (Tabla 2. Barba *et al.* 2005) (5), posteriormente, se digirió con la enzima de restricción HpaI lo que dio como resultado la generación dos fragmentos de 266 pb (de -368 a -98) y 318 pb (de +98 a +216). Los fragmentos de DNA utilizados como control en los ensayos de retardamiento, corresponden a la región estructural de *ler* (C1) (25) y a un fragmento inespecífico, que resulta de la amplificación del fragmento blanco (C2). Los ensayos de retardamiento se realizaron mezclando aproximadamente 100 ng de los fragmentos de DNA obtenidos de la digestión y los fragmentos control, más concentraciones crecientes de la proteína purificada de H-NS-His₆ utilizando para ello las mismas condiciones previamente reportadas (5). Para la resolución y observación de las interacciones H-NS-His₆-DNA se utilizaron las mismas estrategias descritas en la sección de materiales y métodos de Barba *et al.* 2005 (5). La purificación de H-NS-His₆ fue realizada como se describió previamente (5).

¹ Se presentan sólo los materiales y métodos no contenidos en los artículos, a excepción del ensayo de CAT el cual se describe más ampliamente en este documento.

Tabla 1a. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este estudio*

Cepas o plásmidos	Descripción ^a	Referencia o fuente
Cepas de EPEC		
E2348/69	Cepa silvestre (WT) EPEC O127:H6.	(37)
E23Δ <i>hns</i>	E2348/69 Δ <i>hns</i> ::Km. Nal ^r	Vazquez-Ramos No publicada
JPEP6	E2348/69 Δ <i>grlA</i> ::Km. Sp ^r	Bustamente <i>et al.</i> Datos no publicados
Cepas de <i>C. rodentium</i>		
DBS100	Cepa silvestre (WT) ATCC 51459.	(51)
Δ <i>ler</i>	DBS100 que lleva un delección en fase de <i>ler</i> .	(16)
Δ <i>grlA</i>	DBS100 que lleva un delección en fase de <i>grlA</i> .	(16)
Cepas de <i>E. coli</i>		
MC4100	F' <i>araD 139</i> Δ(<i>argF-lac</i>) <i>U169 rpsL150 relA 1 flb5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i> .	(12)
JPMC1	MC4100 Δ <i>hns</i> ::Km.	(5)
BL21/pLys21	F' <i>ompT (lon) hsdSB</i> (r _B m _B) <i>gal dcm</i> (λDE3)	Invitrogen
Plásmidos		
pT6HNS	Derivado del vector pMPMT6 con un origen de replicación p15A, que expresa a H-NS-His ₆ bajo el control de un promotor inducible por arabinosa. Tc ^r .	(5)
pKK232-8	Vector derivado del pBR322, el cual contiene al gen que codifica para la cloranfenicol acetil transferasa, carente de promotor. Ap ^r .	Pharmacia LKB Biotechnology
pler-1179	Derivado del pKK232-8, el cual lleva la fusión transcripcional <i>ler-cat</i> de EPEC y contiene los nucleótidos comprendidos entre -1179 a +216.	Bustamente <i>et al.</i> Datos no publicados
pler-779	Fusión transcripcional <i>ler-cat</i> de EPEC, la cual lleva los nucleótidos comprendidos entre -779 a +216.	Bustamente <i>et al.</i> Datos no publicados
pler-260	Fusión transcripcional <i>ler-cat</i> de EPEC, la cual lleva los nucleótidos comprendidos entre -253 a +216.	Bustamente <i>et al.</i> Datos no publicados
pler-98	Fusión transcripcional <i>ler-cat</i> de EPEC, la cual lleva los nucleótidos comprendidos entre -98 a +216.	Bustamente <i>et al.</i> Datos no publicados
pler-54	Fusión transcripcional <i>ler-cat</i> de EPEC, la cual lleva los nucleótidos comprendidos entre -54 a +216.	Bustamente <i>et al.</i> Datos no publicados
pler-31	Fusión transcripcional <i>ler-cat</i> de EPEC, la cual lleva los nucleótidos comprendidos entre -31 a +216.	Bustamente <i>et al.</i> Datos no publicados
pCRler-200	Derivado del pKK232-8, el cual lleva la fusión transcripcional <i>ler-cat</i> de <i>C. rodentium</i> , y contiene los nucleótidos comprendidos entre -197 a +216.	(5)
pCRler-200/+160	Fusión transcripcional <i>ler-cat</i> de <i>C. rodentium</i> , la cual lleva los nucleótidos comprendidos entre -197 a +159.	Este estudio
pCRler-200/+120	Fusión transcripcional <i>ler-cat</i> de <i>C. rodentium</i> , la cual lleva los nucleótidos comprendidos entre -197 a +121.	Este estudio
pCRler-200/+80	Fusión transcripcional <i>ler-cat</i> de <i>C. rodentium</i> , la cual lleva los nucleótidos comprendidos entre -197 a +82.	Este estudio

pCRler-200/+40	Derivado del pKK232-8, el cual lleva la fusión transcripcional <i>ler-cat</i> de <i>C. rodentium</i> , y contiene los nucleótidos comprendidos entre -197 a +40.	Este estudio
pMPM-T3	Vector de clonación de bajo número de copias, que contiene un origen de replicación p15A, Tc ^r .	(39)
pTCRGrIA1	Derivado del pMPM-T3 que lleva el gen estructural de <i>gria</i> y su sitio de unión a ribosoma bajo el control del promotor <i>lac</i> .	(5)
pTCRGrIA-1/ I42G	Derivado de pTCRGrIA1, al cual se le cambió la I de la posición 42 por una G.	Este estudio
pTCRGrIA-1/ F46A	Derivado de pTCRGrIA1, al cual se le cambió la F de la posición 46 por una A.	Este estudio
pTCRGrIA-1/ I48G	Derivado de pTCRGrIA1, al cual se le cambió la I de la posición 48 por una G.	Este estudio
pTCRGrIA-1/ R52G	Derivado de pTCRGrIA1, al cual se le cambió la R de la posición 52 por una G.	Este estudio
pMal-c2X	Vector para construir fusiones a MBP que tiene un promotor <i>taq</i> inducible por IPTG, que posee un origen de replicación ColE1. Ap ^r .	New England Biolabs
pMBP-CRGrIA	Derivado del vector pMal-c2X que expresa a GrIA bajo el control de un promotor inducible por IPTG.	Este estudio
pMBP-CRGrIAI42G	Derivado de pMBP-CRGrIA, al cual se le cambió la I de la posición 42 por una G.	Este estudio
pMBP-CRGrIAF46A	Derivado de pMBP-CRGrIA, al cual se le cambió la F de la posición 46 por una A.	Este estudio
pMBP-CRGrIAI48G	Derivado de pMBP-CRGrIA, al cual se le cambió la I de la posición 48 por una G.	Este estudio
pMBP-CRGrIAR52G	Derivado de pMBP-CRGrIA, al cual se le cambió la R de la posición 52 por una G.	Este estudio

* Se presentan sólo las cepas y plásmidos utilizados en los resultados comprendidos en la tesis.

^a Las coordenadas de las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* se indican con respecto al inicio de la transcripción de *ler* de EPEC o *C. rodentium*, según corresponda.

Tabla 2b. Oligos utilizados en este estudio *

Oligo	Secuencia ^{a,b} (5' → 3')
CRler+40RH3	gaaaaatAAGcttcatataca
CRler+80RH3	agaatgtaAaGCttatgtaagataac
CRler+120RH3	caagctcaAGcttcatg
CRler+160RH3	cataataataaGctTctcatacttt
CrAI42G-F	tctcgaatgat GG tgccgaagca
CrAI42G-R	gaatgcttcggca CC atcatttcgaga
CrAF46A-F	attgccgaagca GC cggtataaacctg
CrAF46A-R	caggtttataaccg GC tgcttcggcaat
CrAI48G-F	gaagcattcgg GGC aacctgaggaga
CrAI48G-R	tctctcaggt GCC accgaatgcttc
CrAR52G-F	ataaacctgagg GgC gcgtcattatt
CrAR52G-R	aataaatgacgc GcC cctcaggtttat
PMPM3-FW1	gtgccgtaaagcactaaatcgg
PMPM3-RV1	gcggtatcccctgattctgtgg
MBPCRgrlAF	ataaaaagaacatCTaGaatggaatctaaa
Orf11-NcoI	caaataaaaagaaTatggaTCCTggaatctaaaata
Orf1A	ctggctgtCgACTatgtccg

* Se presentan sólo los oligos utilizados para la generación de los plásmidos utilizados en los resultados presentados de novo en la tesis.

^a Las letras mayúsculas indican los cambios en la secuencia de los oligos con respecto a la secuencia silvestre, que se modificaron para introducir un sitio de reconocimiento para una endonucleasa.

^b Las letras mayúsculas, en negritas y cursivas indican los cambios en la secuencia de los oligos con respecto a la secuencia silvestre, que se modificaron para introducir la secuencia codificante del aminoácido que se utilizó para realizar la mutación.

Resultados

GrlA: un nuevo regulador de la expresión de *ler*

EPEC, EHEC y *C. rodentium*, son microorganismos capaces de producir infecciones entéricas en sus respectivos hospederos, también causan la lesión A/E y comparten un alto grado de similitud en los genes que conforman a isla de patogenicidad LEE. Por ello, aprovechando la ventaja que ofrece *C. rodentium* de estudiar en el modelo murino el papel de los genes asociados con la virulencia, y con el objetivo de evaluar el funcionamiento *in vivo* de cada uno de los genes que integran al LEE, se construyeron mutantes sencillas en los 41 genes que lo conforman (17).

El análisis sistemático del comportamiento de cada una de las mutantes reveló, entre otras cosas, la necesidad de la presencia de *ler* para promover un cuadro infeccioso en el ratón, ya que en su ausencia la virulencia de *C. rodentium* se encontraba atenuada (Tabla 1. Deng *et al.* 2004) (17). Así mismo, también se observó que *grlA*, antes conocido como *orf11*, codificaba para un nuevo regulador positivo de los genes del LEE, debido a que la mutación en este gen, afectaba la expresión de algunas proteínas efectoras y translocadoras (Fig. 1. Deng *et al.* 2004) (17), dando como resultado la atenuación de la virulencia de dicha cepa (*C. rodentium* Δ *orf11/grlA*) en el modelo murino (Tabla 1. Deng *et al.* 2004) (17).

La ausencia de expresión de una fusión transcripcional entre la región reguladora de *ler* de *C. rodentium* y el gen reportero *cat*, en la mutante en *grlA* de *C. rodentium* (Δ *orf11*), confirmó que GrlA estaba implicado en la regulación transcripcional de *ler* (Fig. 2B. Deng *et al.* 2004) (17). Así mismo, la falta de expresión en la mutante *orf11* (Δ *grlA*) de los productos de los genes *tir* y *espB*, los cuales son regulados por Ler, (Fig. 1B y 2C, Deng *et al.* 2004) (17), sugirió que GrlA y Ler forman una cascada reguladora que controla la expresión de los genes del LEE. Al evaluar la expresión de Tir y EspB en una doble mutante de *C. rodentium* en *ler* y *grlA* (CR Δ *ler* Δ *grlA*), transformada con plásmidos a partir de los cuales se expresa Ler o GrlA *in trans*, se observó que sólo Ler era capaz de complementar la expresión de dichas proteínas (Fig. 2A. Deng *et al.* 2004) (17). Lo anterior corroboró que GrlA no regula directamente a los genes del LEE, sino que lo hace en cascada a través de regular la expresión de Ler (17).

Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island

Wanyin Deng*, José L. Puente†, Samantha Gruenheid*, Yuling Li*, Bruce A. Vallance*, Alejandra Vázquez†, Jeannette Barba†, J. Antonio Ibarra†, Paul O'Donnell‡, Pavel Metalnikov‡, Keith Ashman‡, Sansan Lee*, David Goode*, Tony Pawson‡, and B. Brett Finlay*[§]

*Biotechnology Laboratory, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada V6T 1Z3; †Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México; and ‡Samuel Lunenfeld Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, ON, Canada M5G 1X5

Communicated by Stanley Falkow, Stanford University, Stanford, CA, January 14, 2004 (received for review October 29, 2003)

Bacterial pathogenicity islands (PAI) often encode both effector molecules responsible for disease and secretion systems that deliver these effectors to host cells. Human enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), enteropathogenic *E. coli*, and the mouse pathogen *Citrobacter rodentium* (CR) possess the locus of enterocyte effacement (LEE) PAI. We systematically mutagenized all 41 CR LEE genes and functionally characterized these mutants *in vitro* and in a murine infection model. We identified 33 virulence factors, including two virulence regulators and a hierarchical switch for type III secretion. In addition, 7 potential type III effectors encoded outside the LEE were identified by using a proteomics approach. These non-LEE effectors are encoded by three uncharacterized PAIs in EHEC O157, suggesting that these PAIs act cooperatively with the LEE in pathogenesis. Our findings provide significant insights into bacterial virulence mechanisms and disease.

Diarrheagenic enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), and *Citrobacter rodentium* (CR) are attaching/effacing (A/E) bacterial pathogens that attach to host intestinal epithelium and efface brush border microvilli, forming A/E lesions (1, 2). EHEC and EPEC represent a significant threat to human health. Sequencing the genome of EHEC O157:H7, the causative agent of “Hamburger disease” and the most common serotype associated with food and water poisoning, has identified many putative virulence factors (3). These factors are often encoded by pathogenicity islands (PAI) present in the genomes of pathogenic, but not closely related nonpathogenic, strains (4). However, the functions of the PAIs in virulence have not been systematically analyzed.

Many key virulence factors shared by A/E pathogens reside in the locus of enterocyte effacement (LEE), a PAI essential for A/E lesion formation (5–8). The LEE contains 41 genes and encodes a type III secretion system (TTSS), a common virulence mechanism for many human and plant pathogens (4, 9, 10). TTSSs are conserved organelles that deliver bacterial effector proteins capable of modulating host functions into host cells. The LEE encodes proteins for forming such an organelle (2), but the LEE genes involved in assembling and regulating this apparatus have not been defined.

The LEE also encodes a regulator (Ler), an adhesin (intimin) and its receptor (Tir) responsible for intimate attachment, several secreted proteins, and their chaperones (1, 2). The secreted proteins consist of effectors as well as translocators (EspA, EspD, and EspB) required for translocating effectors into host cells. Five LEE-encoded effectors (Tir, EspG, EspF, Map, and EspH) have been identified, which are involved in modulating host cytoskeleton (2, 11). However, nearly half of the LEE genes have no homologs and have not been functionally studied.

Because EHEC and EPEC are human pathogens, efforts aimed at elucidating the function of the LEE have primarily been restricted to *in vitro* studies. Animal models, including neonatal calves and weaned rabbits, have been used to study A/E pathogens (12, 13). However, CR, a natural mouse pathogen that

possesses a LEE highly similar to that of EHEC and EPEC (7, 14), is the only A/E pathogen for which there is a small animal (mouse) model. All of the EHEC and EPEC LEE-encoded virulence factors tested thus far play equivalent roles in CR virulence (12–18), indicating that CR infection of mice is a relevant animal model for studying EPEC and EHEC.

To gain a comprehensive understanding of LEE function, we undertook a systematic approach by generating a full set of deletion mutants for all 41 CR LEE genes and characterizing the mutants for LEE gene expression, type III secretion (TTS), host actin modulation, and virulence in mice. Our studies led to three significant findings: the LEE encodes two additional regulators and a hierarchical switch for TTS; the LEE-encoded TTSS secretes many effectors encoded by other PAIs outside the LEE; and all of the LEE genes are required for full CR virulence in mice.

Materials and Methods

Strains, Plasmids, and Primers. *E. coli* and CR strains and plasmids are described in Table 3, which is published as supporting information on the PNAS web site. The primers used are available on request. Bacterial growth conditions were as described (17).

LEE Gene Deletion Mutants. Nonpolar deletion mutants of all 41 CR LEE genes were generated by the *sacB*-based allelic exchange (19) and lambda Red recombinase (20) systems (Table 4, which is published as supporting information on the PNAS web site). Mutants were verified by PCR. Successful complementation was achieved for Δtir , Δeae , Δler , $\Delta orf11$, $\Delta sepL$, $\Delta rorf6$, $\Delta espA$, $\Delta espB$, and $\Delta espD$ by providing the related genes on a pCR2.1-TOPO- or pACYC184-based plasmid, confirming that the mutations did not affect downstream genes and were nonpolar. All CR mutants grew similarly to WT CR in LB and DMEM.

Protein Assays. Total and secreted proteins of CR strains grown in DMEM were analyzed by SDS/PAGE and Western blot as described (17). Rat antibodies against His-tagged CR Tir and mouse monoclonal antibody against EPEC EspB were used.

CAT Assay. PCR products carrying the upstream regulatory regions of CR *ler* (*LEE1*), *sepZ* (*LEE2*), and *tir* (*LEE5*) as defined for EPEC (21) were digested with *Bam*HI and *Hind*III and cloned into pKK232-8 carrying a promoterless *cat* gene

Abbreviations: PAI, pathogenicity island; EPEC, enteropathogenic *Escherichia coli*; EHEC, enterohemorrhagic *E. coli*; CR, *Citrobacter rodentium*; A/E, attaching/effacing; LEE, locus of enterocyte effacement; TTSS, type III secretion system; TTS, type III secretion; HA, hemagglutinin.

[§]To whom correspondence should be addressed at: Biotechnology Laboratory, University of British Columbia, 237-6174 University Boulevard, Vancouver, BC, Canada V6T 1Z3. E-mail: bfinlay@interchange.ubc.ca.

© 2004 by The National Academy of Sciences of the USA

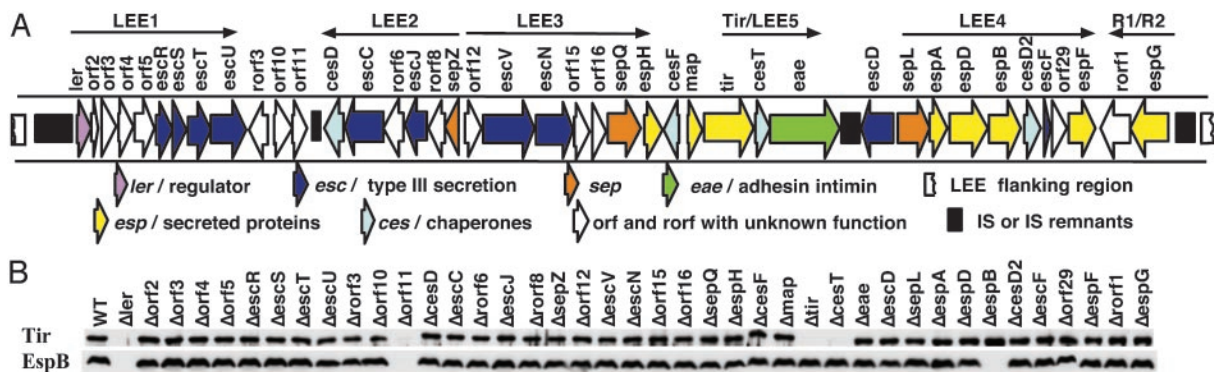


Fig. 1. Both Ler and Orf11 are required for expression of LEE genes in CR. (A) Genetic organization of CR LEE (7). (B) Expression of Tir and EspB in WT CR and its 41 LEE mutants. Whole-cell lysates of bacteria grown in DMEM were analyzed by 10% SDS/PAGE and Western blot with anti-Tir and anti-EspB sera.

(Table 3). CAT activity of the transcriptional fusions was measured in CR strains as described (21).

Primer Extension Assay. It was performed as described by using 5 μ g of total RNA isolated from bacteria grown in DMEM (21). Primers complementary to CR *ler* coding region (positions +53 to +73 with respect to the start codon of *ler*) or to the 20-bp sequence located downstream of the *Hind*III site in pKK232-8 were used to determine the 5' end of the *ler* or *ler-cat* transcript, respectively. Constitutively expressed *ompA* was used as a control.

Analysis of Protein TTS by Epitope Tagging. The coding regions of CR LEE genes *espF*, *espG*, *espH*, *map*, *sepZ*, *ror1*, *cesD2*, *cesD*, *cesF*, *sepL*, *ror6*, *ler*, *orf10*, and *orf11* were cloned into pTOPO-2HA or pCRespG-2HA/*Bgl*II (Table 3) to create a double hemagglutinin (HA) tag at the C termini. The constructs were introduced into CR WT, Δ *escN* and Δ *escD*, and TTS of the tagged proteins was analyzed by Western blot by using mouse monoclonal antibody against HA (Covance, Princeton).

Proteomic Analysis of Secreted Proteins. Proteins secreted by CR strains grown in DMEM were precipitated as described (17), separated by 2D gels according to the manufacturer's instructions (Amersham Pharmacia) and analyzed by mass spectrometry and peptide sequencing (22) as detailed in *Supporting Materials and Methods*, which is published as supporting information on the PNAS web site.

Bioinformatic Tools. DNA and protein sequences were analyzed by using databases from the National Center for Biotechnology Information, the Sanger Genome Centre and the SwissProt, and the IslandPath program (www.pathogenomics.sfu.ca/islandpath).

Fluorescent Actin Staining on HeLa Cells. The assay was performed by using a protocol optimized for CR (17).

Virulence Assays. NIH Swiss mice from Harlan Sprague–Dawley (Indianapolis) and C57BL/6 or C3H/HeJ mice from The Jackson Laboratory were infected with CR strains. Infection and pathological analyses were performed as before (17, 23) and detailed in *Supporting Materials and Methods*.

Results

Regulation of LEE Gene Expression. Ler is the only LEE-encoded regulator identified (2). To address whether other LEE genes regulate LEE gene expression, we analyzed all 41 CR LEE mutants for EspB and Tir expression (Fig. 1). Lack of Tir and EspB in Δ *ler* confirmed Ler's essential role in LEE gene expression. As expected, Δ *tir* and Δ *espB* did not produce Tir and

EspB, respectively. No Tir was visible in Δ *cesT*, consistent with CesT's chaperone role for Tir (2). Surprisingly, another LEE-encoded protein, Orf11, was also required for Tir and EspB expression (Fig. 1B). The *orf11* gene is highly conserved (5–8), and CR, EHEC, and EPEC *orf11* genes all complemented CR Δ *orf11* (Fig. 2A), indicating that Orf11 is functionally equivalent in all A/E pathogens as a positive regulator.

Orf11 has 37% identity to a *Salmonella* protein and 23% to CaiF, a transcriptional activator of the *Enterobacteriaceae* (24). All three proteins contain a helix–turn–helix motif characteristic of DNA binding proteins (Fig. 5, which is published as supporting information on the PNAS web site). To address the hierarchy of Orf11 and Ler in regulating gene expression, we created a CR double mutant of *ler* and *orf11*. Whereas Tir and EspB expression in Δ *ler Δ *orf11* was partially restored by expressing Ler in trans, similarly expressed Orf11 had no such effect (Fig. 2A), suggesting that Orf11 acts upstream of Ler in the regulatory cascade.*

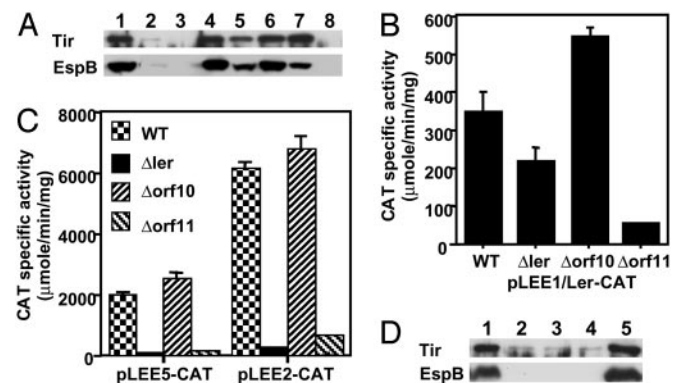


Fig. 2. Orf11 and Orf10 regulate *ler* expression in CR. (A) Western blot with anti-Tir and anti-EspB sera of total lysates of bacteria grown in DMEM. Lane 1, WT CR; lane 2, Δ *orf11*; lane 3, Δ *ler Δ *orf11*. Also shown are CR Δ *orf11* complemented by *orf11* from CR (pCRorf11, lane 4), EHEC (pEHorf11, lane 5), or EPEC (pEPorf11, lane 6); and CR Δ *ler Δ *orf11* double mutant complemented by CR *ler* (lane 7) or *orf11* (lane 8). (B) Orf11 positively regulates *ler* expression. The transcriptional activity directed by the *ler-cat* fusion in pLEE1/*Ler*-CAT was determined in CR WT, Δ *ler*, Δ *orf10*, and Δ *orf11* grown in DMEM for 6 h. The data are the average of three experiments. (C) Orf11 positively regulates the expression of LEE2 and LEE5 operons by activating *ler* expression. The activity directed by LEE2 (pLEE2-CAT) and LEE5 (pLEE5-CAT) transcriptional fusions was measured in CR WT, Δ *ler*, Δ *orf10*, and Δ *orf11* as described above. (D) Orf10 acts as a negative regulator of LEE gene expression when expressed from a plasmid. Whole-cell lysates of WT CR carrying pCR2.1-TOPO (the cloning vector, lane 1), pCRorf10-2HA (2HA-tagged *orf10*, lane 2), pCRorf10 (CR *orf10* with its own promoter, lane 3), pCRorf10_{Plac} (*Plac*-driven CR *orf10*, lane 4), and pCRorf10orf11 (CR *orf10* and *orf11* with their own promoter, lane 5) were analyzed as for A.**

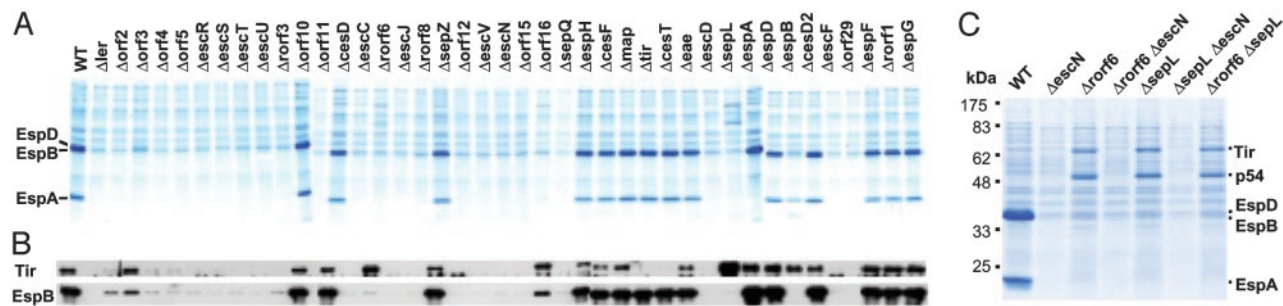


Fig. 3. Type III secretion by WT CR and its 41 LEE mutants. (A) General protein secretion profile of CR and its mutants. (B) Tir and EspB secretion analyzed by Western blot with anti-Tir and anti-EspB sera. (C) Secretion profile of $\Delta sepL$, $\Delta rorf6$, $\Delta escN$ (TTS mutant), and their double mutants. Secreted proteins were concentrated from supernatants of bacterial cultures grown in DMEM and analyzed by 12% SDS/PAGE and Coomassie blue G250 staining (A and C) or Western blot (B).

Orf11's role in regulating *ler* expression was verified by assaying transcriptional fusions between the *cat* reporter gene and regulatory regions of the *LEE1* (*ler*) operon and two Ler-dependent operons, *LEE2* and *LEE5*. The activity of the *LEE1-cat* fusion was decreased in $\Delta orf11$ (Fig. 2B), and that of *LEE2-cat* and *LEE5-cat* was dramatically reduced in both Δler and $\Delta orf11$ (Fig. 2C). Primer extension analysis confirmed that *ler* expression was reduced in $\Delta orf11$ (Fig. 6A, which is published as supporting information on the PNAS web site) and showed that the CR *ler* promoter is similar to that of EPEC *ler* as it lacks the proximal promoter of EHEC *ler* (Fig. 6B). These data suggest that Orf11 is a positive regulator of the expression of Ler, which subsequently facilitates the expression of other LEE operons.

We also observed that plasmids expressing Orf10 dramatically reduced Tir and EspB expression in CR (Fig. 2D) and that *ler* transcription was increased in $\Delta orf10$ as shown by CAT and primer extension assays (Fig. 2 and Fig. 6A), suggesting that *orf10* encodes a negative modulator for *ler* expression. Orf10's inhibitory effect was relieved by coexpressing *orf11* (Fig. 2D). Because both Orf10 and Orf11 act upstream of Ler in the regulatory cascade, we propose to name Orf11 GrlA (for global regulator of LEE-activator) and Orf10 GrlR (for global regulator of LEE-repressor).

Type III Secretion and Hierarchy. Among the 41 LEE genes (Fig. 1A), 10 (*escR*, *escS*, *escT*, *escU*, *escC*, *escJ*, *escV*, *escN*, *escD*, and *escF*) encode proteins conserved among TTSSs (2, 4). However, except for *escF*, *escC*, *escD*, *escN*, and *escV* (2, 25, 26), the assigned function for these genes was based only on sequence homology. To define the full complement of LEE genes needed for TTS, we analyzed the secretion of translocators EspA, EspB, and EspD and effector Tir in all CR LEE mutants. In addition to the 10 *esc* genes, 13 other LEE genes were needed for TTS (Fig. 3 and Table 1), with 9 (*orf2*, *orf4*, *orf5*, *rorf3*, *rorf8*, *orf12*, *orf15*, *sepQ*, and *orf29*) required for both translocator and effector secretion and 4 (*orf3*, *rorf6*, *orf16*, and *sepL*) affecting translocator secretion preferentially. Thus, the LEE encodes 19 proteins essential for TTS. In all LEE mutants defective for TTS, the secretion substrates Tir and EspB were produced in the bacteria (Fig. 1B), indicating a lack of a LEE-encoded feedback inhibitory mechanism seen in the flagellar system (27).

Type III chaperones are critical for secretion of their substrates (9, 27). In CR, CesT was needed for Tir stability and secretion, and CesD was essential for EspD secretion (Fig. 3 and Fig. 7, which is published as supporting information on the PNAS web site), like EPEC CesT and CesD (2, 28). However, unlike the EPEC *cesD2* mutant that has reduced EspD secretion (29), CR $\Delta cesD2$ secreted EspD normally (Fig. 7). The role of CesF in EspF secretion was reported for EPEC (2) and was not tested here.

The mutants of *orf3*, *orf16*, *rorf6*, and *sepL* affected secretion of translocators and effectors differentially (Figs. 3 and 7). $\Delta orf3$ and

$\Delta orf16$ secreted Tir normally. However, $\Delta orf3$ secreted normal EspD but much less EspA and EspB whereas $\Delta orf16$ secreted greatly reduced EspA, EspB, and EspD, indicating that they modulate translocator secretion preferentially. $\Delta sepL$ and $\Delta rorf6$ did not secrete detectable EspA, EspD, and EspB although the translocators were produced (Fig. 1B). Interestingly, both $\Delta sepL$ and $\Delta rorf6$, as well as the double mutant $\Delta rorf6 \Delta sepL$, had greatly enhanced secretion of Tir and a 54-kDa protein (p54) (Fig. 3C). The secretion of Tir and p54 was by means of the LEE-encoded TTSS because double mutants $\Delta sepL \Delta escN$ and $\Delta rorf6 \Delta escN$ did not secrete both proteins. This result suggests that SepL and Rorf6 may act as a molecular switch controlling secretion hierarchy of translocators and effectors.

Identification of Effectors Secreted by LEE-Encoded TTSS. The main function of TTSS is to deliver effectors into host cells, and effector genes can be located both within and outside PAIs encoding TTSS (10, 30, 31). Five LEE-encoded effectors have been identified in EPEC (2, 11). To define the effectors encoded by CR LEE, we tagged all 14 LEE-encoded proteins (EspF, EspG, EspH, Map, SepZ, Rorf1, CesD, CesD2, CesF, SepL, Rorf6, Ler, GrlA, and GrlR) that are not involved in TTS or host cell adhesion with a 2HA epitope at the C termini and analyzed their secretion in WT CR and TTS mutant $\Delta escN$. Although all of the tagged proteins were expressed and stable, only Tir, EspG, EspF, EspH, and Map were type III secreted by CR (data not shown), suggesting that CR LEE encodes only five effectors, similar to EPEC LEE (2, 11).

As shown in Fig. 3C, $\Delta sepL$ and $\Delta rorf6$ did not secrete translocators but had enhanced secretion of effector Tir and p54 by means of the LEE-encoded TTSS. p54 likely represents a secreted protein encoded outside the LEE. To identify p54 and other non-LEE-encoded effectors in CR, we used GrlA overexpressed from a plasmid to increase LEE gene expression and TTS. CR overexpressing GrlA secreted more (>300%) EspA, EspB, and EspD than WT, and the same plasmid greatly enhanced (by >400%) Tir and p54 secretion in $\Delta sepL$ and $\Delta rorf6$, with no translocators secreted (Fig. 4A). At least six additional proteins were secreted by $\Delta sepL$ and $\Delta rorf6$, but not by TTS mutant $\Delta escN$ (Fig. 4A), and they were characterized by proteomic analysis (Table 2 and Fig. 8, which is published as supporting information on the PNAS web site). This analysis confirmed that the 5 LEE-encoded effectors were type III secreted by $\Delta sepL$. In addition, we identified 7 non-LEE-encoded secreted proteins (Table 2). Because $\Delta sepL$ and $\Delta rorf6$ did not secrete translocators but secreted effectors preferentially, these 7 secreted proteins likely represent potential effectors and were designated NleA (p54), NleB, NleC, NleD, NleE, NleF, and NleG (for non-LEE-encoded effectors) (Table 2). We have since shown that NleA is a translocated effector targeted to the host cell Golgi (32).

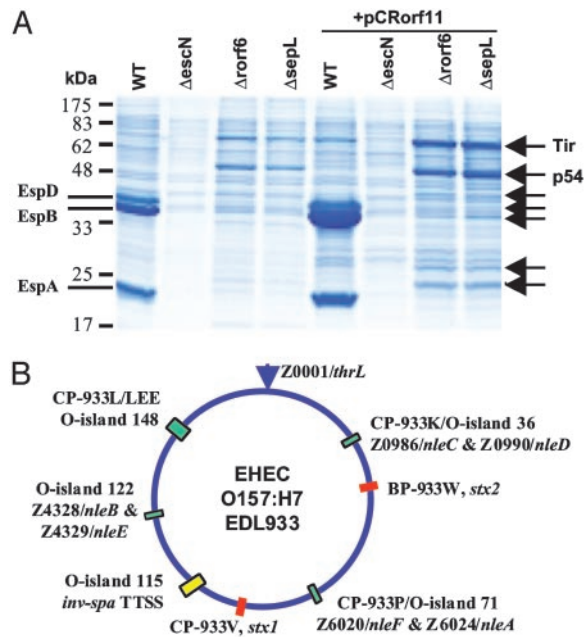


Fig. 4. Identification of both LEE- and non-LEE-encoded proteins secreted by the LEE-encoded TTSS. (A) Effect of overexpressing CR *orf11* on TTS in WT CR and its $\Delta seplL$ or $\Delta rorf6$ mutants. Secreted proteins were analyzed by 15% SDS/PAGE and Coomassie blue staining. The additional type III secreted proteins by $\Delta seplL$ and $\Delta rorf6$ carrying pCRorf11 are indicated by arrows and were characterized by proteomic analyses (Table 2 and Fig. 8). (B) A diagram showing locations of the O-islands encoding the six identified non-LEE effectors in the EHEC O157:H7 genome (3). Also shown are the locations of the Shiga toxin genes (*stx*), the LEE, the *inv-spa*-like TTSS, and the associated prophages (CP- and BP-933).

The degree of importance of a given LEE gene in disease varies with its function (Table 1 and Tables 5 and 6 and Fig. 9, which are published as supporting information on the PNAS web site). The genes for activating LEE gene expression (*ler* and *grlA*) were absolutely required for CR virulence, highlighting the central role of Ler and GrlA-regulated genes in pathogenesis. The negative regulator GrlR also played a role, with $\Delta grlR$ showing a minor but significant defect in colonization and colonic hyperplasia. This finding indicates that coordinated expression of LEE genes *in vivo* is critical for full CR virulence. Genes encoding the TTS/translocation function were all essen-

tial. The effect on virulence was more diverse for effectors and chaperones. Tir was the only essential LEE-encoded effector. The phenotype of Δeae was similar to that of Δtir , consistent with the essential role of Tir and intimin in bacterial colonization and disease (13–15,17). Although $\Delta espF$ and $\Delta espG$ showed moderate attenuation, Δmap and $\Delta espH$ were only slightly attenuated. The phenotype of mutants for type III chaperones correlated with that of their cognate substrates. $\Delta cesT$ was severely attenuated in virulence, similar to Δtir . $\Delta cesF$ showed attenuation similar to $\Delta espF$. Like $\Delta espD$, $\Delta cesD$ displayed little virulence. However, $\Delta cesD2$ was only moderately attenuated because it still colonized mice and induced mild disease, suggesting that the two EspD chaperones play different roles.

Some CR LEE mutants ($\Delta rorf3$, $\Delta rorf16$, $\Delta cesD2$, and $\Delta sepZ$), although still able to colonize NIH Swiss mice, did not induce severe colonic hyperplasia. Several other mutants ($\Delta grlR$, Δmap , $\Delta cesF$, $\Delta rorf1$, $\Delta espG$, $\Delta espF$, and $\Delta espH$) displayed only slight attenuation in virulence in NIH Swiss or C57BL/6 mice, with $\Delta rorf1$ and $\Delta espG$ showing attenuated colonization and disease at early time points (Tables 5 and 6). We further characterized these mutants in the more susceptible C3H/HeJ mice (23). Although infection by WT resulted in 100% mortality between day 6 and 10 postinfection, C3H/HeJ mice infected by $\Delta rorf3$, $\Delta rorf16$, $\Delta cesD2$, and $\Delta sepZ$ survived, indicating that these mutants are attenuated in virulence (Fig. 9). Mice infected by $\Delta rorf1$, $\Delta espF$, and $\Delta cesF$ survived 2–3 days longer than mice infected by WT. Mutations in *grlR*, *map*, *espG*, and *espH* did not alter CR's lethality in C3H/HeJ mice, but these mutants showed more mouse to mouse variation than WT in colonization and colonic hyperplasia. Collectively, our results indicate that remarkably all of the LEE genes contribute to full CR virulence in mice.

Discussion

CR infection of mice offers many advantages as an animal model for studying the LEE function of A/E pathogens. To gain a global view of LEE's function as a PAI, we used a systematic approach to analyze all 41 CR LEE genes and functionally categorized their roles in virulence. Our results demonstrate that the entire LEE is needed for complete CR virulence in mice, in contrast to the redundancy of PAI genes in *Salmonella* and other pathogens (10).

In addition, our functional studies of CR LEE have yielded several significant findings. Besides Ler, the LEE encodes another positive regulator, GrlA, as well as a negative regulator, GrlR, indicating that regulation of LEE gene expression is much more complex than previously anticipated (2). Our results

Table 2. Effectors and putative effectors secreted by the LEE-encoded TTSS in *C. rodentium*

Serial number	Proposed name	Estimated kDa	Estimated pI	Gene location	Homologues in EHEC and other pathogens by BLASTP searches
5	Tir	68	5.0	LEE	Tir, conserved in all A/E pathogens.
10	EspG	44	7.3	LEE	EspG, conserved in all A/E pathogens.
C1&C2	Map	23	9.0	LEE	Map, conserved in all A/E pathogens.
C3	EspF	31	11.0	LEE	EspF, conserved in all A/E pathogens.
C5&C6	EspH	21	8.7	LEE	EspH, conserved in all A/E pathogens.
7	NleA	54	5.8	Non-LEE	EHEC Z6024 in O-island 71 near prophage CP-933P.
12	NleB	39	5.9	Non-LEE	EHEC Z4328 in O-island 122, REPEC LEE-associated RorfE, and <i>S. typhimurium</i> STMFI. Also homologous to Z0985 of O-island 36.
13	NleC	40	4.6	Non-LEE	EHEC Z0986 in O-island 36 near prophage CP-933K.
14	NleD	28	7.1	Non-LEE	EHEC Z0990 in O-island 36, in the same O-island as Z0985 and Z0986. Also similar to <i>P. syringae</i> effector HopPtoH.
17	NleE	27	6.3	Non-LEE	EHEC Z4329, in the same O-island 122 as Z4328. Also similar to REPEC LEE-associated RorfD, and <i>S. flexneri</i> ORF122.
19	NleF	24	4.7	Non-LEE	EHEC Z6020, in the same O-island 71 as Z6024. Similar to hypothetical proteins in <i>Yersinia pestis</i> and <i>Helicobacter pylori</i> .
20	NleG	26	5.8	Non-LEE	No homologue found. Peptide sequence identified: QQENAPSS(I/L)QTR.

Material Complementario

```

                                                                    *
SGH      MCPDNTHAKKQYLTPGNDIHYPGQTNHDACFIPVSVRQYA
CaiF     MCEG-----YV
GrlA     M-----ESKNSDYVIPDSVKNYN

          ***++++ *   +++*+   ++*   ***   +*   ++
SGH      GEPLYIIVAHWCLLQQNWVQRNQIAEAFHITARRASYLIA
CaiF     EKPLYLLIAEWMAENRWVIAREISIHFDIEHSKAVNTLT
GrlA     GEPLYILVSLWCKLQEKWISRNDIAEAFGINLRRASFIIT
                                     Helix-turn-helix motif

          *+      +      +      +      +      +      + +*
SGH      YLRSKTSRVVSIQRHQTLPN-KARRYEIIY-VIRVLDSPPT
CaiF     YILSEVTEISCEVKMIP-NKLEGRGCQCQRLVKVVDIDEQ
GrlA     YISRRKEKISFRVRYVSYGNLHYKRLEIF-IYNVNLEAAP

          +      +      *+      *+ +
SGH      STRREKAGPP-----LVSKRRVGNNGDRSM--ANELWNRLC
CaiF     IYARLRNNSREKLVGVRKTPRIPAVPLTELNREQKWQMM-
GrlA     TESHVSTGPK-----RKTLRVGNGIVG---QSSIWNEM-

          +++* +      +
SGH      SNRNAGKILKKKEDEDDGT (170 aa)
CaiF     ----LSKSMRR          (131 aa)
GrlA     -----IMRRKKE----S (135 aa)

```

Fig. 5. Sequence analyses of *C. rodentium* Orf11. *C. rodentium* Orf11/GrlA shows homology to the known positive transcriptional regulator CaiF (23% identity) (1) and an uncharacterized *Salmonella* protein encoded by a gene located downstream of the *std* fimbrial operon (37% identity) (2). The *Salmonella* homologue is indicated as SGH (*Salmonella* GrlA Homologue). Underlined is the predicted helix-turn-helix motif characteristic of DNA binding proteins. Identical amino acid residues are indicated by * whereas conserved changes are marked by +.

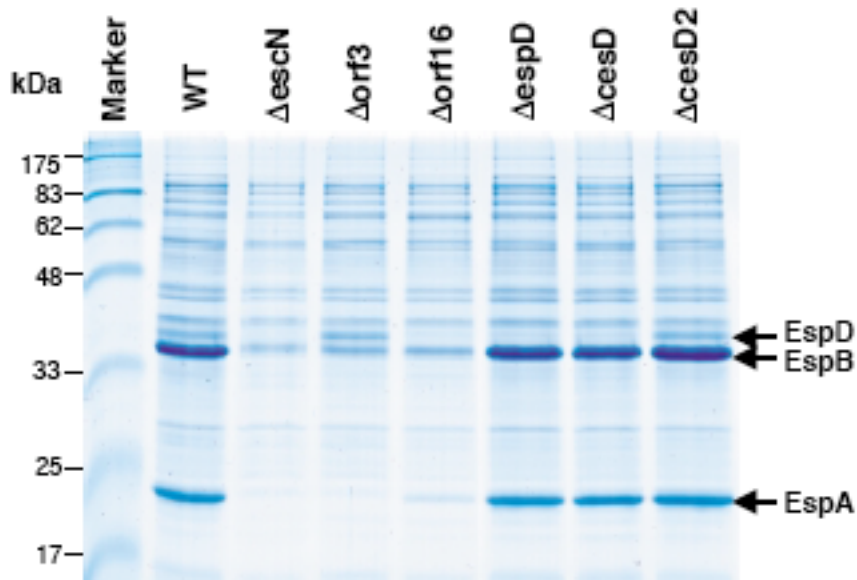


Fig. 7. Type III secretion profile for wild-type *C. rodentium* and its deletion mutants $\Delta orf3$, $\Delta orf16$, $\Delta espD$, $\Delta cesD$, $\Delta cesD2$, and $\Delta escN$ (type III mutant). Secreted proteins were precipitated by trichloroacetic acid from supernatants of bacterial cultures grown in DMEM. Proteins were analyzed by 15% SDS/PAGE and Coomassie blue G250 staining. *Citrobacter* $\Delta cesD$ mutant does not secrete EspD, similar to the same mutant of EPEC (1). However, the decrease in EspB secretion by *Citrobacter* $\Delta cesD$ mutant is not as evident as that by the EPEC mutant, suggesting that CesD's main chaperone function is for EspD, not EspB.

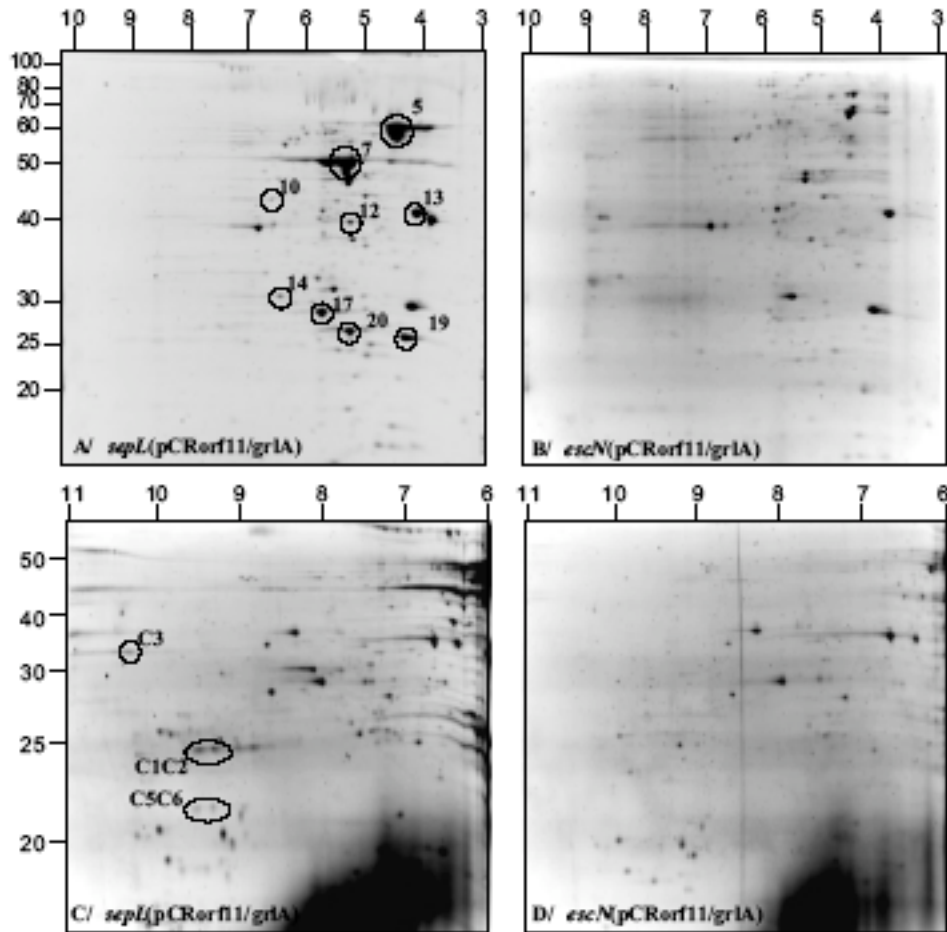


Fig. 8. Identification of both locus of enterocyte effacement (LEE)- and non-LEE-encoded secreted proteins by 2D gels and MS, as well as peptide-sequencing analyses. Secreted proteins from Δ sepL(pCRorf11/grlA) (A and C) and Δ escN(pCRorf11/grlA) (B and D) were focused in Immobiline Dry Strips with pH ranges of pH 3-10 (A and B) or 6-11 (C and D), and then resolved in 12% and 14% SDS/PAGE, respectively. Gels were stained with Sypro Ruby, and the encircled protein spots were analyzed by MS and de novo peptide sequencing. See Table 2 for the identity of the encircled proteins that are present in the secreted proteins of Δ sepL(pCRorf11/grlA), but not in that of Δ escN(pCRorf11/grlA).

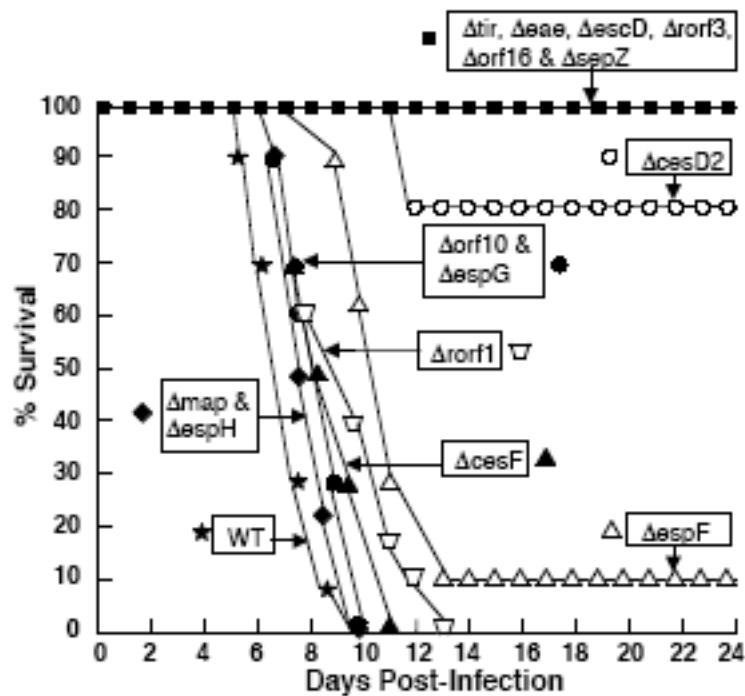


Fig. 9. Comparison of mortality seen in C3H/HeJ mice during infection by WT *Citrobacter rodentium* and its LEE deletion mutants Δtir , $\Delta aeae$, $\Delta escD$, $\Delta orf3$, $\Delta orf16$, $\Delta sepZ$, $\Delta cesD2$, $\Delta orf10$, $\Delta orf1$, $\Delta espG$, Δmap , $\Delta espH$, $\Delta espF$, and $\Delta cesF$. Groups of five 5-week-old C3H/HeJ mice were infected orally with 5×10^8 cfu of *C. rodentium* strains. The experiments were repeated two to four times, and the survival data from two representative experiments are shown. Each data point represents the percentage of mice still surviving from an initial population of 10 mice. Although the WT strain caused 100% mortality between day 6 and day 10 postinfection, most, if not all, mice infected with the LEE mutants Δtir , $\Delta aeae$, $\Delta escD$, $\Delta orf3$, $\Delta orf16$, $\Delta sepZ$, and $\Delta cesD2$ survived the infection, and the mutants $\Delta orf1$, $\Delta espF$, and $\Delta cesF$ caused repeatably delayed mortality in C3H/HeJ mice. No significant delay in mortality was observed for the mutants $\Delta orf10$, $\Delta espG$, Δmap , and $\Delta espH$.

¿Cómo regula GrlA la expresión de *ler* y Ler la expresión de *grlA*?

Con la evidencia de que GrlA regulaba de manera positiva la transcripción de *ler* en *C. rodentium* (17), el siguiente paso fue tratar de definir el mecanismo por el cual lo hacía. Para ello se hicieron fusiones transcripcionales de *ler* al gen reportero *cat* (fusiones CR*ler-cat*), las cuales contienen diferentes recortes del extremo 5' de su región reguladora (Fig. 1a. Barba *et al.* 2005) (5).

Previamente, Deng y col. reportaron que el inicio de la transcripción de *ler* de *C. rodentium* correspondía a una **A** ubicada a 156 pb del inicio de la traducción, y que poseía un promotor dependiente de sigma 70 muy similar al reportado previamente para *ler* de EPEC (Fig. 6A, material complementario, Deng *et al.* 2004) (17, 40).

La determinación de la expresión de las fusiones CR*ler-cat* en las cepas de *C. rodentium* (DBS100), *E. coli* K-12 (MC4100) y *E. coli* K-12 Δ *hns* (MC4100 Δ *hns*), mostró que la fusión pCR*ler-200* contenía todos los elementos en *cis* reguladores involucrados en la expresión de *ler*. Así mismo, el patrón de expresión de las fusiones CR*ler-cat* permitió definir la ubicación de la Secuencia de Regulación Negativa (NRS “Negative Regulatory Sequence”) y la Secuencia de Regulación Positiva (PRS “Positive Regulatory Sequence”), la primera contenida entre las posiciones -200 y -80 y la segunda comprendida entre -80 y -40, tomando como base el inicio de la transcripción del gen. Por otro lado, se observó que la expresión de CR*ler* era regulada negativamente por H-NS, tal y como se había reportado previamente para *ler* de EPEC (56), con base a que la fusión pCR*ler-40* aún muestra regulación por H-NS se definió esta proteína probablemente se unía, a *ler* de *C. rodentium* en un sitio comprendido entre -40 y +216. Así mismo, la falta de expresión de las fusiones CR*ler-cat* en *E. coli* K-12, confirmó que la expresión de *ler* depende de un regulador positivo, en este caso GrlA, presente sólo en *C. rodentium* (Fig. 1B. Barba *et al.* 2005) (5).

Con el objeto de delimitar la región reguladora de *ler* involucrada en la activación dependiente de GrlA, se evaluó la expresión de fusiones representativas (pCR*ler-200*, -80 y -40) en la mutante de *C. rodentium* en *grlA* (Δ *orf11*). Interesantemente, aun la expresión de la fusión que contiene sólo el promotor (pCR*ler-40*) se afecta por la

ausencia de GrlA (Fig. 2a. Barba *et al.* 2005) (5). De acuerdo con lo anterior, al evaluar la expresión de la fusión pCRler-40 en el fondo genético de *E. coli* K-12, que contiene a GrlA en *trans*, se observó que ésta se daba en altos niveles (Fig. 2B. Barba *et al.* 2005) (5). Estos resultados indicaron que GrlA es necesaria para permitir la expresión de *ler* y que ésta actúa en la región reguladora del gen comprendida entre las posiciones -40 y +216 (5). Por otro lado, la observación de que la expresión de estas mismas fusiones estuviera afectada en la mutante de *ler* de *C. rodentium* y que no fuera complementada por la expresión de Ler en *trans* en el fondo de *E. coli* K-12 (Fig. 2A y 2B. Barba *et al.* 2005) (5), nos sugería que Ler estaba regulando de manera positiva la expresión de un regulador necesario para su propia expresión.

Para probar dicha hipótesis, y siguiendo la misma estrategia, se construyeron fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, las cuales contienen diferentes fragmentos de la región codificante y reguladora de *rorf3*, *grlR* y *grlA* (Fig. 3A. Barba *et al.* 2005) (5). El análisis de la expresión de estas fusiones en los fondos genéticos de *C. rodentium* silvestre y Δ *ler* reveló que la expresión de la mayoría se encontraba abatida en el fondo mutante; a excepción de la fusiones pCRgrlRA-4, la cual carece de la región promotora que permite la expresión del operón *grlRA*, y pCRgrlRA-5 que carece de las secuencias de regulación negativa (NRS) (Fig. 3B. Barba *et al.* 2005) (5). Así mismo, al evaluar la expresión de estas mismas fusiones en el fondo genético de *E. coli* K-12, proveyendo a Ler y GrlA en *trans*, observamos que sólo Ler permitía su expresión (Fig. 5A. Barba *et al.* 2005) (5). Esta observación, junto con la que mostró que la expresión de *ler* dependía de GrlA, nos permitió proponer la existencia de un circuito de regulación positiva, que en este caso establecen Ler y GrlA, no descrito antes en procariotes (Fig. 7. Barba *et al.* 2005) (5)).

A Positive Regulatory Loop Controls Expression of the Locus of Enterocyte Effacement-Encoded Regulators Ler and GrlA

Jeannette Barba,¹ Víctor H. Bustamante,¹ Mario A. Flores-Valdez,¹ Wanyin Deng,²
B. Brett Finlay,² and José L. Puente^{1*}

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México,¹ and Michael Smith Laboratories, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada²

Received 8 June 2005/Accepted 31 August 2005

The formation of attaching and effacing (A/E) lesions on intestinal epithelial cells is an essential step in the pathogenesis of human enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* and of the mouse pathogen *Citrobacter rodentium*. The genes required for the development of the A/E phenotype are located within a pathogenicity island known as the locus of enterocyte effacement (LEE). The LEE-encoded transcriptional regulators Ler, an H-NS-like protein, and GrlA, a member of a novel family of transcriptional activators, positively control the expression of the genes located in the LEE and their corresponding virulence. In this study, we used *C. rodentium* as a model to study the mechanisms controlling the expression of Ler and GrlA. By deletion analysis of the *ler* and *grlA* regulatory regions and complementation experiments, negative and positive *cis*-acting regulatory motifs were identified that are essential for the regulation of both genes. This analysis confirmed that GrlA is required for the activation of *ler*, but it also showed that Ler is required for the expression of *grlA*, revealing a novel regulatory loop controlling the optimal expression of virulence genes in A/E pathogens. Furthermore, our results indicate that Ler and GrlA induce the expression of each other by, at least in part, counteracting the repression mediated by H-NS. However, whereas GrlA is still required for the optimal expression of *ler* even in the absence of H-NS, Ler is not needed for the expression of *grlA* in the absence of H-NS. This type of transcriptional positive regulatory loop represents a novel mechanism in pathogenic bacteria that is likely required to maintain an appropriate spatiotemporal transcriptional response during infection.

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), and *Citrobacter rodentium* belong to a family of bacterial pathogens causing a destructive lesion of the intestinal enterocyte, called the attaching and effacing (A/E) lesion, as well as gastrointestinal disorders in infected hosts (reviewed in references 28 and 33). EPEC is an important etiological agent of childhood diarrhea in developing countries, whereas EHEC is the cause of frequent outbreaks of food and water poisoning in the developed world. In addition to causing diarrhea, an EHEC infection can result in severe complications, such as hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome (reviewed in reference 33). Due to the specificity of EPEC and EHEC for human hosts, a corresponding small-animal infection model does not exist. Thus, most of the current models to explain EHEC and EPEC pathogen-host interactions, such as those for A/E lesion formation, have been developed based on *in vitro* studies performed with infected cultured epithelial cells. In recent years, *C. rodentium* has become accepted as a representative infection system to study the mechanisms leading to the production of the A/E lesion and A/E-associated pathogenesis (12, 13, 47).

The A/E lesion is characterized by a localized loss of microvilli from the surfaces of epithelial cells and important cytoskeleton rearrangements beneath the adherent bacteria, leading to the formation of actin-rich cup-like structures and intimate bacterium-host cell interactions. Intimate adherence is mediated by the interaction between Tir (translocated intimin receptor), a bacterial protein that is translocated and inserted into the host cell membrane, and intimin, a bacterial outer membrane adhesin (reviewed in reference 7). The genes required for the formation of the A/E lesion in EPEC, EHEC, and *C. rodentium* are located within a pathogenicity island known as the locus of enterocyte effacement (LEE), where they are organized in five polycistronic operons (*LEE1-LEE5*), two putative bicistronic operons, and four monocistronic units (8). The *LEE1* to *LEE3* operons encode mostly structural components of a type III secretion system (Esc and Sep), the *LEE4* operon encodes proteins involved in protein translocation (EspA, B, and D and SepL), and the *LEE5* operon encodes the proteins required for intimate attachment (intimin and Tir). The genes encoding effector proteins, chaperones, and transcriptional regulators are scattered along the LEE (reviewed in references 7 and 8). During A/E lesion formation, several LEE-encoded proteins (Tir, Map, EspF, EspG, EspH, and EspZ), as well as non-LEE-encoded proteins (NleA/EspI, EspFu/TccP, EspJ, and Cif), are translocated by the type III secretion apparatus into the host epithelial cells, where they affect different signaling processes (reviewed in references 10 and 20).

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, México. Phone: (52) (777) 329-1621. Fax: (52) (777) 313-8673. E-mail: puente@ibt.unam.mx.

Several studies have shown that Ler (*LEE*-encoded regulator), a 15-kDa protein encoded by the first gene of the *LEE1* operon, is a central positive regulator needed for the expression of the *LEE* genes (5, 16, 19, 31) as well as the non-*LEE*-carried gene *espC* (32). Ler belongs to the H-NS family of nucleoid-associated proteins, exhibiting high amino acid identity with the carboxy termini of these proteins, which contain the DNA binding domain (16). The global regulator H-NS (14) represses the expression of several *LEE* genes, and Ler induces the expression of these genes by counteracting the H-NS-mediated repression (5, 24, 46). Thus, Ler is primarily an antirepressor needed to conduct gene expression (5, 24, 46).

Different studies of EPEC and EHEC have shown that *ler* expression is regulated by a complex assortment of global and A/E-specific regulators. The global regulator integration host factor (IHF), which directly binds to a DNA region upstream of the *ler* promoter, is essential for *ler* activation (19). *ler* is also positively regulated by other global regulators, such as BipA, a member of the ribosome-binding GTPase superfamily (23); Fis (factor for inversion stimulation), a bacterial nucleoid-associated protein (21); and QseA (quorum-sensing *E. coli* regulator A), a factor involved in regulation via quorum sensing (42). H-NS and Hha play a negative role in *ler* expression, with both binding directly to its regulatory region (40, 46). In addition, specific regulators such as PerC, the product of the third gene of the *per* locus located in the EPEC adherence factor plasmid, can directly activate the expression of *ler* (5, 31, 35, 36). PerC-like proteins have also been identified in EHEC and are involved in *ler* expression (25). GadX regulates the expression of the *perABC* operon and thus indirectly regulates the expression of *ler* (41). It has been reported that Ler binds to its own regulatory region and autorepresses its transcription in a concentration-dependent manner (2). The negative regulation of *LEE* gene expression is also mediated by YhiE and YhiF (44) as well as by EtrA (*E. coli* type III secretion system 2 regulator A) and EivF (49) by mechanisms that remain to be defined. We have recently identified two novel *LEE*-encoded regulators, GrIA (global regulator of *LEE* activator; formerly called Orf11) and GrIR (Grl repressor; formerly called Orf10), which are highly conserved in all A/E pathogens (12). These proteins are encoded by the putative *grlRA* operon located between the *rorf3* gene and the *LEE2* operon in the *LEE*. GrIA is a positive regulator of *ler* expression (12). The closest GrIA homologue is the putative product of an uncharacterized gene found in different *Salmonella enterica* serotypes. In addition, GrIA is 23% identical to CaiF, a regulatory protein responsible for the carnitine-dependent induction of the *cai* and *fix* *E. coli* operons under anaerobic conditions and the best-characterized member of this novel family of transcriptional regulators (15). A motif search of GrIA has also revealed the presence of a putative helix-turn-helix DNA binding motif at its N-terminal domain, where most of the similarity with CaiF and the *Salmonella* GrIA homologue (Sgh) is found (12). GrIR has a significant negative effect on *LEE* gene expression, probably acting as a negative regulator of *ler* (12, 26, 27), although its mechanism of action remains to be defined. PSI-BLAST searches have identified only one other GrIR homologue, located next to a GrIA homologue in *Salmonella bongori* (34). For the present study, we used *C. rodentium* as a model to study the mechanisms controlling the expression of the genes

encoding the positive regulators Ler and GrIA. Although *C. rodentium* has been used as a model organism to study EPEC and EHEC, there is little known about the regulation of its *LEE* gene expression. Here we characterize the regulatory regions of the *C. rodentium ler* and *grlRA* genes in detail. Furthermore, we demonstrate that Ler and GrIA regulate each other, forming a transcriptional positive regulatory loop that, to our knowledge, represents a novel mechanism controlling gene expression in bacteria.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. The bacterial strains and plasmids used in this work are described in Table 1. Luria-Bertani (LB) broth (37) or Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing glucose (0.45% [wt/vol]) and L-glutamine (584 mg liter⁻¹), but not sodium pyruvate (Gibco BRL Life Technologies), was used for static cultures at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. When required, antibiotics were added at the following concentrations for LB cultures: ampicillin (Amp), 100 µg ml⁻¹; carbenicillin (Cb), 100 µg ml⁻¹; kanamycin (Km), 25 µg ml⁻¹; tetracycline (Tc), 12 µg ml⁻¹; and streptomycin (Stp), 100 µg ml⁻¹. The following antibiotic concentrations were used for DMEM cultures, when required: Amp, 50 µg ml⁻¹; Cb, 50 µg ml⁻¹; and Tc, 5 µg ml⁻¹. Test cultures were inoculated as described before (13). Culture samples to determine chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity were collected at 6 h. At this time point, all strains reached similar optical densities. Each experiment was done independently in duplicate at least three times.

DNA manipulations. Recombinant DNA techniques were performed according to standard protocols (1, 37). Restriction enzymes were obtained from Invitrogen or New England Biolabs and used according to the manufacturer's instructions. The oligonucleotides used for amplification by PCR and for primer extension experiments (Table 2) were synthesized by the oligonucleotide synthesis facility at our institute. PCRs were performed in 100-µl reaction mixtures containing a 1.5:1 mixture of AmpliTaq and Pfu DNA polymerases, using an Eppendorf mastercycler gradient thermocycler.

Construction of *ler-cat* and *grlRA-cat* transcriptional fusions. Oligonucleotides were designed for PCR amplification of different fragments spanning the *ler* regulatory region and the *rorf3-grlRA* region (Table 2). PCRs were performed using these oligonucleotides, with *C. rodentium* DBS100 chromosomal DNA as the template. The PCR fragments were double digested with BamHI and HindIII and ligated into pKK232-8 (Pharmacia LKB Biotechnology), which contains a promoterless *cat* gene, digested with the same enzymes. Combination of the forward primers CRler-260, CRler-200, CRler-160, CRler-120, CRler-80, and CRler-40 with the reverse primer Orf1-H3-R was used for the construction of the fusions pCRler-260, -200, -160, -120, -80, and -40, respectively. Fusions pCRgrlRA-1, -2, and -3 were constructed using the forward primer CR-ORF10-BHI in combination with the reverse primers CR-ORF10-HIII-A, CR-ORF10-HIII-B, and CR-ORF11-H3, respectively. pCRgrlRA-4 was constructed using primers CR-ORF11-BHI and CR-ORF11-H3. The forward primer CR-RORF3-BH and the reverse primers CR-ORF10-HIII-A and CR-ORF11-H3 were used to construct pCRgrlRA-5 and -6, respectively. The nucleotide sequences of the *ler-cat* and *grlRA-cat* fusions were determined in the sequencing facility at our institute.

Construction of *E. coli* MC4100 Δ*hns*::Km mutant. Deletion of the *hns* gene from *E. coli* MC4100 was performed by the one-step mutagenesis procedure for bacterial genes described by Datsenko and Wanner (9). The deletion eliminated 131 codons out of the 137 codons of the *hns* gene, which were replaced with a Km resistance marker. Primers *hns*H1P1 and *hns*H2P2 and DNA of plasmid pKD4 were used to generate the deletion cassette. The replacement of *hns* by the Km resistance marker was confirmed by PCR using primers *hns*M and *hns*G. The resulting strain was designated JPMC1 (Table 1).

PCR cloning of *ler* and *grlA*. The primer pairs Cler-RBS-F (BamHI)/ClerOrf1-R (HindIII) and CROrf11Xho/EpCiorf11R-H3 were used to amplify the *C. rodentium ler* and *grlA* genes, respectively. The resulting PCR products were digested with the BamHI-HindIII and XhoI-HindIII restriction enzymes, respectively, and ligated into pMPM-T3 (30) digested with the same enzyme combinations, generating plasmids pTCRLer4 and pTCRGrIA1 (Table 1). The identity of the inserts was confirmed by DNA sequencing. The plasmids contain the promoterless *ler* or *grlA* gene plus the putative ribosome-binding sites and are expressed from the vector *lac* promoter.

CAT assay. CAT assays and protein quantification to calculate CAT specific activities were performed as described previously (29).

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used for this study

Strain or plasmid	Description ^a	Reference or source
<i>C. rodentium</i> strains		
DBS100	Wild type (ATCC 51459)	39
Δ ler	DBS100 carrying an in-frame deletion of <i>ler</i>	12
Δ orf11/ <i>grlA</i>	DBS100 carrying an in-frame deletion of <i>grlA</i>	12
<i>E. coli</i> strains		
MC4100	F' <i>araD139</i> Δ (<i>argF-lac</i>)U169 <i>rpsL150 relA1 flb5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	6
JPMC1	MC4100 Δ <i>hns</i> ::Km	This study
BL21/pLys21	F ⁻ <i>ompT</i> (<i>lon</i>) <i>hsdS_B</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (λ DE3)	Invitrogen
N99	<i>E. coli</i> K12 F ⁻ <i>galK2 rpsLl</i>	22
K5185	N99 Δ <i>himA82</i>	18
Plasmids		
pKD46	Red recombinase system under <i>araB</i> promoter; Ap ^r	9
pKD4	Template plasmid containing the Km cassette for lambda Red recombination	9
pMPM-T3	Low-copy-number cloning vector; p15A derivative; Tc ^r	30
pTCRLer4	pMPM-T3 derivative carrying the <i>ler</i> structural gene and ribosome binding site under the control of the <i>lac</i> promoter	This study
pTCRGrIA1	pMPM-T3 derivative carrying the <i>grlA</i> structural gene and ribosome binding site under the control of the <i>lac</i> promoter	This study
pMPM-T6	Cloning vector containing an arabinose-inducible promoter; p15A derivative; Tc ^r	30
pT6HNS	pMPM-T6 derivative expressing H-NS-His ₆ under the control of the arabinose-inducible promoter	Unpublished
pT6Ler	pMPM-T6 derivative expressing Ler-His ₆ under the control of the arabinose-inducible promoter	Unpublished
pKK232-8	pBR322 derivative containing a promoterless chloramphenicol acetyltransferase (<i>cat</i>) gene	Pharmacia LKB Biotechnology
pLEE2-CAT	pKK232-8 derivative carrying <i>C. rodentium</i> <i>LEE2-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -375 to +121	12
PCRler-260	pKK232-8 derivative carrying <i>C. rodentium</i> <i>ler-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -265 to +216	This study
pCRler-200	<i>CRler-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -197 to +216	This study
pCRler-160	<i>CRler-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -163 to +216 (pLEE1-CAT)	12
pCRler-120	<i>CRler-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -123 to +216	This study
pCRler-80	<i>CRler-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -86 to +216	This study
pCRler-40	<i>CRler-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -44 to +216	This study
pCRgrlRA-1	pKK232-8 derivative carrying <i>C. rodentium</i> <i>grlRA-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -420 to +152	This study
pCRgrlRA-2	<i>CRgrlRA-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -420 to +397	This study
pCRgrlRA-3	<i>CRgrlRA-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -420 to +565	This study
pCRgrlRA-4	<i>CRgrlRA-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides +212 to +565	This study
pCRgrlRA-5	<i>CRgrlRA-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -135 to +152	This study
pCRgrlRA-6	<i>CRgrlRA-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -135 to +565	This study

^a The coordinates for *cat* transcriptional fusions are indicated with respect to the *ler* or *grlR* transcriptional start site.

RNA isolation and primer extension analysis. Total RNAs were isolated from samples of cultures grown for 6 h in DMEM at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere without agitation, using an RNeasy kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. The RNA concentration and quality were determined by measuring the *A*₂₆₀-to-*A*₂₈₀ ratio and by gel electrophoresis. Primer extension reactions were performed as described previously (29). Briefly, oligonucleotides complementary to the *grlR* (CR-ORF10-HIII-A) or *ompA* (*ompA*PE) (Table 2) coding region were end labeled with [γ -³²P]dATP, using T4 polynucleotide kinase, and annealed with 8 μ g (for *grlR*) or 0.8 μ g (for *ompA*) of total RNA in 0.37 M NaCl-0.035 M Tris-HCl (pH 7.5) by heating for 3 min at 90°C and then cooling slowly to 50°C. Reverse transcription reactions were performed at 42°C for 2 h with 10 U of avian myeloblastosis virus reverse transcriptase (Boehringer Mannheim) in avian myeloblastosis virus buffer containing 1 mM dithiothreitol, a 0.3 mM concentration of each deoxynucleoside triphosphate, and 50 U of RNase inhibitor (Invitrogen). The reverse transcription products were cleaned and concentrated using a Microcon YM-30 microconcentrator (Amicon) according to the specifications of the manufacturer, denatured by heating to 95°C for 5 min in loading buffer, and resolved by electrophoresis through an 8% polyacrylamide-7 M urea-Tris-borate-EDTA sequencing gel. The gel was analyzed using

a PhosphorImager scanner (Molecular Dynamics). The transcriptional start site was determined by comparison with a DNA ladder obtained by sequencing plasmid pCRgrlRA-3 (Table 1), using primer CR-ORF10-HIII-A (Table 2).

Expression and purification of His-tagged H-NS and Ler proteins. *E. coli* BL21/pLys21 harboring the pT6HNS or pT6Ler plasmid (Table 1), expressing H-NS-His₆ or Ler-His₆, respectively, was grown to mid-logarithmic phase at 37°C. L-(+)-Arabinose (Sigma-Aldrich) was added to a final concentration of 0.1%, and the bacteria were further incubated for 4 h at 30°C and 250 rpm. Cells were then pelleted by centrifugation at 4°C, resuspended in urea buffer (pH 8.0) (8 M urea, 20 mM NaH₂PO₄, and 2 M Tris-HCl), and disrupted by sonication. The suspension was centrifuged at 4°C, and the supernatant was filtered through a 0.22- μ m membrane (Millipore) and applied to a HiTrap Ni²⁺-chelating column, which was loaded with 100 mM NiSO₄ and connected to a minichromatographer ÄKTA prime system (Amersham Pharmacia Biotech). Proteins were eluted with a pH gradient (pH 8.0 to 4.5) of urea buffer (8 M urea, 20 mM NaH₂PO₄, and 2 M Tris-HCl). Fractions containing purified H-NS-His₆ or Ler-His₆ were selected based on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis. The selected fractions were loaded into a Slide-A-Lyzer 10K cassette (Pierce) and gradually dialyzed at 4°C in a buffer containing 50 mM

TABLE 2. Primers used for this study

Primer	Sequence ^a (5'-3')
Orf1-H3-R	gctctatAagctTaagtatg
CRler-260	gaaaaatggAtCggttactg
CRler-200	cctggaTCCttgatctga
CRler-160	caatacggAtcCggcgagccg
CRler-120	attaatggaTCCacaata
CRler-80	actagctGGatcCttataat
CRler-40	tttttaattggGatCCtttt
CR-ORF10-HIII-A	cccacaggaGcttcattac
CR-ORF10-HIII-B	ctgacataaGcTtcaacaataac
CR-ORF11-H3	tatacagaAgctTaccattgtaa
CR-ORF10-BHI	tgcaccacaggGatccacg
CR-ORF11-BHI	atttcctctgtGatcCggggg
CR-RORF3-BH	aaacaatcagaagGatCCcaaaagttagt
Cler-RBS-F	catgtaaggatCCgcttgttaa
ClerOrf1-R	gttcagttaaGCTtattcattta
CRorf11Xho	cagatttCtgaGcctgtaattat
EpCiorf11R-H3	tactaagaAagcttcgcttaactcc
ompAPE	tttgcgctcttatcatcaa
hnsH1P1	caccaataataagtttgagattactacaatgag cgaagctgtaggctggagctgcttcg
hnsH2P2	gattttaagcaagtgcaatctacaagaattat tgcttcatatgaatatcctcctt
hnsM	tgcgagctcatcggtgtaa
hnsG	ttgctggcaaaaacctccg

^a Capital letters indicate changes in the oligonucleotide sequence with respect to the wild-type sequence, designed to introduce restriction enzyme sites.

Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 20% glycerol, 0.5 M NaCl, 0.1% Triton X-100, and various amounts of urea (4, 1, and 0.2 M), which was changed every hour. The final dialysis was done in storage buffer containing 30 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 20% glycerol, 240 mM NaCl, 0.1% Triton X-100, and 3 mM EDTA, and aliquots of the purified proteins were stored at -70°C. Protein concentrations were determined by the Bradford procedure.

EMSAs. Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were performed as follows. Approximately 100-ng samples of PCR-generated DNA fragments corresponding to the inserts carried by the *grlA-cat* fusions were mixed with increasing concentrations of purified Ler-His₆ or H-NS-His₆ protein in a buffer containing 11.7 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.975 mM EDTA, 78 mM NaCl, 9.75 mM 2-mercaptoethanol, 0.975 mM dithiothreitol, and 6.5% glycerol. The reactions were incubated for 30 min at room temperature and then separated by electrophoresis in 4% polyacrylamide gels in 0.45× Tris-borate-EDTA buffer at room temperature. The DNA bands were stained with ethidium bromide and visualized with an Alpha-Imager UV transilluminator (Alpha Innotech Corp.). A fragment containing the *ler* structural gene of EPEC was used as a negative control when evaluating H-NS-DNA interactions, as previously described (17).

RESULTS

cis-acting elements involved in transcriptional regulation

of *C. rodentium* *ler*. We constructed a series of transcriptional fusions to the *cat* reporter gene in plasmid pKK232-8, encompassing different lengths of the *ler* 5' upstream regulatory region, to determine the *cis*-acting elements controlling its expression (Fig. 1A). The promoterless *cat* reporter gene has proven to be a reliable system for analyzing gene expression in A/E pathogens (5, 29, 38). The *ler-cat* fusions were called pCRler-260, -200, -160, -120, -80, and -40 according to the positions of their 5' ends with respect to the transcriptional start site (12). All of the *ler-cat* fusions contained a common 3' end at position +216 with respect to the transcriptional start site (Fig. 1A). The plasmids containing the fusions were transformed into *C. rodentium* DBS100, the prototype wild-type strain (Table 1), and the CAT specific activity was determined from bacterial cultures grown under inducing conditions for

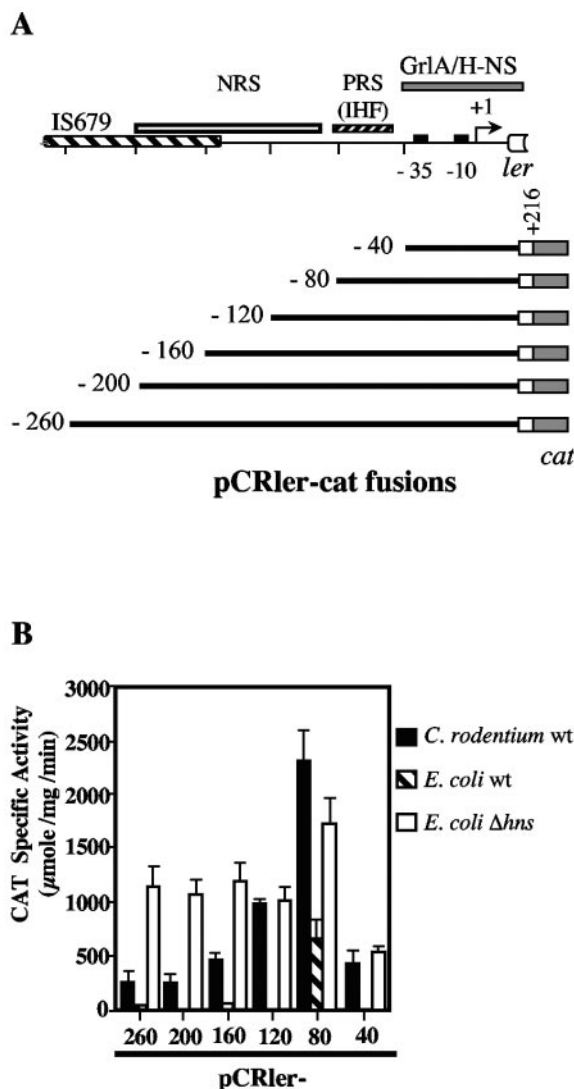


FIG. 1. Expression of *C. rodentium* *ler* is regulated by global and specific regulators. (A) Schematic representation of the *ler* regulatory region. The bent arrow indicates the previously reported transcriptional start site (+1) (12). -35 and -10 consensus sequences are shown as black boxes. A large hatched box represents the insertion sequence element (IS679) localized at the 5' end of the *C. rodentium* LEE (11). Open and hatched boxes indicate the approximate positions of negative and positive regulatory sequences (NRS and PRS), respectively, revealed by expression analysis of *ler-cat* transcriptional fusions. The PRS contains the putative IHF binding site. A gray box indicates a region required for GrlA and H-NS-mediated regulation of *ler*. Schematic representations of the *ler-cat* transcriptional fusions are shown below the diagram of the *ler* regulatory region. The *ler-cat* fusions were named pCRler and numbered according to the position of the 5' end of the *ler* region contained in each fusion with respect to the transcriptional start site. (B) Expression of the *ler-cat* fusions was monitored in *C. rodentium* DBS100, *E. coli* MC4100, and *E. coli* MC4100 Δhns. The CAT specific activity was determined from samples collected from bacterial cultures grown for 6 h in DMEM at 37°C without agitation in a 5% CO₂ atmosphere. The values are the means of at least three independent experiments performed in duplicate. Standard errors are shown with error bars.

the expression of *C. rodentium* LEE genes, as described in Materials and Methods. Fusions pCRler-260 and pCRler-200 expressed similar levels of CAT (Fig. 1B), whereas pCRler-160, -120, and -80 showed a gradual increase in CAT activity with respect to the expression shown by pCRler-200 (Fig. 1B). These results indicate that the region between positions -200 and -80 contains *cis*-acting elements that negatively control *ler* expression. The fusion pCRler-40, which still contains the *ler* promoter, showed an approximately sixfold reduced activity with respect to the expression shown by pCRler-80 (Fig. 1B), indicating the presence of positive regulatory *cis*-acting elements between positions -80 and -40. This region is equivalent to the one containing the IHF binding site previously found to be essential for *ler* expression in EPEC (19), suggesting that IHF plays a similar role in the expression of *C. rodentium* *ler*. In agreement with this hypothesis, the pCRler-80 fusion, which renders significant levels of expression in an *E. coli* K-12 strain (Fig. 1B), was no longer active in an isogenic *E. coli* *ihf* mutant (data not shown).

H-NS negatively regulates the expression of *C. rodentium* *ler*.

It has previously been reported that H-NS represses the expression of *ler* in EPEC (46). To further characterize the role of H-NS and the elements controlling the expression of *C. rodentium* *ler*, the plasmids containing the *ler*-*cat* fusions were transformed into *E. coli* K-12 and its isogenic *hns* mutant, and the CAT activity was measured after the strains were grown under inducing conditions. Expression in *E. coli* K-12 was close to the background level for all fusions except for pCRler-80 (Fig. 1B), further supporting the notion that *C. rodentium* contains specific positive regulatory factors for *ler* expression that are not present in *E. coli* K-12. In contrast, all fusions were expressed in the *E. coli* *hns* mutant at a similar or even higher level than that in *C. rodentium* (Fig. 1B), confirming the role of H-NS as a repressor of *ler* expression. Interestingly, the fusion pCRler-40, containing only the promoter, was still partially expressed in *C. rodentium* and in the *E. coli* *hns* mutant, but not in wild-type *E. coli* K-12 (Fig. 1B). This indicates that *cis*-acting elements required for positive regulation by a *C. rodentium* factor and for H-NS-mediated repression are present in the region between positions -40 and +216 of *ler*.

GrlA positively regulates the expression of *C. rodentium* *ler*.

In addition to the set of global regulators currently known to regulate *ler* expression in A/E pathogens, we have recently reported that the expression of *ler*, and thus of the LEE genes involved in the development of the A/E lesion, requires a second LEE-encoded regulator called GrlA (12). To define the regulatory region required for the GrlA-mediated activation of *ler*, we analyzed the CAT activity driven from three representative *ler* fusions (pCRler-200, -80, and -40) in wild-type *C. rodentium* and its Δ *grlA* derivative. According to the results shown in Fig. 1, pCRler-200 contains all of the regulatory elements involved in *ler* regulation, pCRler-80 lacks putative negative regulatory elements located upstream of the putative IHF binding site and showed a 10-fold increase in activity with respect to the longest fusions in the wild-type strain, and pCRler-40 contains the promoter and downstream elements involved in positive and negative regulation. In the *grlA* mutant, the transcriptional activity of pCRler-200 was reduced to background levels, confirming the requirement of GrlA for *ler* expression (Fig. 2A). The activity of pCRler-80 showed a

threefold decrease in the *grlA* mutant compared to that in the wild-type strain, indicating that even in the absence of negative *cis*-acting regulatory elements, GrlA was still needed for full *ler* promoter activation. Interestingly, the expression of pCRler-40 was also abolished in the absence of GrlA (Fig. 2A). To further confirm the direct positive role of GrlA on *ler* expression, the CAT activities of these three fusions were determined in the nonpermissive *E. coli* K-12 strain in the presence of a plasmid carrying *grlA* (pTCRgrlA1) expressed from the *lac* promoter on the vector. As shown in Fig. 2B, GrlA activated high levels of expression of fusions pCRler-200 and pCRler-40 and further increased (approximately fivefold) the activity of pCRler-80, while no changes were observed with the vector alone. Together, these results strongly suggest that GrlA is directly involved in *ler* activation, probably interacting with *cis*-acting elements located between positions -40 and +216 (Fig. 1A). In addition, these results indicated that sequences located upstream of position -40, including the putative IHF binding site, are not required for the GrlA-mediated activation of the *ler* promoter. Nonetheless, the presence of the sequence up to position -80 enhances the GrlA-dependent expression of the *ler* promoter as well as the level of GrlA-independent *ler* expression.

Autoregulation of *C. rodentium* *ler*. The autoregulation of *ler* expression was examined by performing a similar analysis of the pCRler-*cat* fusions in the *C. rodentium* *ler* mutant strain as well as in *E. coli* K-12 carrying a plasmid expressing Ler. The expression of pCRler-200, pCRler-80, and pCRler-40 showed a 4-, 1.4-, and 10-fold reduction, respectively, in the *ler* mutant compared with the expression in the wild-type strain (Fig. 2A). The high levels of expression of pCRler-80 in the Δ *ler* strain were roughly the same in the wild-type strain, supporting the proposal that this fusion lacks a negative regulatory motif that is required for repression of the *ler* promoter (see above). The results obtained with pCRler-200 and pCRler-40 suggested that *ler* expression could be directly autoregulated by its own product or indirectly regulated through an additional regulator encoded by a Ler-regulated gene. To discriminate between these two possibilities, we measured the expression of fusions pCRler-200, -80, and -40 in *E. coli* K-12 containing a plasmid carrying the *ler* gene (pTCRLer4). In contrast to the strong GrlA-mediated activation of *ler* expression in the nonpermissive *E. coli* background, the presence of Ler did not increase *ler*-*cat* expression (Fig. 2B). Conversely, the GrlA-independent expression of the *ler* promoter in pCRler-80 was reduced sevenfold in the presence of a plasmid expressing Ler (Fig. 2B), supporting the notion that Ler may negatively autoregulate its own expression to optimize its cellular levels, preventing the uncontrolled expression of LEE genes, as recently proposed (2). As a control, the expression of a transcriptional fusion to the *LEE2* promoter (pLEE2-*cat*), whose expression is Ler dependent, was measured. As expected, this fusion was not active in the presence of plasmid-encoded GrlA, while as previously shown (5), its expression was increased significantly in the presence of plasmid-encoded Ler (Fig. 2B).

Taken together, these results rule out a direct positive autoregulation of *ler* expression by Ler itself, at least in the absence of other A/E-specific factors, and suggest that Ler could be involved in regulating a positive regulatory loop by reciprocally controlling GrlA expression (see below).

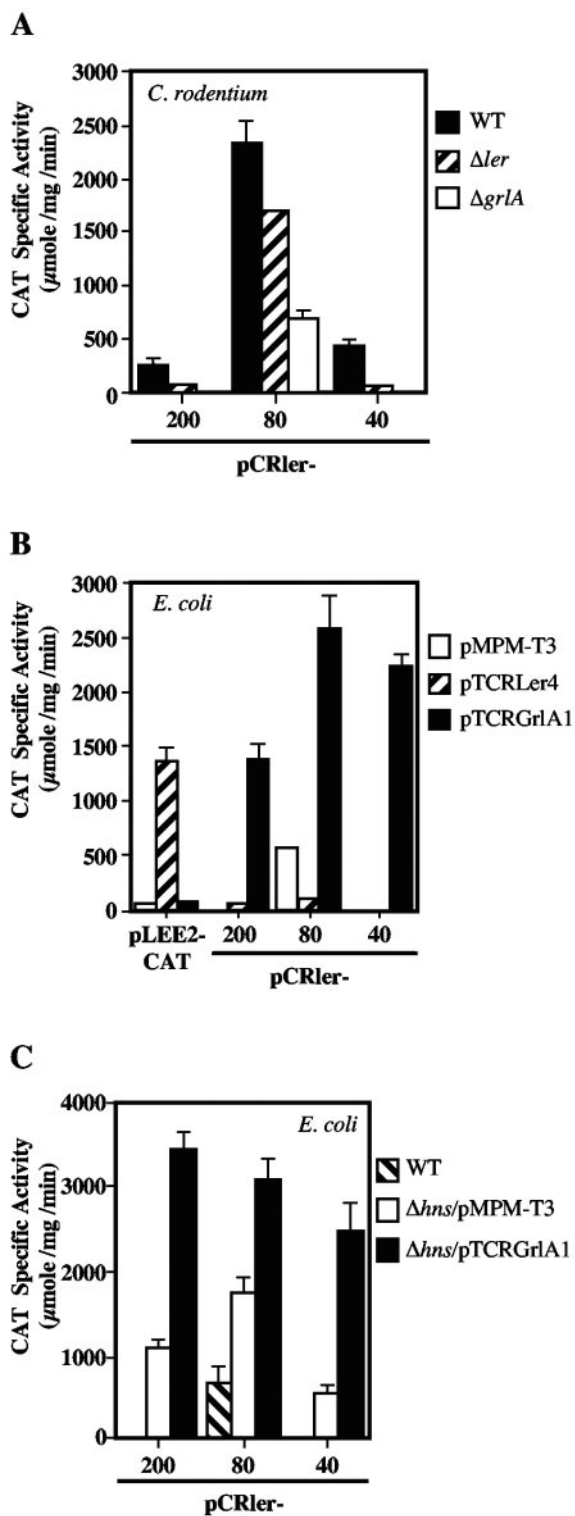


FIG. 2. GrlA is required for expression of *C. rodentium* *ler*. The expression of representative *ler-cat* fusions was monitored in *C. rodentium* DBS100, *C. rodentium* Δ *ler*, and *C. rodentium* Δ *grlA* (A) or in *E. coli* MC4100 containing the pMPM-T3 vector or its derivative pTCRLer4 or pTCRGrIA1, expressing Ler or GrlA, respectively. As a control, the expression of a *LEE2-cat* fusion (pLEE2-CAT) was analyzed in the same strains (B). The expression of representative *ler-cat* fusions was monitored in *E. coli* MC4100 and its isogenic *hns* mutant containing plasmid pMPM-T3 or pTCRGrIA1 (C). The CAT

Effect of GrlA on *ler* expression in the absence of H-NS. The expression of pCRler-40, which lacks the sequences upstream of the *ler* promoter, was abolished in a *C. rodentium* *grlA* mutant and restored in *E. coli* K-12 by a plasmid expressing GrlA (Fig. 2A and B). In addition, this fusion was active in the absence of H-NS (Fig. 1B) but did not reach the levels seen in wild-type *E. coli* K-12 carrying the plasmid expressing GrlA (Fig. 2B). These results led us to believe that both regulators (GrlA and H-NS) perform their function by interacting with elements located downstream of position -40 and that GrlA, although it can in part counteract H-NS-mediated repression, is essential for the efficient activation of the *ler* promoter, even in the absence of H-NS. In order to investigate this hypothesis, the expression of fusions pCRler-200, -80, and -40 in *E. coli* K-12 Δ *hns* containing plasmid pTCRGrIA1 was determined. As shown in Fig. 2C, the presence of GrlA further increased the expression of pCRler-200, -80, and -40 approximately three-, two-, and fivefold, respectively, compared to the activity observed in the *E. coli* K-12 *hns* mutant strain carrying the vector. Although other scenarios cannot be excluded at this point, two possibilities may explain this result. In addition to H-NS, another factor could also partially repress *ler* expression, and thus GrlA could counteract the total repression exerted by more than one negative regulator. Alternatively, GrlA may counteract the H-NS-mediated repression but also promote the interaction of the RNA polymerase with the *ler* promoter.

To further define the mechanism by which GrlA induces the expression of *ler*, GrlA fused to a six-His or maltose binding protein (MBP) tag was purified. Both fusion proteins restored protein secretion in the *C. rodentium* *grlA* mutant when expressed *trans* (data not shown). However, when using the purified proteins, we were unable to detect GrlA binding to DNA fragments containing the regulatory region of *ler* by EMSA, even with protein concentrations as high as 25 μ M (data not shown).

Identification of *cis*-acting elements involved in the regulation of *grlA* expression. As described above, Ler does not directly regulate its own expression, but could indirectly autoregulate it in a positive manner by reciprocally regulating GrlA expression. In order to test this hypothesis, the regulation of the *grlR* and *grlA* genes was studied using a series of transcriptional fusions containing different segments of the 5' upstream region of *grlR* and *grlA* fused to the *cat* reporter gene (Fig. 3A). Expression was measured in wild-type *C. rodentium* and its isogenic *ler* and *grlA* mutants. The tandem organization of the *grlR* and *grlA* genes suggested that they were transcribed as an operon from a promoter located upstream of *grlR*. In support of this notion, a transcriptional fusion between the *grlR-grlA* intergenic region and the *cat* reporter gene (pCRgrlIRA-4) was inactive in all three strains tested, while a fusion carrying the intergenic region between *grlR* and the divergently transcribed *rorf3* gene (pCRgrlIRA-5) was highly active in the wild-type strain (Fig. 3B). In addition, the

specific activity was determined as described for Fig. 1. The values are the means of at least three independent experiments performed in duplicate. Standard errors are shown with error bars.

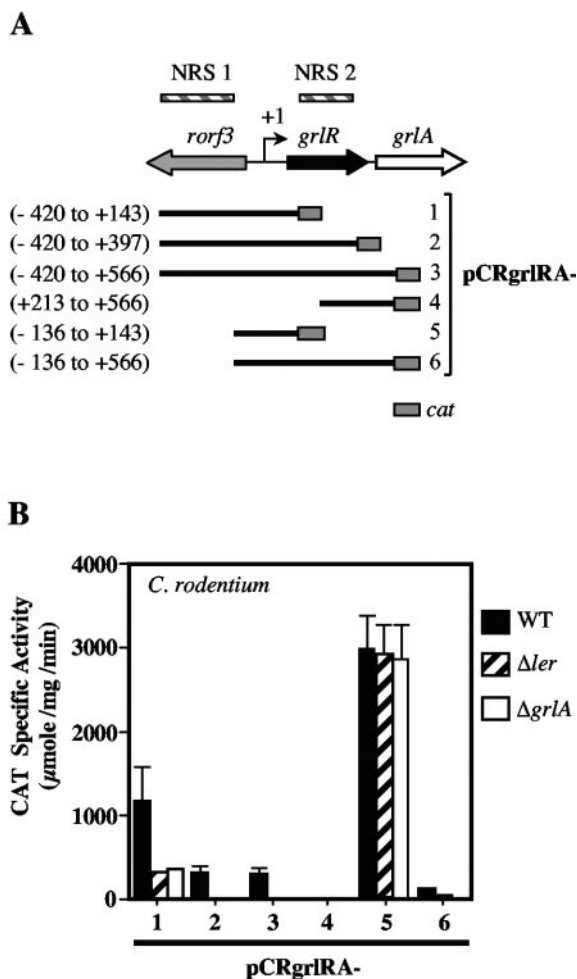


FIG. 3. Ler is required for *C. rodentium* *grlRA* expression. (A) Schematic representation of the *rorf3-grlRA* region. Hatched boxes indicate negative regulatory sequences (NRS) revealed by expression analysis of the *grlRA-cat* transcriptional fusions. The bent arrow indicates the transcriptional start site (+1) for *grlRA* determined in this study. Schematic representations of the *grlRA-cat* transcriptional fusions are shown below the diagram of the *rorf3-grlRA* region. The positions for the 5' and 3' ends of the *rorf3-grlRA* region contained in each fusion, with respect to the transcriptional start site of *grlRA*, are shown to the left of the fusions. The *grlRA-cat* fusions were named pCRgrlRA and numbered consecutively as shown at the right of the diagram. (B) Expression of the *grlRA-cat* fusions was monitored in *C. rodentium* DBS100 and its isogenic *ler* and *grlA* mutants. The CAT specific activity was determined as described for Fig. 1. The values are the means of at least three independent experiments performed in duplicate. Standard errors are shown with error bars.

expression of pCRgrlRA-5 was Ler and GrlA independent, as it was equally active in the wild-type and mutant strains (Fig. 3B). The presence of further upstream sequences in fusion pCRgrlRA-1 with respect to pCRgrlRA-5 decreased the expression of the *grlRA* promoter about 2.5-fold in the wild-type strain. In addition, the activity of this fusion was further decreased in the *ler* and *grlA* mutants, suggesting that the region from -420 to -136 with respect to the transcriptional start site (see below) contains a negative *cis*-acting element, which we named NRS1 (negative regulatory sequence 1), and a putative Ler binding region. The presence of further downstream elements in fusions pCRgrlRA-2 (down to the end of *grlR*) and

pCRgrlRA-3 (down to the 5' end of *grlA*) with respect to pCRgrlRA-1 (Fig. 3A) reduced their transcriptional activity about fourfold in the wild-type strain, but they were still Ler and GrlA dependent, as their expression was abolished in the mutant strains (Fig. 3B). Since the activities of pCRgrlRA-2 and pCRgrlRA-3 were very similar, these results suggested the presence of a second negative regulatory element (NRS2) between positions +143 and +397 with respect to the *grlR* transcriptional start site. In agreement with these observations, fusion pCRgrlRA-6, which contains the *rorf3-grlRA* intergenic region carried by pCRgrlRA-5 plus the NRS2 motif, was 36-fold less active in the wild-type strain than was pCRgrlRA-5 (Fig. 3B).

Taken together, this analysis demonstrated that *grlR* and *grlA* form an operon under the control of a promoter located upstream of *grlR*. In addition, it revealed that sequences flanking the *grlRA* operon promoter, named NRS1 and NRS2 in this study, are involved in its negative regulation as well as its Ler- and GrlA-dependent activation. In the absence of these elements, *grlRA* expression becomes constitutive, resembling the regulation of other Ler-dependent promoters (5, 24, 38).

To further support the role of Ler and GrlA in the regulation of the *grlRA* promoter in *C. rodentium* and to map the promoter, primer extension analysis was performed using total RNAs purified from the wild-type strain and the *ler* and *grlA* mutants. A predominant primer extension product was detected for the wild-type strain (Fig. 4A), revealing that the transcriptional start site of the *grlRA* promoter corresponds to the T residue located 102 bp upstream of the *grlR* start codon (Fig. 4B). Putative promoter sequences which show identity to the consensus -10 (five of six [TATAT]) and -35 (four of six [TTGAA]) sequences of sigma 70-dependent promoters were found upstream of the *grlRA* transcriptional start site (Fig. 4B). This promoter closely matches the promoter previously reported for EPEC orf10/*grlR* (31).

In contrast, a primer extension product was not detected in the *ler* mutant, in agreement with a previous report showing that the expression of the orf10 (*grlR*) transcript in EPEC was reduced in the absence of Ler (16). Similarly, *grlRA* transcription was reduced in the *grlA* mutant (Fig. 4A). To control the RNA load size and integrity, primer extension was performed in parallel to detect the expression of *ompA*, a constitutively expressed gene coding for an outer membrane protein (17). As shown in Fig. 4A, the *ompA* transcript was detected at similar levels in the wild-type strain and the *ler* and *grlA* mutants.

Ler directly regulates the expression of the *grlRA* operon. To further confirm the role of Ler on *grlRA* regulation, the expression of fusions pCRgrlRA-1, -3, and -6 was analyzed in the nonpermissive *E. coli* K-12 strain in the presence of a plasmid expressing Ler (pTCRLer4) or GrlA (pTCRGrIA1). The expression levels of these fusions were slightly above the background in the presence of only the vector or the plasmid expressing GrlA (Fig. 5A). In contrast, significant levels of expression were obtained in the presence of Ler (Fig. 5A). This pattern of expression resembles the regulation of the *LEE2-cat* control fusion (Fig. 5A), which is directly regulated by Ler (5).

Taken together, these results highlight the existence of a novel positive regulatory loop where GrlA and Ler reciprocally regulate each other to modulate the expression of LEE genes.

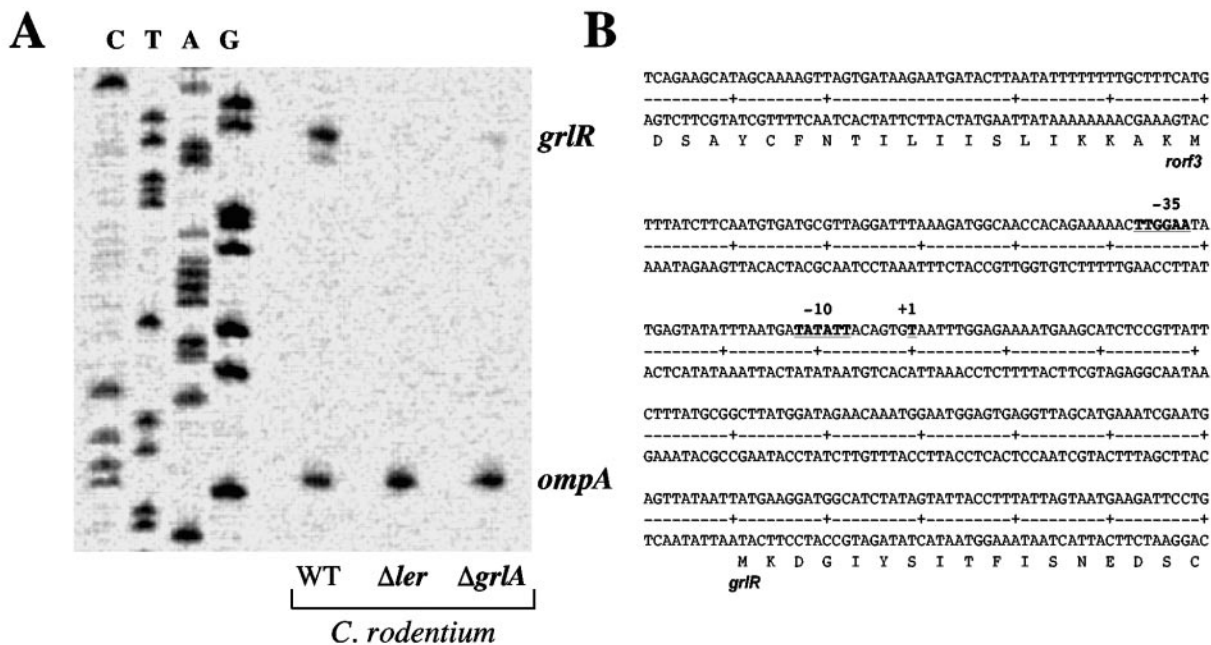


FIG. 4. Primer extension analysis of the *C. rodentium* *grlRA* promoter region. (A) Total RNAs were obtained from culture samples of *C. rodentium* wild-type (WT), Δ ler, and Δ grlA strains grown for 6 h in DMEM at 37°C without agitation in a 5% CO₂ atmosphere. Primer extension assays were performed with purified total RNA and a primer specific for the *grlR* structural gene or a primer specific for *ompA*, which was used as a control. (B) Sequence of the intergenic region between *rorf3* and *grlRA*. The transcriptional start site (+1) and the -10 and -35 promoter sequences for *grlRA* are shown with bold underlined letters.

H-NS is a negative regulator of *grlRA* expression. Previous reports indicated that Ler induces LEE gene expression by counteracting the repression exerted by H-NS on their promoters (5, 24, 46). The results described above indicated that *grlRA* is positively regulated by Ler and subjected to negative regulation resembling that of other Ler-regulated genes. In order to evaluate whether H-NS is involved in the negative regulation of *grlRA*, we measured the expression of the *grlRA-cat* fusions (Fig. 3A) in the *E. coli* K-12 strain and its isogenic *hns* mutant. Increased CAT activity was observed for all fusions in the *hns* mutant, except for pCRgrlRA-4 (which lacks the *grlRA* promoter), indicating that H-NS negatively regulates *grlRA* expression (Fig. 5B). However, the fact that the *grlRA-cat* fusions were expressed at different levels in the *hns* mutant suggested that, in addition to H-NS, other regulators could be involved in repressing *grlRA* expression. In this regard, compared to pCRgrlRA-1, the pCRgrlRA-2 and pCRgrlRA-3 fusions were between three- and sixfold less active in the *hns* mutant. This difference could be due to the presence of the *grlR* gene in these fusions, either because the structural sequence contains *cis*-acting negative regulatory motifs or because the expression of GrlR, which has been shown to act as a repressor of LEE gene expression (12, 26, 27), has a negative effect on the expression of its own promoter. However, further studies are needed to distinguish between these possibilities.

Fusion pCRgrlRA-5 was also expressed in *E. coli* K-12, further supporting the notion that it lacks negative *cis*-acting regulatory elements; however, its expression was further increased (approximately fivefold) in the *hns* mutant (Fig. 5B). This observation suggests that H-NS negatively controls *grlRA* expression by interacting with the *rorf3-grlRA* intergenic region

in the vicinity of the promoter between positions -136 and +143. The presence of Ler did not further increase the expression of the *grlRA-cat* fusions in the *E. coli hns* mutant (Fig. 5B), strongly suggesting that Ler induces *grlRA* expression by mainly counteracting the H-NS-mediated repression of this promoter.

Since different attempts to delete or interrupt the *C. rodentium hns* gene have so far been unsuccessful (despite our success in the generation of deletion mutants in *C. rodentium* [12]), the experiments described above were performed with *E. coli* strains. The *C. rodentium hns* gene, as provided by the Wellcome Trust Sanger Institute, codes for a protein sharing 96% identity with *E. coli* H-NS, with six amino acid changes located outside functional domains (data not shown). This high degree of conservation suggests that the two proteins are functionally equivalent. In order to confirm the role of H-NS in the transcriptional repression of the *grlRA* promoter in *C. rodentium*, we took advantage of the dominant-negative effect shown by *E. coli* H-NS mutants that are defective in the ability to repress transcription but not in the ability to interact with other H-NS monomers (45). Plasmids expressing *E. coli* H-NS and the H-NS R12C and G113D mutants under the control of an arabinose-inducible promoter (4, 5) were introduced into *C. rodentium* Δ ler carrying the fusion plasmid pCRgrlRA-1 to determine the CAT activity in the presence or absence of arabinose. The expression of the *grlRA* promoter in the Δ ler strain was further repressed when wild-type H-NS was induced in *C. rodentium* Δ ler. In contrast, when the R12C or G113D H-NS mutant was induced, a dominant-negative effect that allowed the expression of the *grlRA* promoter was observed

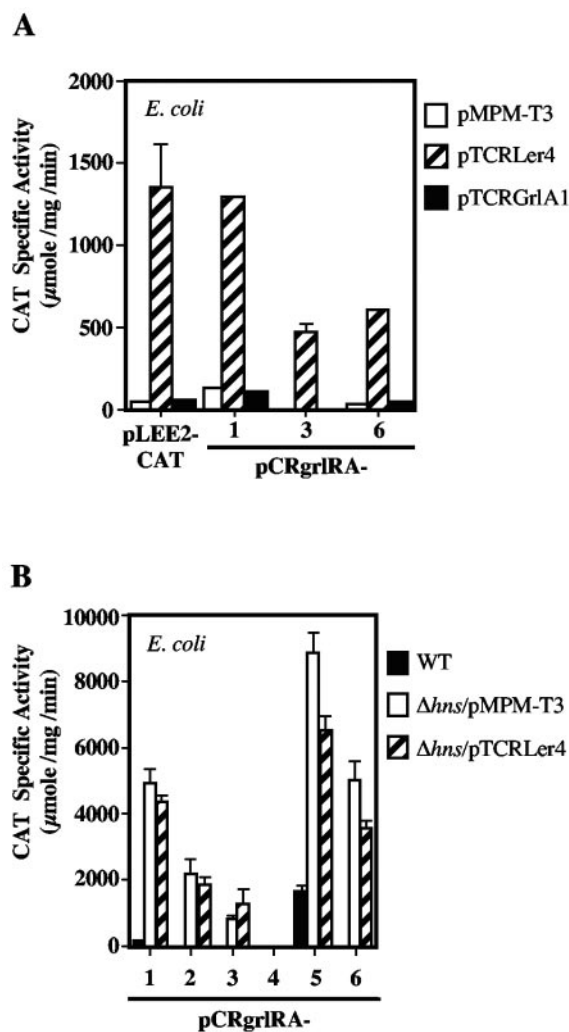


FIG. 5. Ler activates and H-NS represses the expression of *grlRA-cat* fusions in an *E. coli* K-12 strain. (A) The expression of representative *grlRA-cat* fusions was monitored in *E. coli* MC4100 containing plasmid pMPM-T3 (vector), pTCRLer4, or pTCRGrIA1. As a control, the expression of pLEE2-CAT was analyzed in the same strains. (B) H-NS mediates repression of *grlRA* expression. The expression of *grlRA-cat* fusions was monitored in *E. coli* MC4100 and its isogenic *hns* mutant containing plasmid pMPM-T3 (vector) or pTCRLer4 (*ler*). The CAT specific activity was determined as described for Fig. 1. The values are the means of at least three independent experiments performed in duplicate. Standard errors are shown with error bars.

(data not shown). These results are in agreement with those obtained using *E. coli* strains (Fig. 5B).

Ler and H-NS bind to different motifs in the *rorf3-grlRA* region. In order to identify the DNA binding sites of Ler and H-NS in the *grlRA* region, EMSAs with purified Ler-His₆ and H-NS-His₆ proteins and PCR products corresponding to the fragments contained in the *grlRA-cat* fusions were performed (Fig. 6A). These experiments demonstrated that Ler binds to DNA fragments corresponding to those present in pCRgrlRA-2, pCRgrlRA-3, and pCRgrlRA-6, starting at a concentration of 480 nM, whereas no binding was detected to pCRgrlRA-4 or -5 fragments, even at a concentration of 1.4 μM (Fig. 6B). The common region between pCRgrlRA-2, -3, and -6 which

is not present in pCRgrlRA-4 and -5 is located within the *grlR* structural sequence between positions +143 and +213 (Fig. 6A), indicating that this region contains sequences recognized by Ler.

Binding of Ler to the fragment contained in pCRgrlRA-1 at higher concentrations (Fig. 6B, bottom panel) revealed the presence of an additional lower-affinity binding site. In agreement with this observation, this fusion was still regulated by Ler (Fig. 3B and 5A). The lack of binding to the fragment contained in pCRgrlRA-5 at the same protein concentrations (Fig. 6B, bottom panel) suggested that this putative Ler binding site is located between positions -420 and -136, within the structural sequence of *rorf3*. Ler binding to fragment 3 generates at least two distinctive complexes (Fig. 6B), suggesting that the binding of Ler to the higher-affinity binding site precedes subsequent binding to the lower-affinity binding site. The expression analysis of *grlRA-cat* fusions described above suggested that both Ler binding sites could independently mediate *grlRA* induction, since the expression of *grlRA-cat* fusions containing only one of these binding sites (pCRgrlRA-1 or pCRgrlRA-6) was still Ler dependent (Fig. 3B and 5A). More defined deletions and site-directed mutagenesis will be required to further map the Ler binding sites involved in *grlRA* expression, since footprinting analysis has shown that Ler binds to extended regions, complicating the definition of primary binding sites (2, 24, 43; our unpublished results).

Using the same approach, we showed that H-NS binds to the fragments carried by fusions pCRgrlRA-3, -4, and -6, at concentrations ranging from 430 to 750 nM, but not to fragments contained in fusions pCRgrlRA-1, -2, and -5 or to a DNA fragment corresponding to the *ler* structural gene, which was used as a negative control for Ler and H-NS binding (Fig. 6C and data not shown). Fragments pCRgrlRA-3, -4, and -6 share a common region that is absent in pCRgrlRA-1, -2, and -5, localized between positions +397 and +566 spanning the last codons of *grlR* and the first codons of *grlA*, indicating that this region contains sequences recognized by H-NS. However, considering that fusions pCRgrlRA-2 and pCRgrlRA-3 have very similar regulatory patterns (Fig. 3B and 5B), it is likely that this binding site does not play a major role in the negative regulation of *grlRA* expression.

Since fusions pCRgrlRA-1 and pCRgrlRA-5 are still strongly regulated by H-NS (Fig. 5B), another EMSA was performed using higher concentrations of H-NS to explore the existence of lower-affinity binding sites in the vicinity of the *grlRA* promoter region. At concentrations between 1.6 and 2.3 μM, H-NS bound to the DNA fragments corresponding to pCRgrlRA-1 and -5, but not to the negative control (Fig. 6C, bottom panel), indicating that the sequence contained in pCRgrlRA-5 spanning positions -136 to +143 is bound by H-NS to repress *grlRA* expression.

DISCUSSION

Different studies have demonstrated that Ler is the primary positive regulator of virulence gene expression in A/E bacterial pathogens (12, 16, 31). Ler expression is finely regulated by a myriad of regulatory factors, as described in the introduction. In addition to all of the regulatory proteins shown thus far to be involved in *ler* regulation, it was recently shown that *ler* expression, and thus the expression of

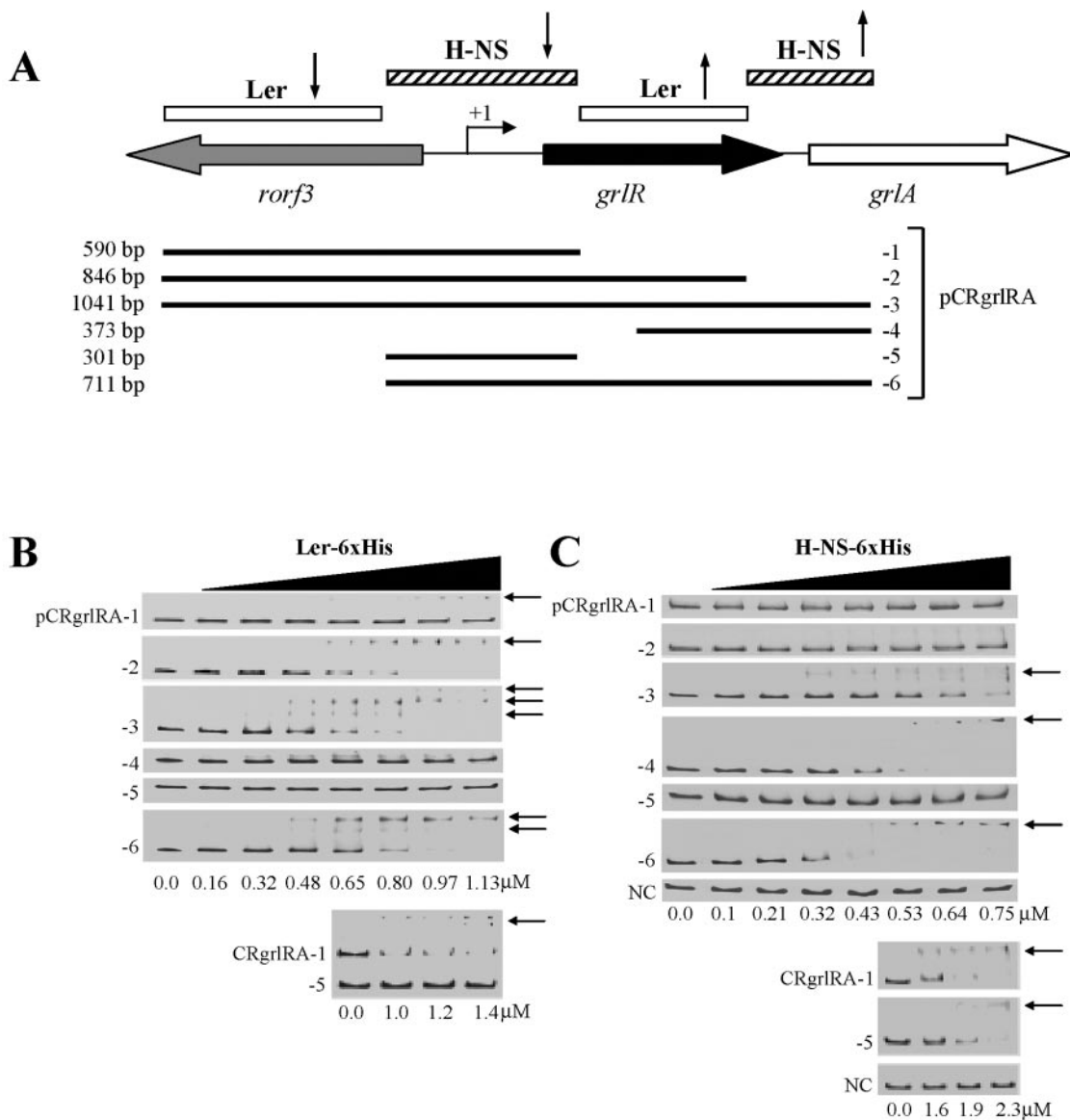


FIG. 6. Binding of Ler and H-NS to the *rorf3-grlRA* region. (A) Schematic representation of the *rorf3-grlRA* region. The bent arrow indicates the *grlRA* transcriptional start site determined in this study. The binding regions for H-NS and Ler revealed by EMSAs are represented by hatched and open boxes, respectively. The DNA fragments used in EMSAs are represented below the diagram of the *rorf3-grlRA* region. The sizes of the fragments are indicated to the left, and the corresponding fusion numbers are indicated to the right. Increasing concentrations of purified Ler-His₆ (B) or H-NS-His₆ (C) protein were incubated with the PCR-generated DNA fragments represented in panel A, resolved in 4% polyacrylamide gels, and stained with ethidium bromide. The fragments correspond to the pCRgrlRA transcriptional fusions, as indicated to the left of the gels. The EPEC *ler* structural gene was used as a negative control (NC) for the EMSAs. Arrows indicate DNA-protein complexes.

other LEE genes, requires the additional LEE-encoded regulator GrIA (12).

In the present study, we demonstrate that GrIA and Ler positively regulate each other's expression, forming a novel transcriptional positive regulatory loop. This notion is supported by the results showing that *ler* expression was severely reduced in a *C. rodentium* *grlA* mutant and restored by GrIA in the nonpermissive *E. coli* K-12 background (Fig. 2), while the expression of the *grlRA* operon was impaired in a *C. rodentium* *ler* mutant (Fig. 3 and 4) and restored in *E. coli* K-12 by Ler (Fig. 5A). The complementation experiments with *E. coli* K-12 clearly reproduced the reciprocal regulation between GrIA and

Ler observed in the experiments performed with *C. rodentium* mutants.

Our results also indicate that Ler positively regulates the expression of *grlRA* by counteracting, at least in part, the H-NS-mediated repression of its promoter (Fig. 5B). In this regard, we and other groups have shown that H-NS exerts a global repressing effect on EPEC LEE promoters and that Ler acts as an antirepressor counteracting this negative effect (5, 24, 46). For example, H-NS-mediated repression of the divergently transcribed *LEE2* and *LEE3* operons involves the binding of H-NS to silencer regulatory sequences 1 and 2 (SRS1 and -2) flanking the *LEE2* and *LEE3* promoters, which favors

the formation of a repressor nucleoprotein complex that is probably stabilized by H-NS–H-NS bridging interactions (4, 5). Specific binding of Ler to SRS1 destabilizes the repressor nucleoprotein complex and releases the expression of the *LEE2* and *LEE3* operons. The expression of both operons is constitutive and is no longer affected by Ler in the absence of any of the SRSs or of H-NS (4, 5). A similar model has been proposed for the regulation of the *LEE5* operon (24). However, overcoming transcriptional repression by H-NS is a common mechanism for inducing virulence gene expression in pathogenic bacteria and involves different families of transcriptional activators (reviewed in reference 14).

In agreement with their role in *grlRA* regulation, H-NS and Ler bind to nonoverlapping sites in the *rorf3-grlRA* region. DNA binding assays showed that a higher-affinity H-NS-binding site is located between the 3' end of *grlR* and the 5' end of *grlA* and a lower-affinity H-NS-binding site is located in the intergenic region between *rorf3* and *grlRA*. In contrast, for Ler a lower-affinity binding site is contained within the *rorf3* structural gene and a higher-affinity Ler binding site is located at the beginning of the *grlR* structural gene flanking the *grlRA* promoter (Fig. 6). The lower-affinity H-NS-binding site, but not the higher-affinity H-NS-binding site, seems to be the one involved in the repression of the *grlRA* promoter, as all the *grlRA-cat* fusions containing the *rorf3-grlRA* intergenic region were derepressed in the Δhns background (Fig. 5B). In contrast, both Ler binding sites could independently mediate *grlRA* induction by Ler, as fusions carrying one or the other were still regulated in a Ler-dependent manner (Fig. 3B and 5A). It is likely that the binding of Ler to sequences flanking the *grlRA* promoter region, where the H-NS-binding site resides, induces structural changes that may destabilize H-NS binding, thus releasing promoter expression. However, H-NS is not fully responsible for the negative regulation, since activation of the different pCR*grlRA* fusions showed different degrees of derepression in its absence (Fig. 5B). The fact that derepression was only partial in the presence of one or both NRS elements in the Δhns background suggests that an additional factor or mechanism which is not yet defined is required for a second level of repression. Thus, in contrast to the case for the *LEE2* and *LEE3* promoters, full strength Ler-independent expression of the *grlRA* promoter is only achieved in the absence of H-NS and both NRSs. Considering the putative role of GrlR as a repressor of LEE gene expression (12, 27), we cannot rule out the possibility that the presence of the *grlR* gene in some of the pCR*grlRA* fusions has a negative influence on its own expression. H-NS also represses the expression of *ler* in *E. coli* K-12, but in contrast to the *grlRA* and *LEE2-LEE3* promoters, the *ler* promoter does not become fully constitutive (e.g., GrlA independent) in the absence of H-NS or negative *cis*-acting regulatory elements.

It has been previously reported that H-NS represses *ler* expression at 27°C, but not at 37°C, as a mechanism controlling thermoregulation (46). Our observations confirm the role of H-NS in *ler* regulation, but they also show that H-NS can exert its negative effect even at 37°C in the absence of *ler*-specific activators. They also indicate that both H-NS and GrlA require sequences located in close proximity to the *ler* promoter to exert their functions.

The results reported here indicate that GrlA is required for

promoter activation, probably favoring productive interactions of the RNA polymerase with the *ler* promoter, as well as for counteracting H-NS repression. Similar double functions have been observed, for example, for the regulator ToxT in the expression of *ctx* and *tcp* (48). GrlA contains a putative helix-turn-helix motif potentially involved in DNA binding (12). Mutations of this domain at residues that are conserved in CaiF and the *Salmonella* GrlA homologue abolish GrlA's ability to activate *ler* expression (unpublished observations). However, despite all the evidence implicating GrlA in binding to DNA, we have not yet been able to detect GrlA binding to the *ler* promoter region by EMSAs using purified MBP-GrlA and GrlA-His₆ fusion proteins, which fully complement the *C. rodentium* *grlA* mutant strain (data not shown). The lack of binding in vitro may be the result of different situations, including the possibility that GrlA may become inactive upon purification or that it requires another factor for DNA binding. Correlating with the second possibility, it has been shown that CaiF, the only characterized homologue of GrlA, binds more efficiently to the intergenic *cai-fx* regulatory region when CRP is present (3) and also counteracts H-NS repression (15).

Furthermore, IHF has been shown to be essential for *ler* expression in EPEC (19) and for pCR*ler-cat* fusion expression in *E. coli* K-12 (unpublished results), making it a candidate for acting synergistically with GrlA to activate *ler* expression. However, our results suggest that IHF is not necessary for the GrlA-mediated activation of *ler*, since in the absence of the putative IHF binding site, as for pCR*ler-40*, GrlA was still able to activate *ler* expression (Fig. 2). Similarly, a transcriptional fusion of the EPEC *ler* regulatory region lacking the IHF binding sequence was still activated in a GrlA-dependent manner (unpublished results). It is worth noting that pCR*ler-80* rendered significant levels of GrlA-independent expression of the *ler* promoter in *C. rodentium* $\Delta grlA$ and *E. coli* K-12 (Fig. 1B and 2B). These observations suggest that upstream of position –80, there is a putative negative regulatory motif that negatively modulates *ler* repression. In support of this notion, it has been shown that Hha negatively regulates *ler* expression in EHEC and interacts with its regulatory region (40). These results also suggest that binding of IHF to its putative binding site, located between position –80 and the *ler* promoter, may generate architectural changes that partially counteract the negative regulation mediated by, for example, H-NS and/or facilitate RNA polymerase productive interactions with the *ler* promoter in the absence of GrlA.

It is not yet possible to determine whether Ler or GrlA is responsible for initiating the feedback regulatory loop. However, it is tempting to suggest that under inducing conditions, preexisting basal levels of Ler and/or GrlA adopt a transcriptionally proficient conformation that allows the reciprocal activation of the *grlRA* or *ler* promoter, respectively. Alternatively, or in parallel, the initial increase in *ler* or *grlRA* expression could be mediated by DNA structural changes that set the promoters to a more competent transcriptional state or by additional regulatory proteins in response to specific environmental cues. In this way, the active feedback loop will increase the cellular concentration of Ler, which then specifically counteracts the H-NS-mediated repression of several LEE and non-LEE promoters. To prevent the detrimental accumulation of Ler or of the proteins encoded by Ler-regu-

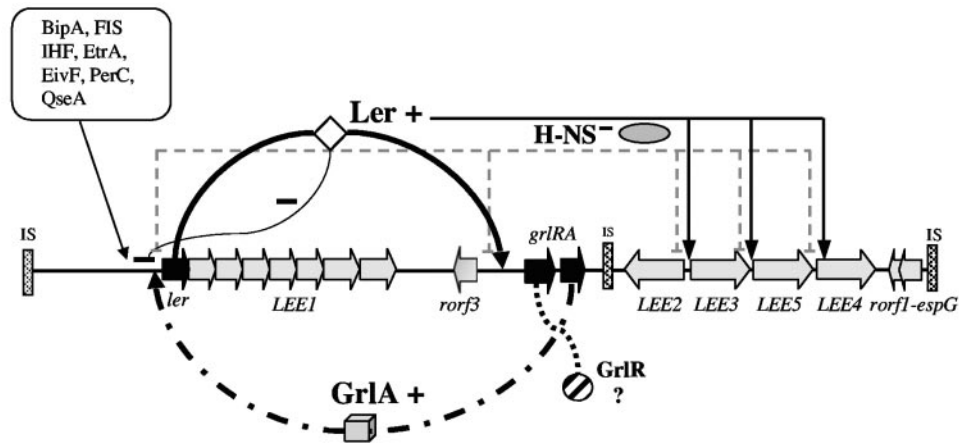


FIG. 7. Model for the regulation of LEE genes in A/E pathogens. Ler positively regulates LEE gene expression by counteracting the H-NS-mediated repression of LEE gene promoters. The expression of *ler* is tightly regulated by specific regulators, such as GrlA, GrlR, and PerC, as well as by global regulators, such as IHF, Fis, BipA, EtrA, EivF, and QseA. Appropriate levels of *ler* expression are maintained by a positive regulatory loop formed by Ler and GrlA, which could be negatively modulated by GrlR through a mechanism that is still not well understood or by the ability of Ler to negatively autoregulate its own expression (see the text).

lated genes in the cell, the Ler-GrlA feedback loop could be negatively modulated when Ler reaches the threshold concentration that represses *ler* transcription, as recently proposed (2). Alternatively, other elements could establish a checkpoint to prevent Ler overexpression. One candidate is GrlR, a protein encoded by the first gene of the *grlRA* operon that has shown to be involved in the negative regulation of *ler* expression and thus of Ler-regulated genes (12, 26, 27). Intriguingly, as shown here, *grlR* is cotranscribed with *grlA* in a Ler-dependent manner, suggesting that, while the feedback loop is active, GrlR may reach a concentration that down regulates the feedback loop to set it back to the steady-state level. We propose that the Ler-GrlA positive regulatory loop is functionally similar in all A/E pathogens, since the expression of LEE-encoded proteins is also abolished in EPEC and EHEC *grlA* mutants (unpublished results) and since *grlRA* (*orf10-11*) expression is abolished in *ler* mutants (16; unpublished results). In this way, the concentration of Ler required for the appropriate induction of the LEE genes in A/E pathogens would be maintained by the combined action of positive and negative regulatory loops. A model for the regulation of LEE genes, with emphasis on the positive and negative regulatory loops controlling the expression of Ler, is depicted in Fig. 7.

In summary, we identified a novel regulatory mechanism involving a reciprocal positive regulatory circuit integrated by the LEE-encoded positive regulatory proteins Ler and GrlA. Although the role of this regulatory loop during infection remains to be elucidated, it is probably required to maintain appropriate levels of different regulatory proteins to achieve a precise and optimal spatiotemporal response to the host environment. This would allow the successful colonization of the preferred niche and prevent the disproportionate production of virulence factors that could potentially jeopardize subsequent stages of the infectious process.

ACKNOWLEDGMENTS

We are particularly thankful to R. Oropeza and K. Carrillo for their support with H-NS and Ler purification, to J. A. Ibarra for help with early

primer extension experiments, to C. Lara and M. I. Villalba for their help with GrlA purification and binding assays, to J. M. Tellez for his advice, and to A. Vázquez and F. J. Santana for their excellent technical assistance. We also thank E. Calva for helpful discussions and continuous support.

J.B. is supported by a Ph.D. fellowship from CUNACyT. J.L.P. is funded by Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), and the Howard Hughes Medical Institute (HHMI). B.B.F. is supported by grants from Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the HHMI. J.L.P. and B.B.F. are HHMI International Research Scholars, and B.B.F. is a CIHR Distinguished Scientist and the Peter Wall Distinguished Professor.

REFERENCES

1. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1989. Current protocols in molecular biology. John Wiley and Sons, New York, N.Y.
2. Berdichevsky, T., D. Friedberg, C. Nadler, A. Rokney, A. Oppenheim, and I. Rosenshine. 2005. Ler is a negative autoregulator of the *LEE1* operon in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**:349–357.
3. Buchet, A., W. Nasser, K. Eichler, and M. A. Mandrand-Berthelot. 1999. Positive co-regulation of the *Escherichia coli* carnitine pathway *cai* and *fix* operons by CRP and the CafF activator. *Mol. Microbiol.* **34**:562–575.
4. Bustamante, V. H., J. A. Ibarra, K. Carrillo, A. Vazquez, and J. L. Puente. 2004. The locus of enterocyte effacement-encoded regulator (Ler) overcomes repression of type III secretion operons by modifying a nucleoprotein complex formed by H-NS. Presented at the 104th General Meeting of the American Society for Microbiology, New Orleans, La., 23 to 27 May 2004.
5. Bustamante, V. H., F. J. Santana, E. Calva, and J. L. Puente. 2001. Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol. Microbiol.* **39**:664–678.
6. Casadaban, M. J. 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* **104**:541–555.
7. Chen, H. D., and G. Frankel. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**:83–98.
8. Clarke, S. C., R. D. Haigh, P. P. Freestone, and P. H. Williams. 2003. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**:365–378.
9. Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:6640–6645.
10. Dean, P., M. Maresca, and B. Kenny. 2005. EPEC's weapons of mass subversion. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:28–34.
11. Deng, W., Y. Li, B. A. Vallance, and B. B. Finlay. 2001. Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*: sequence analysis and evidence for

- horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. *Infect. Immun.* **69**:6323–6335.
12. Deng, W., J. L. Puente, S. Gruenheid, Y. Li, B. A. Vallance, A. Vazquez, J. Barba, J. A. Ibarra, P. O'Donnell, P. Metanikov, K. Ashman, S. Lee, D. Goode, T. Pawson, and B. B. Finlay. 2004. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:3597–3602.
 13. Deng, W., B. A. Vallance, Y. Li, J. L. Puente, and B. B. Finlay. 2003. *Citrobacter rodentium* translocated intimin receptor (Tir) is an essential virulence factor needed for actin condensation, intestinal colonization and colonic hyperplasia in mice. *Mol. Microbiol.* **48**:95–115.
 14. Dorman, C. J. 2004. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:391–400.
 15. Eichler, K., A. Buchet, R. Lemke, H. P. Kleber, and M. A. Mandrand-Berthelot. 1996. Identification and characterization of the *cafF* gene encoding a potential transcriptional activator of carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**:1248–1257.
 16. Elliott, S. J., V. Sperandio, J. A. Giron, S. Shin, J. L. Mellies, L. Wainwright, S. W. Hutcheson, T. K. McDaniel, and J. B. Kaper. 2000. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **68**:6115–6126.
 17. Flores-Valdez, M. A., J. L. Puente, and E. Calva. 2003. Negative osmoregulation of the *Salmonella ompS1* porin gene independently of OmpR in an *hns* background. *J. Bacteriol.* **185**:6497–6506.
 18. Friden, P., K. Voelkel, R. Sternglanz, and M. Freundlich. 1984. Reduced expression of the isoleucine and valine enzymes in integration host factor mutants of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **172**:573–579.
 19. Friedberg, D., T. Umanski, Y. Fang, and I. Rosenshine. 1999. Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **34**:941–952.
 20. Garmendia, J., G. Frankel, and V. F. Crepin. 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect. Immun.* **73**:2573–2585.
 21. Goldberg, M. D., M. Johnson, J. C. Hinton, and P. H. Williams. 2001. Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **41**:549–559.
 22. Gottesman, M. E., and M. B. Yarmolinsky. 1968. Integration-negative mutants of bacteriophage lambda. *J. Mol. Biol.* **31**:487–505.
 23. Grant, A. J., M. Farris, P. Alefounder, P. H. Williams, M. J. Woodward, and C. D. O'Connor. 2003. Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Mol. Microbiol.* **48**:507–521.
 24. Haack, K. R., C. L. Robinson, K. J. Miller, J. W. Fowlkes, and J. L. Mellies. 2003. Interaction of Ler at the *LEE5* (*tir*) operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **71**:384–392.
 25. Iyoda, S., and H. Watanabe. 2004. Positive effects of multiple *pch* genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HEp-2 cells. *Microbiology* **150**:2357–2371.
 26. Iyoda, S., and H. Watanabe. 2005. ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**:4086–4094.
 27. Lio, J. C., and W. J. Syu. 2004. Identification of a negative regulator for the pathogenicity island of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biomed. Sci.* **11**:855–863.
 28. Luperchio, S. A., J. V. Newman, C. A. Dangler, M. D. Schrenzel, D. J. Brenner, A. G. Steigerwalt, and D. B. Schauer. 2000. *Citrobacter rodentium*, the causative agent of transmissible murine colonic hyperplasia, exhibits clonality: synonymy of *C. rodentium* and mouse-pathogenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **38**:4343–4350.
 29. Martinez-Laguna, Y., E. Calva, and J. L. Puente. 1999. Autoactivation and environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **33**:153–166.
 30. Mayer, M. P. 1995. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**:41–46.
 31. Mellies, J. L., S. J. Elliott, V. Sperandio, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 1999. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol. Microbiol.* **33**:296–306.
 32. Mellies, J. L., F. Navarro-Garcia, I. Okeke, J. Frederickson, J. P. Nataro, and J. B. Kaper. 2001. *espC* pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. *Infect. Immun.* **69**:315–324.
 33. Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:142–201.
 34. Pallen, M. J., S. A. Beatson, and C. M. Bailey. 2005. Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. *BMC Microbiol.* **5**:9.
 35. Porter, M. E., P. Mitchell, A. Free, D. G. Smith, and D. L. Gally. 2005. The *LEE1* promoters from both enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* can be activated by PerC-like proteins from either organism. *J. Bacteriol.* **187**:458–472.
 36. Porter, M. E., P. Mitchell, A. J. Roe, A. Free, D. G. Smith, and D. L. Gally. 2004. Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, PerA from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **54**:1117–1133.
 37. Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
 38. Sanchez-SanMartin, C., V. H. Bustamante, E. Calva, and J. L. Puente. 2001. Transcriptional regulation of the *orf19* gene and the *tir-cesT-ee* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:2823–2833.
 39. Schauer, D. B., and S. Falkow. 1993. Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect. Immun.* **61**:2486–2492.
 40. Sharma, V. K., and R. L. Zuerner. 2004. Role of *hha* and *ler* in transcriptional regulation of the *esp* operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* **186**:7290–7301.
 41. Shin, S., M. P. Castanie-Cornet, J. W. Foster, J. A. Crawford, C. Brinkley, and J. B. Kaper. 2001. An activator of glutamate decarboxylase genes regulates the expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator, Per. *Mol. Microbiol.* **41**:1133–1150.
 42. Sircii, M. P., M. Walters, L. R. Trabulsi, and V. Sperandio. 2004. Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. *Infect. Immun.* **72**:2329–2337.
 43. Sperandio, V., J. L. Mellies, R. M. Delahay, G. Frankel, J. A. Crawford, W. Nguyen, and J. B. Kaper. 2000. Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) *LEE2* and *LEE3* operons by Ler. *Mol. Microbiol.* **38**:781–793.
 44. Tatsuno, I., K. Nagano, K. Taguchi, L. Rong, H. Mori, and C. Sasakawa. 2003. Increased adherence to Caco-2 cells caused by disruption of the *yhiE* and *yhiF* genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **71**:2598–2606.
 45. Ueguchi, C., T. Suzuki, T. Yoshida, K. Tanaka, and T. Mizuno. 1996. Systematic mutational analysis revealing the functional domain organization of *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J. Mol. Biol.* **263**:149–162.
 46. Umanski, T., I. Rosenshine, and D. Friedberg. 2002. Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**:2735–2744.
 47. Wiles, S., S. Clare, J. Harker, A. Huett, D. Young, G. Dougan, and G. Frankel. 2004. Organ specificity, colonization and clearance dynamics *in vivo* following oral challenges with the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. *Cell. Microbiol.* **6**:963–972.
 48. Yu, R. R., and V. J. DiRita. 2002. Regulation of gene expression in *Vibrio cholerae* by ToxT involves both antirepression and RNA polymerase stimulation. *Mol. Microbiol.* **43**:119–134.
 49. Zhang, L., R. R. Chaudhuri, C. Constantinidou, J. L. Hobman, M. D. Patel, A. C. Jones, D. Sarti, A. J. Roe, I. Vlisidou, R. K. Shaw, F. Falciani, M. P. Stevens, D. L. Gally, S. Knutton, G. Frankel, C. W. Penn, and M. J. Pallen. 2004. Regulators encoded in the *Escherichia coli* type III secretion system 2 gene cluster influence expression of genes within the locus for enterocyte effacement in enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Infect. Immun.* **72**:7282–7293.

La región no traducida de *ler* interviene en su regulación

Al evaluar la expresión de las fusiones pCR_{ler}-200, -80 y -40 en *E. coli* K-12 mutante en *hns* conteniendo a GrlA en *trans*, observamos que para todas las fusiones había un incremento de la expresión de al menos 2 veces, en comparación con la expresión obtenida en la Δhns que contiene sólo el vector (Fig. 2C. Barba *et al.* 2005) (5). Lo anterior nos sugirió que GrlA pudiera, al menos en parte, contender con la represión mediada por H-NS (5). Sin embargo, el hecho de que aun en ausencia de H-NS la presencia de GrlA permitiera un incremento en la expresión de *ler*, sugirió que ésta tiene una participación directa en su activación. Aunque el mecanismo no ha sido definido, es posible que GrlA optimice la unión de la RNA polimerasa sobre el promotor de *ler* o contrarreste la represión mediada por otro represor, además de H-NS.

Con base en los resultados mostrados previamente, y con el propósito de definir con más detalle las regiones de acción para GrlA y H-NS, se construyeron nuevas fusiones de la región reguladora de *ler* al gen reportero *cat*. La diferencia de estas fusiones (pCR_{ler}-200/+10, +40, +80, +120, +160 y +216), con respecto a las anteriores, es que contienen fragmentos de la región reguladora de *ler* de diferente tamaño, con un extremo 5' común correspondiente a la posición -200, y recortes a partir del extremo 3' (posición +216), que era común para la serie de fusiones anteriores. Estas nuevas fusiones eliminan sistemáticamente porciones de la región no traducida (UTR, "UnTranslated Region") y codificante de *ler* (Fig. 4A).

Al analizar la expresión de estas fusiones en la cepa silvestre de *C. rodentium*, se observó que para la mayoría de ellas, con excepción de pCR_{ler}-200/+10 y +40, la actividad de CAT aumentaba al eliminar la región 3' de la UTR. Esto último indicaba que algún elemento contenido en la UTR de *ler* regula negativamente su expresión y que el incremento de 2 veces de la fusión pCR_{ler}-200/+80, en comparación con la expresión reportada por pCR_{ler}-200/+40, podía deberse a la existencia de secuencias que favorecen la interacción de un regulador positivo, probablemente GrlA (Fig. 4B). Así mismo, al evaluar la expresión de estas mismas fusiones en la cepa de *C. rodentium* $\Delta grlA$, se encontró que la actividad de la fusión pCR_{ler}-200/+10 se reducía sólo un 30%, mientras

que con las fusiones restantes se observaba una disminución de al menos 2 veces (pCR_{ler}-200/+40 a +216). Por otra parte, las actividades de CAT reportadas por las fusiones pCR_{ler}-200/+10, +40, +80 y +120 en el fondo de *C. rodentium* Δ *ler* no están afectadas por la ausencia de Ler, en contraste a la actividad reportada por las fusiones pCR_{ler}-200/+160 y +216, para las que se observó una disminución de 2 y 7 veces, respectivamente (Fig. 4B). Los datos anteriores indican que el probable sitio de interacción para GrlA está comprendido entre las posiciones -40 y +40. Adicionalmente, la observación de que la actividad de las fusiones pCR_{ler}-200/+10 a +120 es independiente de Ler, sugiere que, en ausencia de los elementos de regulación negativa encontrados en la UTR, los niveles basales de GrlA (cuya expresión es regulada por Ler a través del circuito de regulación positiva Ler-GrlA. (5)), son suficientes para activar a *ler*. En otras palabras, GrlA es importante para potenciar la actividad del promotor de *ler*, en parte contrarrestando el efecto negativo que tiene en la expresión de si mismo, el elemento regulador localizado en el UTR.

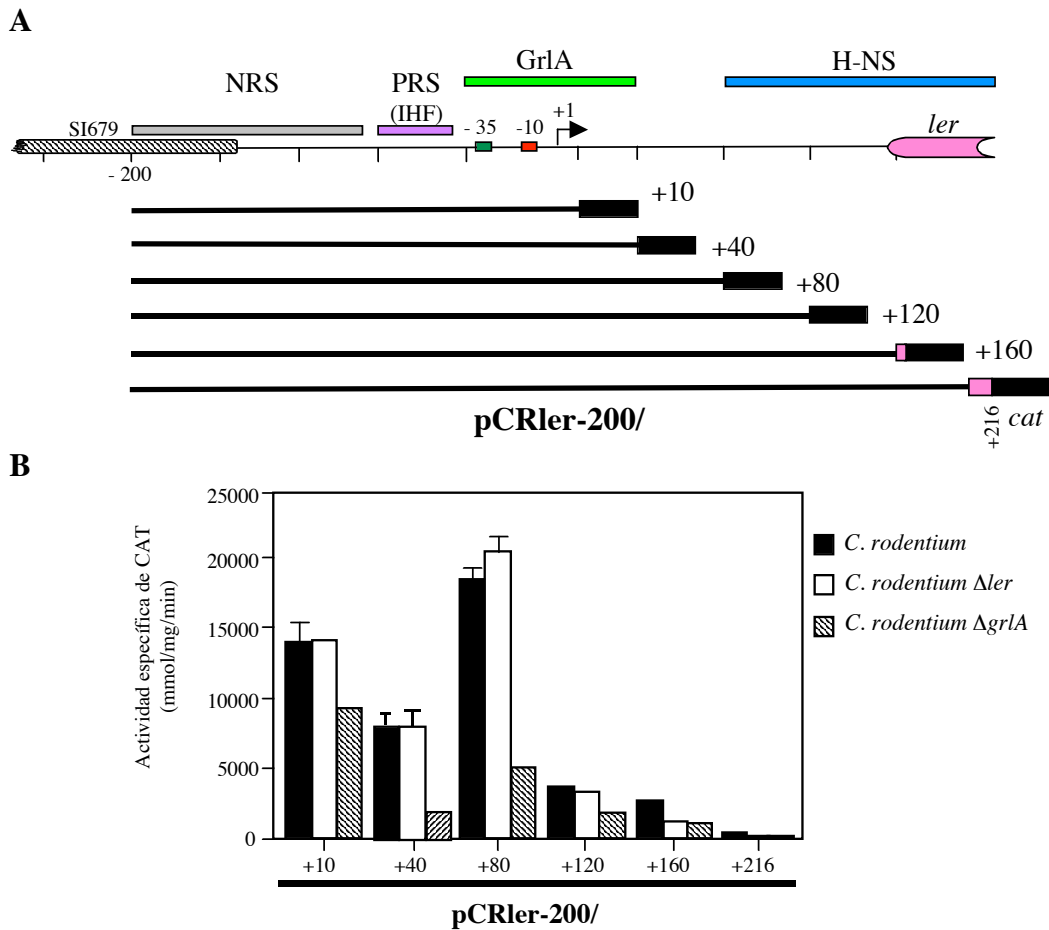


Fig. 4. Elementos de regulación en *cis* que controlan la expresión de *ler* de *C. rodentium*. A) Esquema de las fusiones que comprenden la región no traducida de *ler* y diagrama de la región reguladora de *ler* de *C. rodentium*. La flecha doblada indica el inicio de transcripción previamente reportado (+1) (17). Los rectángulos verde y rojo representan las cajas -35 y -10 del promotor, respectivamente. La caja con diagonales indica el elemento de inserción 679 (SI679) que se localiza en el extremo 5' del LEE de *C. rodentium* (16). Los pequeños rectángulos, gris y morado, señalan las posiciones aproximadas de las secuencias de regulación negativa y positiva (NRS y PRS), respectivamente (5). La PRS contiene un presunto sitio de unión para IHF de acuerdo a lo reportado para el gen *ler* de EPEC (26). Los rectángulos, verde y azul, señalan la región en donde aparentemente actúan Gr1A y H-NS, respectivamente, (este trabajo). Debajo del diagrama de la región reguladora de *ler*, se muestra un esquema de las fusiones transcripcionales recortadas hacia el extremo 3', dichas fusiones fueron nombradas como pCRler-200/+ y numeradas de acuerdo a la posición de su extremo 3' con respecto al inicio de la transcripción de *ler*. B) Gr1A es requerida para la expresión de *ler* aún en ausencia de la UTR (+1 a +160). La expresión de fusiones pCRler-200/+ fue evaluada en *C. rodentium*, *C. rodentium* Δ ler y *C. rodentium* Δ gr1A. La actividad específica de CAT fue determinada de muestras tomadas de cultivos bacterianos crecidos durante 6 h en DMEM a 37°C sin agitación en una atmósfera de CO₂ (5%). Los resultados son el promedio de cuatro experimentos independientes e incluyen la desviación estándar.

GrlA estimula la expresión de *ler* aún en ausencia de H-NS

Un mapeo adicional de la región donde GrlA ejerce su efecto para regular a *ler*, se llevó a cabo mediante el análisis de las fusiones CR*ler-cat* recortadas en el extremo 3' en el fondo genético de *E. coli* K-12 conteniendo, o no, el plásmido pTCRGrlA1 el cual codifica para GrlA. Este experimento mostró que en presencia de GrlA la actividad de las fusiones pCR*ler*-200/+10, +40, +80 y +120 se incrementa en un promedio de 3 veces, mientras que para las fusiones pCR*ler*-200/+160 y +216 el aumento es superior a 45 veces (Fig. 5). Por otra parte, al proveer a GrlA en una mutante en *hns*, observamos un aumento aproximado de 1.5 veces para las fusiones de pCR*ler*-200/+10, +40, +80 y +120, y de alrededor de 4.5 veces para las fusiones pCR*ler*-200/+160 y +216, en comparación a la expresión obtenida en la mutante *hns* que contiene sólo al vector (Fig. 5). Curiosamente, las actividades reportadas por las fusiones pCR*ler*-200/+10, +40, +80 y +120 en *E. coli* K-12 y en su mutante isogénica en *hns* expresando a GrlA en *trans* son muy similares, y la diferencia de expresión de pCR*ler*-200/+160 y +216 entre estos dos fondos que contienen a GrlA, es sólo de 1 vez (Fig. 5). Estos datos apoyan la idea de que GrlA permite la expresión de *ler* conteniendo, en parte, con la represión mediada por H-NS y otros elementos ubicados en la UTR, sin descartar que ésta esté potenciando la actividad del promotor por un mecanismo aún no definido. Así mismo, confirman que GrlA ejerce su acción reguladora positiva en *ler* interactuando con una secuencia localizada entre las posiciones -40 y +40.

El experimento anterior, también mostró que las fusiones pCR*ler*-200/+10 a +120 generaban niveles significativos de actividad no dependientes de GrlA en *E. coli* K-12, en contraste, la actividad de la fusión pCR*ler*-200/+160 fue mínima y la de la fusión pCR*ler*-200/+216 fue nula en el mismo fondo genético (Fig. 5). Por otro lado, en la mutante en *hns* (*E. coli* Δhns) la expresión aumentó alrededor de una vez para las fusiones pCR*ler*-200/+80 y +120, y más de 10 veces para las fusiones de pCR*ler*-200/+160 y +216. Estos datos sugerían que H-NS podría tener como principal zona de contacto la secuencia localizada entre las posiciones +80 y +160 para reprimir la expresión de *ler*.

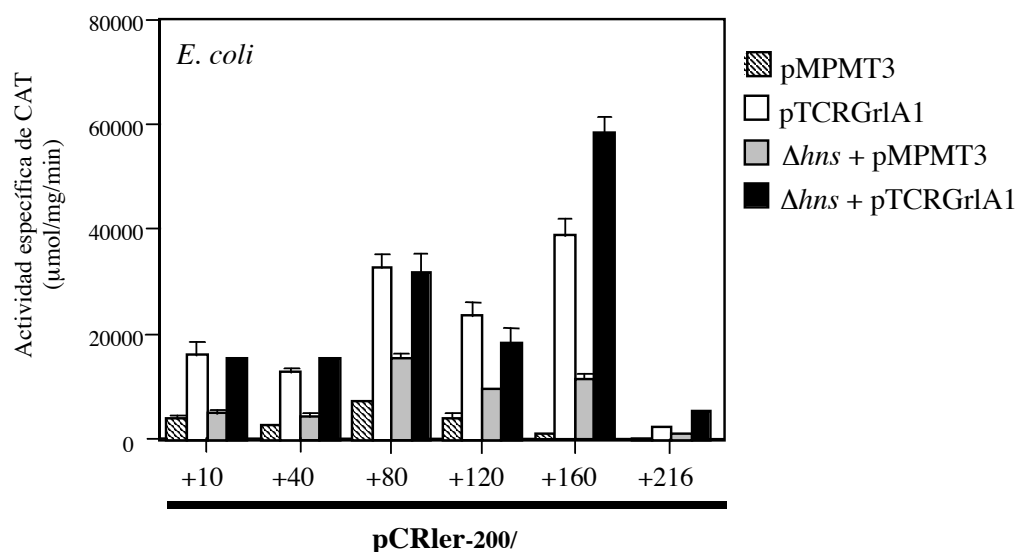


Tabla 3. GrIA estimula la expresión de ler aún en ausencia de H-NS

Fusión pCRler-200/	MC4100 + pMPMT3	DE	MC4100 + pTCRGrIA1	DE	MC Δhns + pMPMT3	DE	MC Δhns + pTCRGrIA1	DE
+10	3968.18	1407.09	16132.52	2399.59	4898.43	1164.72	15409.0	300.16
+40	2521.09	914.38	12587.69	1196.6	4258.45	1033.7	15285.96	749.33
+80	7188.13	945.17	32569.8	1477.0	15198.86	1365.3	31531.44	5200.48
+120	3875.2	1224.32	23534.16	2628.93	9319.58	221.45	18427.24	2057.08
+160	792.66	194.94	38648.66	4049.13	11223.03	1281.29	58118.05	5017.03
+216	27.15	2.7	2133.11	230.4	920.33	198.42	5231.98	272.12

Fig. 5. GrIA estimula la expresión de ler aún en ausencia de H-NS. La expresión de todas las fusiones pCRler-200/+ fueron evaluadas en *E. coli* K-12 (MC4100) o *E. coli* Δhns (MC4100 Δhns) conteniendo el vector pMPM-T3 o su derivado pTCRGrIA-1. La actividad específica de CAT fue determinada como se describe en la Fig. 4. La gráfica muestra el promedio y la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. En la tabla 3 se muestran los valores netos de los promedios de la actividad específica de CAT que se obtuvieron con las diferentes fusiones transformadas en las cepas indicadas en la gráfica. Al lado de cada valor de actividad se muestra la desviación estándar (DE) obtenida.

Estos datos, junto con la marcada diferencia en la actividad observada entre las fusiones pCRler-200/+160 y +216, plantearon la posibilidad de que existan dos zonas de regulación negativa, la dependiente de H-NS alrededor de las posiciones +80 a +160, y la dependiente de la secuencia localizada entre las posiciones +160 a +216 (ver discusión).

GrlA promueve de manera específica la transcripción de *ler in vitro*

Una vez definida la importancia de GrlA en la activación de *ler*, el siguiente objetivo fue definir el mecanismo por el cual éste se lleva a cabo. Los antecedentes de este trabajo reportados por Deng y col. (17), indicaron que GrlA es miembro de una nueva familia de reguladores constituida a la fecha por tres proteínas, de la cuales el homólogo más cercano a GrlA es un presunto regulador transcripcional de *Salmonella enterica*, con el cual comparte 37% de identidad. El otro homólogo es CaiF, un regulador transcripcional de los genes encargados del metabolismo de carnitina en *E. coli* K-12 (20), con el cual exhibe 23% de identidad (17). Con el ánimo de establecer si GrlA presenta secuencias que pudieran dar un mejor indicio de su actividad, se hizo una búsqueda de motivos conservados, identificándose *in silico* (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_hth.html) un probable motivo de unión a DNA del tipo hélice-vuelta-hélice (HTH) (Fig. 6) (17).

```

                                     *
SGH      MCPDNTHAKKQYLTPGNDIHYPGQTNHDACFIPVSVRQYA
CaiF     MCEG-----YV
GrlA     M-----ESKNSDYVIPDSVKNYN

          *+ * + *+ *+ *+
SGH      GEPLYIIVAHWCLLQONWVQRNOIAEAFFEITTARRASYLIA
CaiF     EKPLYLLIAEWMAENRWVIAREISIEFCIEHSKAVNTLT
GrlA     GEPLYILVSLWCKLQEKWISRNDIAEAFFSNLRRASFIIT
                                     Helix-turn-helix motif

          *+ + + + + + +
SGH      YLRSKTSRVVVICRHQTLPN-KARRYEYIY-VIRVLDSPTP
CaiF     YILSEVTEISCEVKMIP-NKLEGRGCQCQRLVKVVDIDEQ
GrlA     YISRRKEKISFRVRYVSYGNLHYKRLEIF-IYVNVLEAAP

          + + *+ *+ +
SGH      STRREKAGPP-----LVSKRRVGNDRSM--ANELWNRLC
CaiF     IYARLRNNSREKLVGVRKTPRIPAVPLTELNREQKWQMM-
GrlA     TESHVSTGPK-----RKTLRVGNIGV---QSSIWNEM-

          *+ *+ +
SGH      SNRNAGKILKKKEDEDDGT (170 aa)
CaiF     ----LSKSMRR (131 aa)
GrlA     -----IMRRKKE----S (135 aa)

```

Fig. 6. GrlA posee un probable HTH. GrlA de *C. rodentium* muestra homología con el regulador transcripcional de los genes encargados del metabolismo de carnitina CaiF (9, 20) (23% de identidad) (17) y un presunto regulador transcripcional, no caracterizado, de *Salmonella enterica* (37% de identidad), localizado río abajo del operón fimbrial *std*. El homólogo de *Salmonella* es indicado como SGH (“*Salmonella* GrlA Homologue”). El motivo de unión a DNA del tipo HTH, identificado *in silico*, se encuentra subrayado y resaltado con letras rojas (17). Los rectángulos verdes señalan los residuos que se cambiaron para obtener versiones mutantes en el presunto HTH (ver más adelante). Dichos cambios se basaron en la conservación de tales aminoácidos entre GrlA y sus homólogos (este estudio). Los aminoácidos idénticos están indicados con * y los conservados con +.

Para determinar si GrlA se une directamente al DNA, como lo sugiere la predicción de un motivo HTH en su secuencia, se creó una proteína de fusión entre GrlA y la proteína de unión a maltosa (MBP), para posteriormente purificarla por cromatografía de afinidad a amilosa (Fig. 7). Una vez que se obtuvo la proteína de fusión MBP-CRGr1A, se hicieron ensayos de interacción de ésta con dos fragmentos de la región reguladora de *ler*, en donde el primero de ellos comprendía de las posiciones -200 a +216 y el segundo de -40 a +216. Sin embargo, y pese a que se evaluaron un gran número de condiciones de reacción (incluyendo diferentes amortiguadores, temperaturas, etc.), no pudimos observar interacción de MBP-CRGr1A con la región reguladora de *ler* (datos no mostrados), no obstante que dicha fusión es capaz de complementar la mutante de *C. rodentium* en *grlA* (Fig. 9C, carril 3) (5). Estos resultados sugirieron que GrlA podría necesitar de otra proteína reguladora para interactuar con el DNA o que la etiqueta de MBP no favorece la unión de GrlA al DNA *in vitro*.

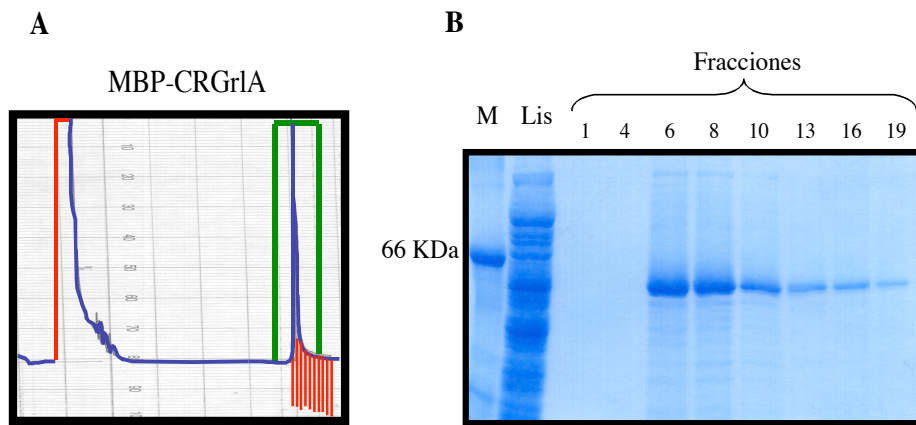


Fig. 7. Purificación de MBP-GrlA. A) Cromatograma que imprime el cromatógrafo ÄKTA prime system (Amersham Pharmacia Biotech) una vez que se ha completado la purificación de la proteína MBP-CRGr1A. La línea azul indica el paso del buffer de columna, la línea roja a la izquierda de la gráfica indica el momento en que se inyectó la muestra, las líneas verdes de la derecha indican el paso de la maltosa y las delgadas líneas rojas de la derecha, ubicadas en la parte inferior de la gráfica, representan las fracciones colectadas B) Análisis de las distintas fracciones colectadas en la purificación de la proteína de fusión MBP-CRGr1A. Las fracciones fueron resueltas en un gel de poliacrilamida al 12%, bajo condiciones desnaturalizantes. A la izquierda se muestra el marcador de peso molecular (M) y arriba se indica el número de la fracción. Lis, lisado de la cepa *E. coli* BL21/pLys donde se sobreexpresó la proteína de fusión.

Para definir si GrlA puede actuar como activador de la expresión de *ler*, se realizaron experimentos de transcripción *in vitro* (tipo “run off”) con un fragmento de DNA que comprendía de las posiciones -40 a +216 de la región reguladora de *ler*, en presencia de concentraciones crecientes de MBP-CRGrIA purificada (de 0.0 a 2.83 nM) y una concentración fija de RNA polimerasa. En la figura 8 podemos observar que la intensidad de un transcrito de 320 bases, correspondiente al transcrito de *ler* esperado (carril 2-6), aumentó conforme se incrementó la concentración de MBP-CRGrIA. En contraste, la señal del transcrito generado a partir del promotor *lacUV5*, cuya expresión es independiente de GrlA, no se modificó en presencia de la concentración más alta de MBP-CRGrIA (2.83 nM) (carriles 7 y 8). Estos resultados sugieren que GrlA promueve la transcripción de *ler* de una manera específica, por un mecanismo aún incierto.

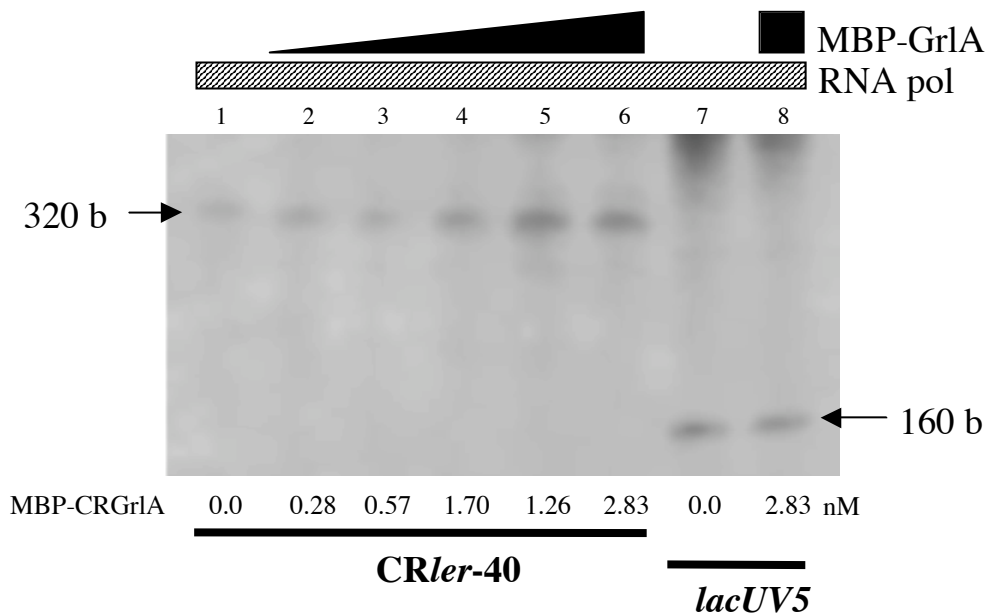


Fig. 8. GrlA incrementa los niveles de transcripción de *ler* *in vitro*. Experimento de transcripción *in vitro* tipo “run off”. Para estos experimentos se utilizaron fragmentos de PCR que contienen los promotores de *ler* (CRler-40) y *lacUV5* (lacUV5-corto). La figura muestra el incremento de un transcrito de 320 b, correspondiente al transcrito del *ler*, éste fue ubicado con la ayuda de una escalera de RNA (no mostrada). A la derecha se observa el transcrito de 160 b correspondiente a *lacUV5*, el cual se utilizó como control. Para ambos experimentos se utilizaron 0.066 U de la holoenzima RNA polimerasa. En la parte inferior de la figura se muestran las concentraciones de MBP-CRGrIA que se utilizaron en el experimento. Los transcritos fueron resueltos en geles de poliacrilamida para secuencia (8%).

Residuos conservados en el dominio HTH de GrlA son indispensables para su actividad

Con el objetivo de definir la importancia del dominio HTH predicho en GrlA, para la activación de *ler*, se hicieron mutaciones puntuales en residuos que están conservados entre GrlA y sus otras dos proteínas homólogas (Fig. 6).

Las construcciones mutantes derivadas a partir de la construcción pTCRGrlA-1 (-I42G, -F46A, -I48G y -R52G) fueron evaluadas por su capacidad de activar la expresión de la fusión pCRler-200 en un fondo genético que no permite de manera natural la expresión de *ler* (*E. coli* K-12). Como se observa en la figura 9A, sólo la construcción que provee a GrlA silvestre (pTCRGrlA-1) fue capaz de activar la expresión de *ler*, en comparación con aquellas que contienen las diferentes versiones mutantes de GrlA. De acuerdo con lo anterior, al evaluar la capacidad de las mutantes de GrlA para complementar la expresión de Tir en la cepa *C. rodentium* Δ *grlA*, se observó que sólo la versión silvestre de GrlA la restablece (carril 3 y 4), y no así las versiones mutantes (con y sin inducción) evaluadas en el ensayo (Fig. 9B). Estas construcciones también se fusionaron a la proteína MBP, generando las construcciones pMBPCRGrlA-I42G, -F46A, -I48G y -R52G. Dichas construcciones permitieron evaluar los niveles de expresión de las mutantes, en comparación con la fusión MBP-GrlA silvestre mediante su inmunodetección por “western blot”, utilizando un anticuerpo que reconoce a MBP. Este ensayo reveló que la síntesis de las proteínas mutantes MBP-CRGrlA-I42G y -F46A es poco eficiente ya que no se detectan, mientras que la mutante MBP-CRGrlA-I48G se detectó en menor cantidad que la mutante MBP-CRGrlA-R52G, la cual se expresa en niveles similares a los de la silvestre (Fig. 9C). Lo anterior nos permitió concluir que la incapacidad de las mutantes -I42G y -F46A de promover la expresión de *ler*, y por tanto de Tir, se debía a un defecto en la producción y/o estabilidad de las mismas o a un defecto funcional ocasionado por la mutaciones que portan. Para el caso de la mutante -I48G, donde el defecto en síntesis o estabilidad es parcial, y principalmente para la mutante -R52G, las mutaciones parecen inactivar funcionalmente a la proteína, ya que a pesar de estar presentes en la célula, no fueron capaces de activar a *ler*.

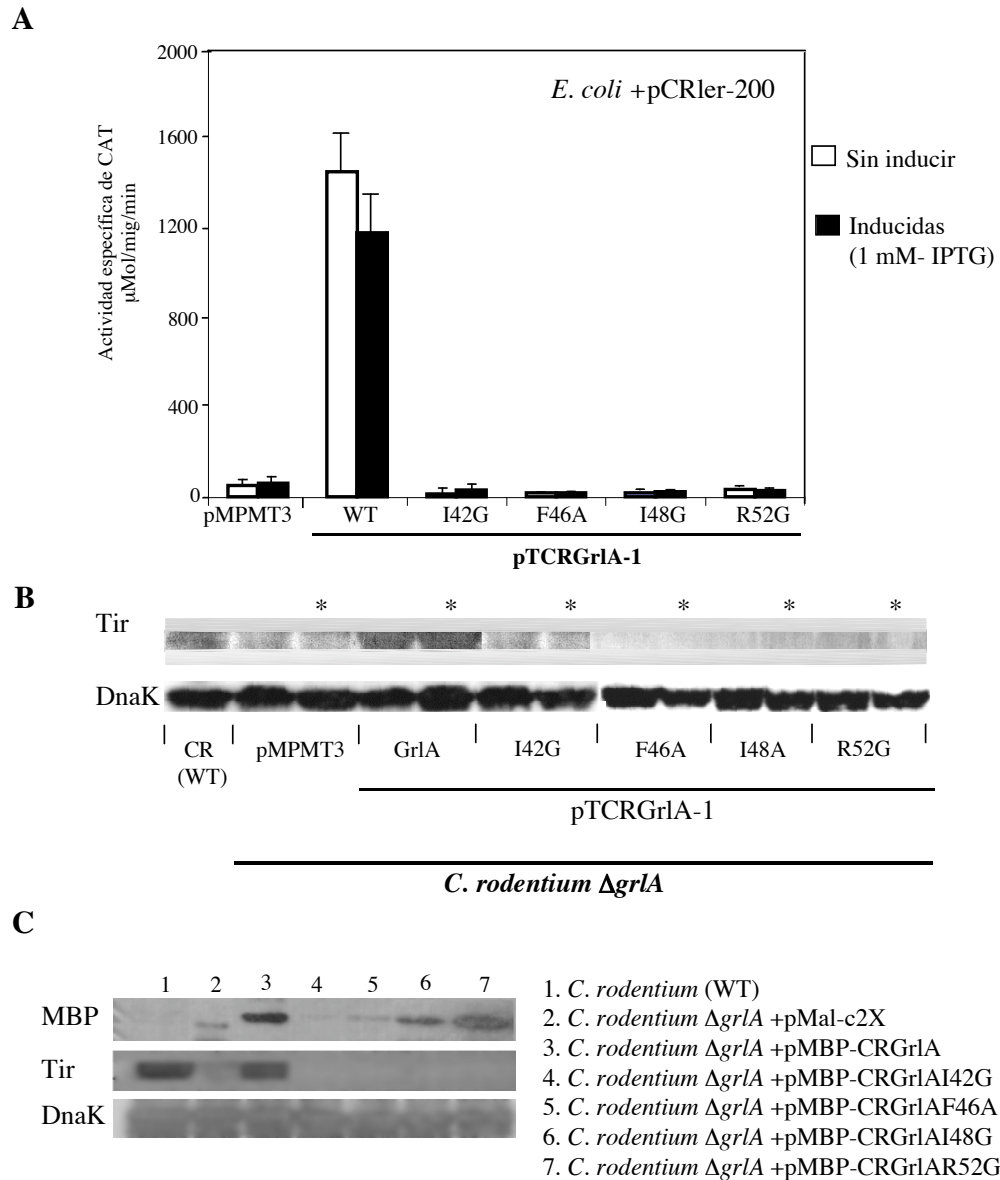


Fig. 9. Mutantes sitio específicas en el dominio HTH de GrIA afectan su función. A) Expresión de la fusión pCRler-200 en el fondo de *E. coli* K-12 (MC4100) conteniendo el vector pMPM-T3 o sus derivados pTCRGrIA-1, pTCRGrIA-1-I42G, -F46A, -I48G y -R52G; inducidas o no inducidas con 1mM de IPTG. La actividad específica de CAT fue determinada como se describe en la Fig. 4. La gráfica muestra el promedio y desviación estándar de cuatro experimentos independientes. B) Complementación de *C. rodentium* ΔgrlA con el vector pMPM-T3 o sus derivados pTCRGrIA-1, pTCRGrIA-1-I42G, -F46A, -I48G y -R52G. No inducidas o inducidas (*) con 1mM de IPTG. C) Complementación de *C. rodentium* ΔgrlA con el vector pMal-c2X o sus derivados pMBP-CRGrIA, pMBP-CRGrIA-I42G, -F46A, -I48G y -R52G. Para los experimentos de inmunodetección se visualizaron Tir y MBP-GrIA con los anticuerpos α-Tir (policlonal) y α-MBP (monoclonal, New England Biolabs). Como control de carga se detectó la proteína DnaK con α-DnaK (monoclonal, New England Biolabs).

Regulación transcripcional de *ler* en EPEC

Dadas las diferencias existentes entre las regiones 5' reguladoras entre EPEC y *C. rodentium*, decidimos evaluar si la regulación de *ler* en ambas bacterias era similar o diferente.

En EPEC el inicio de la transcripción de *ler* se localiza 157 pb corriente arriba de su codón de inicio de la traducción, éste permitió la identificación de un promotor dependiente de sigma 70, el cual posee una caja -10 (TTTACA) con 3 de 6 bases de la secuencia consenso y una caja -35 (TTGACA) que corresponde perfectamente con la secuencia consenso para promotores de *E. coli* (40) (datos no mostrados).

El estudio de la regulación de *ler* en EPEC, al igual que en *C. rodentium*, se abordó mediante el uso de fusiones transcripcionales de *ler* al gen reportero *cat* (fusiones *ler-cat*), las cuales contienen diferentes recortes del extremo 5' de su región reguladora, dando lugar a las fusiones pler-1179, -779, -260, -160, -98, -65, -54 y -31 (Fig. 11A) (58). El análisis de la expresión de estas fusiones en EPEC silvestre (E2348/69) reveló que la fusión pler-260 contenía todos los elementos en *cis* involucrados en la regulación, tanto positiva como negativa de *ler*, ya que la actividad específica de CAT reportada por ésta era muy similar a la obtenida por las fusiones más largas (pler-1179 y -779). Así mismo, se observó que al recortar la región 5' de pler-260, para dar lugar a las fusiones pler-160 y -98, la expresión de éstas se incrementaba de manera gradual, lo cual nos indicaba la presencia de una secuencia de regulación negativa (SRN) comprendida entre -260 y -98. Además, la disminución de la expresión de las fusiones pler-65 y -54, comparada a la obtenida con pler-98, indicaba la presencia de una secuencia de regulación positiva (SRP) comprendida entre las posiciones -98 y -54 (Fig. 11B). De acuerdo con este resultado, previamente se reportó un sitio de unión para IHF (“**I**ntegration **H**ost **F**actor”), un regulador global muy importante en la expresión de *ler*, localizado entre las posiciones -85 y -53 de su región reguladora (26). Por otro lado, la falta de expresión de pler-31 confirmó que la caja -35 del promotor, propuesta previamente con base en la localización del sitio de inicio de la transcripción identificado por ensayos de “primer extension”, es indispensable para la transcripción de *ler*. Así mismo, el estudio comparativo de la

expresión de las fusiones *ler-cat* en los fondos de *E. coli* K-12 (MC4100) y EPEC silvestre, reveló que la transcripción de *ler* requiere de un regulador específico de EPEC (probablemente GrlA), el cual no está presente en *E. coli* K-12, ya que la expresión de las fusiones que contienen todos los elementos en *cis* necesarios su regulación (fusiones pler-260 a pler-1179), fue nula en la cepa de *E. coli* K-12 (Fig. 11B).

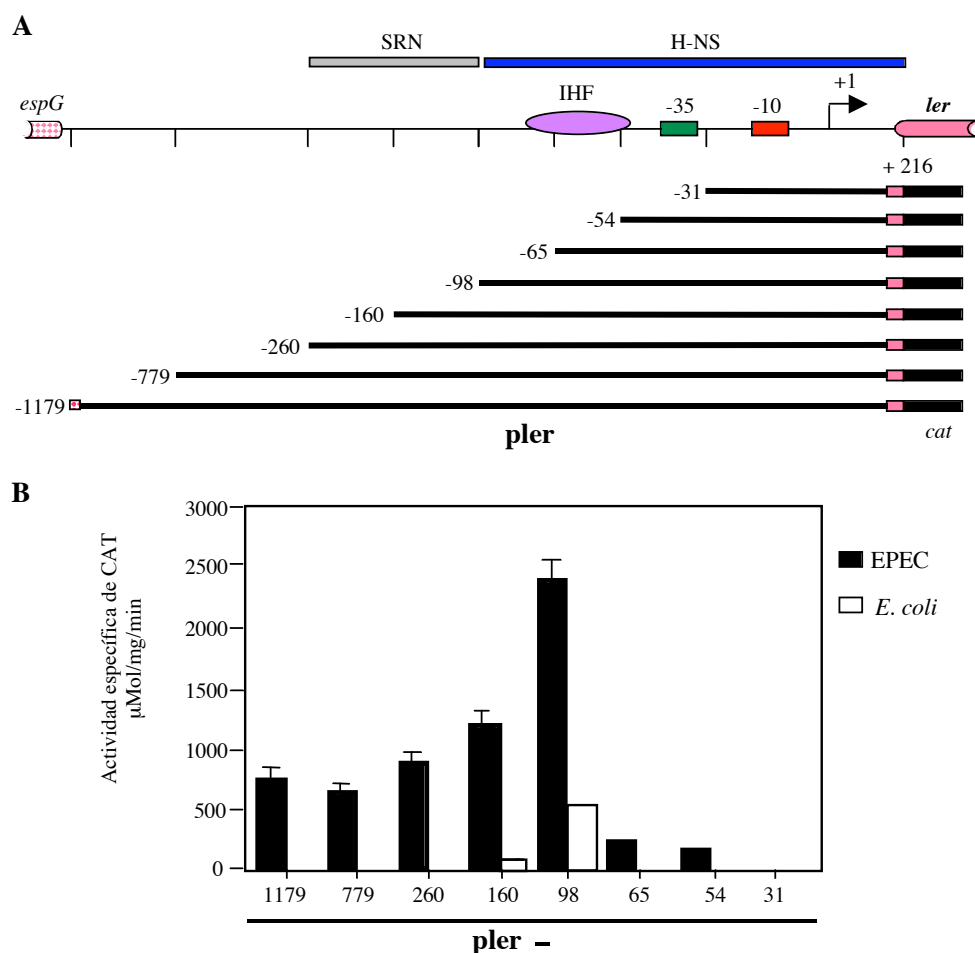


Fig. 11. Determinación de los elementos en *cis* que regulan la expresión de *ler* en EPEC. A) Diagrama de la región reguladora de *ler*. La flecha doblada indica el inicio de transcripción (+1) previamente reportado (40). Las cajas roja y verde representan las cajas -10 y -35 del promotor, respectivamente. El rectángulo gris señala la posición aproximada de la secuencia de regulación negativa (SRN). El óvalo morado representa el sitio al cual se une IHF (-50 a -83) (26). El rectángulo azul señala la región en donde probablemente actúa H-NS (este trabajo). Debajo del diagrama de la región reguladora de *ler*, se muestra un esquema de las fusiones transcripcionales *ler-cat*. Las fusiones *ler-cat* fueron nombradas como *pler* y numeradas de acuerdo a la posición de su extremo 5' con respecto al inicio de la transcripción de *ler*. B) La expresión de *ler* de EPEC es regulada por reguladores específicos. La expresión de las fusiones *ler-cat* fue monitoreada en EPEC (E2348/69) y *E. coli* K-12 (MC4100). La actividad específica de CAT fue determinada de muestras tomadas de cultivo bacterianos crecidos a una $D.O_{600} = 1.2$ en DMEM a 37 °C y agitación (210 rpm). Los resultados son el promedio de cuatro experimentos independientes e incluyen la desviación estándar.

La expresión de *ler* es regulada por H-NS

Con el propósito de definir los elementos en *trans* involucrados en la regulación negativa de la expresión de *ler*, se estudió de manera sistemática la expresión de las fusiones *ler-cat* en mutantes en diversos reguladores globales que incluyeron a Fis, H-NS, StpA, RpoS, Lrp, entre otros. El resultado de este análisis mostró que sólo en ausencia de H-NS, la expresión de aquellas fusiones que contenían la SRN descrita líneas arriba (pler-260 y -160) se incrementaba más de 3 veces, y 1.5 veces la de la fusión pler-98 (Fig. 12). Interessantemente, la expresión de las fusiones que carecen del sitio de unión para IHF (pler-65 y -54) también mostraron un efecto de desrepresión (2.5 y 6 veces, respectivamente) en ausencia de H-NS (Fig. 12). El nivel de desrepresión observado al comparar la expresión de las fusiones en la cepa silvestre contra la mutante en *hns* (E23 Δ *hns*), tanto para las fusiones que contienen la SRN (pler-260 y -160), como para aquellas que no (pler-65 y -54), sugería la existencia de dos probables sitios de unión para la proteína, uno ubicado corriente arriba de la posición -98 y el otro corriente abajo de la misma.

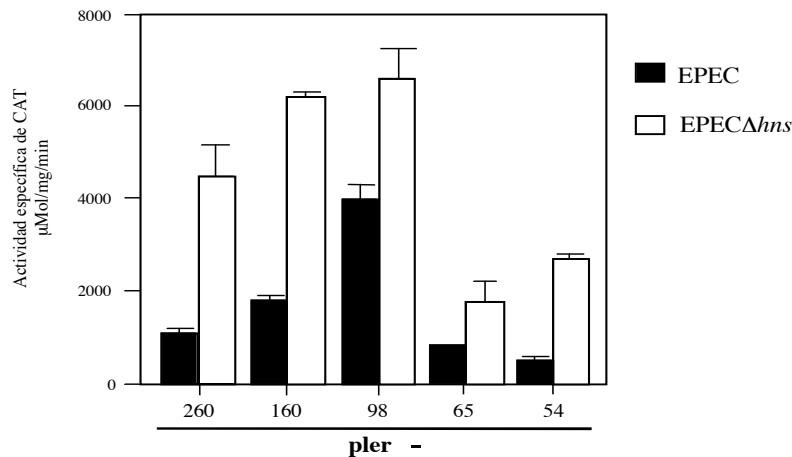


Fig. 12. La expresión de *ler* de EPEC es regulada por H-NS. La expresión de las fusiones *ler-cat* fue monitoreada en EPEC E2348/69 y EPEC Δ *hns* (E2348/69 Δ *hns*::Km). La actividad específica de CAT fue determinada como se describe en la figura 11. La gráfica muestra el promedio y la desviación estándar de cuatro experimentos independientes

Si bien el efecto de H-NS podría ser indirecto afectando la expresión de otra proteína que, a su vez, regulara en cascada la expresión de *ler*, decidimos primero determinar si H-NS se unía directamente a su región reguladora. Para ello se hicieron

ensayos de retardamiento en gel, utilizando dos fragmentos de la región reguladora de *ler* que comprenden de la posición -368 a la -98 y de la -98 a la +220, con respecto al inicio de transcripción. Estos dos fragmentos se obtuvieron por digestión de un fragmento de 588 pb que abarca de la posición -368 a la +220 con HpaI (Fig. 13A). El ensayo mostró que H-NS sólo se une, de manera específica, al fragmento que comprende de la posición -98 a +220 (Fig. 13B). Este resultado sugiere, al igual que en *C. rodentium*, que la regulación negativa provista por H-NS sobre la expresión de *ler*, se debe a la interacción de esta proteína con una secuencia cercana a su región promotora y que el efecto de represión observado corriente arriba de -98 podría deberse a la acción de otra proteína.

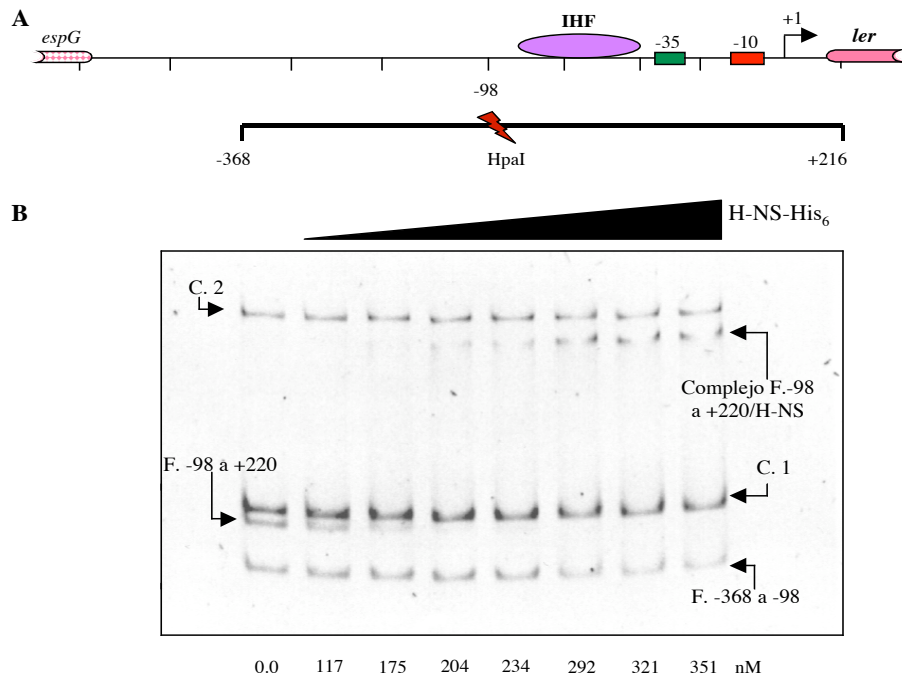


Fig. 13. H-NS se une específicamente a la región reguladora de *ler* A) Esquema de la región reguladora de *ler*. La flecha doblada indica el inicio de la transcripción de *ler* (40), los rectángulos verde y rojo representan las cajas de los promotores, -35 y -10, respectivamente. El óvalo morado representa el sitio de unión de IHF (26). La digestión del fragmento de DNA (584 pb) utilizado en los ensayos de retardamiento esta representado abajo del diagrama de la región reguladora de *ler*. Con un pequeño rayo rojo se representa la posición (-98) que reconoce la endonucleasa HpaI. B) Ensayos de la movilidad electroforética *ler*-H-NS. Concentraciones crecientes de la proteína H-NS-His₆ fueron incubadas con los fragmentos de DNA obtenidos por digestión o generados por PCR (C.1 y C.2). Los retardos fueron resueltos en un gel de poliacrilamida al 4% y teñidos con Bromuro de Etidio. Los fragmentos provenientes de la digestión que corresponden a la región reguladora y codificante de *ler*, así como su posición, se indican con la letra F. El complejo DNA-H-NS-His₆ se indica en la parte superior del gel. Los controles se representan con la letra C, donde C.1 corresponde a la región estructural de *ler* y C.2 es un DNA inespecífico que se amplificó en conjunto con el DNA blanco.

GrlA regula la expresión de *ler* en EPEC

Con el objeto de determinar si GrlA estaba involucrado en la regulación transcripcional de *ler* en EPEC, se creó la mutante en *grlA* de EPEC (E2348/69 Δ *grlA*::Km) y se evaluó la expresión de las fusiones de *ler-cat* en dicho fondo genético. El resultado del experimento reveló que la expresión de la mayoría de las fusiones disminuía al menos 2 veces en la mutante en *grlA* y la fusión *pler-98*, la cual carece de los elementos de regulación negativa, sólo disminuía un 33%. Los datos anteriores mostraban que GrlA, al igual que en *C. rodentium*, es el factor específico de EPEC que regula de manera positiva la expresión de *ler*.

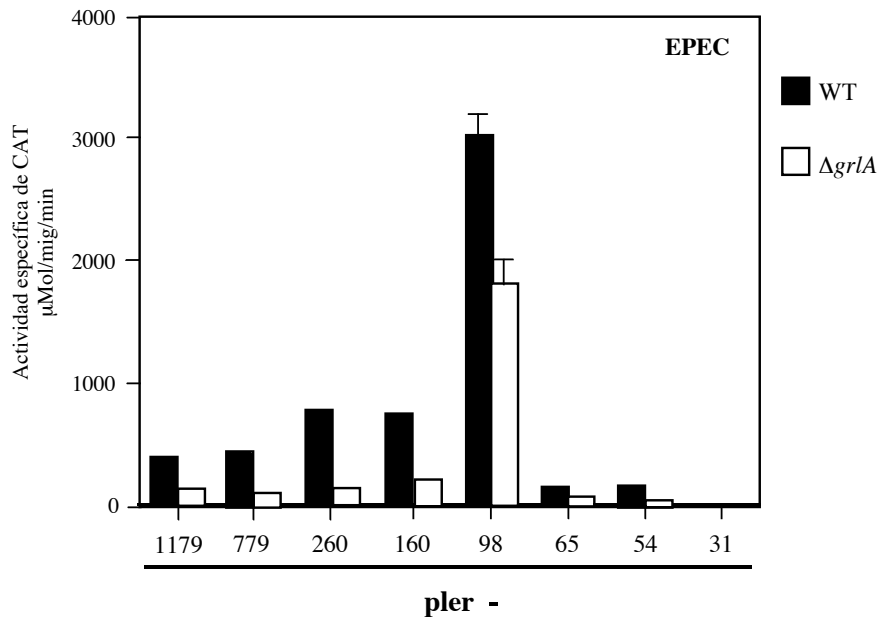


Fig. 14. La expresión de *ler* de EPEC es regulada por GrlA. La expresión de las fusiones *ler-cat* fue monitoreada en EPEC E2348/69 y EPEC Δ *grlA* (E2348/69 Δ *grlA*::Km). La actividad específica de CAT fue determinada como se describe en la figura 11. La gráfica muestra el promedio y la desviación estándar de cuatro experimentos independientes

Discusión

Diferentes estudios han demostrado que Ler es el principal regulador positivo de la expresión de los genes de virulencia de las bacterias productoras de la lesión A/E (17, 22, 40). En consecuencia su expresión esta finamente regulada, positiva o negativamente, por un gran número de reguladores, tanto globales (IHF (26), H-NS (56), Fis (27)), como específicos (GrlA (17), GrlR (38) y PerC (46)).

En el presente trabajo, demostramos que GrlA y Ler se regulan de manera positiva y recíprocamente, formando un circuito (“loop”) regulador transcripcional positivo, el cual para nuestro conocimiento es el primer ejemplo reportado en procariotes. Reportes previos han demostrado la existencia de este tipo de regulación recíproca como un mecanismo de control negativo, como se ejemplificó para la proteínas H-NS y StpA de *E. coli*, en donde su sobreexpresión resulta en un efecto negativo en la transcripción de *stpA* o *hns*, respectivamente (61).

Descripción del circuito de regulación positiva entre Ler y GrlA

En este trabajo mostramos distintas evidencias que indican que GrlA se requiere para promover la activación de *ler*: I) la expresión de las diferentes fusiones transcripcionales CR ler -*cat* disminuye drásticamente en una mutante de *C. rodentium* en *grlA*, comparada con la expresión obtenida en la cepa silvestre (Fig. 1A. Barba *et al.* 2005) (5); II) un plásmido que codifica para GrlA, pero no el que codifica para Ler, permite la expresión de las fusiones CR ler -*cat* en *E. coli* K-12, inclusive de aquella fusión que sólo contiene al promotor y secuencia corriente abajo (pCR ler -40) (Fig. 2B Barba *et al.* 2005) (5); III) GrlA aumenta aproximadamente 3 veces la expresión de *ler* en la cepa de *E. coli* Δhns (Fig. 2C. Barba *et al.* 2005) (5); IV) experimentos de transcripción *in vitro* muestran que GrlA incrementa la cantidad del transcrito producido a partir del promotor de *ler*, y no del transcrito de *lacUV5* (Fig. 8); y V) una mutante de GrlA (CRGrlA-R52G) en un residuo localizado en el motivo HTH, el cual está conservado en CaiF y el homólogo de GrlA en *Salmonella enterica* (Fig. 6) (17), no es capaz de activar la expresión de *ler* en un fondo de *E. coli* K-12 o de complementar la

expresión de Tir en la mutante de *grlA* en *C. rodentium* (Fig. 9). En su conjunto, estos datos permiten proponer que GrlA podría tener una función dual: la de activador favoreciendo, a través de un mecanismo aún no bien definido, la interacción de la RNA polimerasa con el promotor de *ler* y la de antirepresor, eliminando la represión ejercida por H-NS o algún otro represor aún no identificado. Para ambas situaciones, GrlA ejerce su función interactuando, directa o indirectamente, con una región localizada en la vecindad del promotor o corriente abajo de éste.

La evidencia experimental descrita anteriormente, junto con la observación de que GrlA posee un presunto sitio de unión a DNA del tipo HTH (17), el cual aparentemente es esencial para su función (Figs. 6 y 9), sugieren fuertemente que este regulador interactúa directamente con el DNA. Sin embargo, hasta el momento, no hemos podido detectar la unión de GrlA a la región promotora de *ler*, por medio de ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética en gel, utilizando la proteína de fusión MBP-CRGrIA, la cual es capaz de complementar a la mutante de *C. rodentium* en *grlA* (Fig. 9C).

La aparente contradicción entre la evidencia experimental que indica que MBP-CRGrIA fomenta la transcripción de *ler in vitro*, lo cual es consistente con su capacidad de complementar a la mutante en *grlA*, y la que indica que no se une al DNA, nos lleva a considerar la opción de que GrlA podría estar condicionada a interactuar con la RNA polimerasa para así permitir la transcripción del promotor de *ler*. Un posible escenario plantea la posibilidad de que GrlA se asocie a la RNA polimerasa una vez que ésta ha hecho contacto con el promotor, favoreciendo así la formación del complejo cerrado y el inicio de la transcripción, como lo hacen muchos activadores (6). Este mecanismo no descarta la posibilidad de que GrlA interactúe específicamente con alguna secuencia cercana al promotor, una vez que se da la probable interacción con la RNA polimerasa, para darle especificidad al sistema. Otro escenario plantea la posibilidad de que primero se dé la interacción entre la RNA polimerasa y GrlA para, posteriormente, de manera conjunta, unirse al promotor y promover la transcripción de *ler*. Al respecto, un mecanismo similar conocido como pre-reclutamiento, se ha descrito para el activador

transcripcional SoxS, el cual interviene en la respuesta a condiciones de estrés por superóxidos (52).

El experimento de “primer extension” para definir el inicio de transcripción del operón *grlRA* (Fig. 4. Barba *et al.* 2005) (5)) y el análisis de la expresión de las fusiones *grlRA-cat* en las mutantes individuales de los genes *ler* y *grlA* de *C. rodentium* (Fig. 3. Barba *et al.* 2005) (5)), demostraron que la expresión del operón requiere de Ler y GrlA. Experimentos adicionales, como el mostrado en la figura 5A (Barba *et al.* 2005) (5), donde el plásmido que provee a Ler en *trans*, pero no el que provee a GrlA, favorece la expresión de las fusiones *grlRA-cat* en *E. coli* K-12 (en la cual el operón *grlRA* no se expresa naturalmente) proveyeron evidencia de que Ler está directamente involucrado en la expresión del operón y que el papel de GrlA es indirecto a través de la activación de *ler*, como ya se mencionó líneas arriba. Así mismo, los experimentos de retardamiento en gel con distintos fragmentos de la región que comprende *rorf3*, *grlR* y *grlA*, mostraron que Ler se une de manera directa y específica, con diferentes afinidades, a dos sitios de la región comprendida en *rorf3* y *grlRA*; el de menor afinidad contenido dentro de la región codificante de *rorf3* y el de mayor afinidad localizado en la región codificante de *grlR* (Fig. 6B. Barba *et al.* 2005) (5)).

Los resultados obtenidos, claramente explican porque se reduce la expresión de *ler* y de *grlA* en las mutantes de *grlA* y *ler* de *C. rodentium*, respectivamente. Al mismo tiempo, estos datos fundamentan la existencia del circuito (“loop”) de regulación positiva entre *ler* y *grlA* (Fig. 16).

El efecto de H-NS sobre la expresión de *grlA*

De acuerdo con los resultados de este estudio, H-NS y Ler se unen a sitios no sobrelapantes de la región comprendida entre *rorf3* y *grlRA*. Ensayos de unión al DNA con H-NS, muestran la existencia de dos sitios con diferente afinidad: el de mayor afinidad, localizado entre el extremo 3' de *grlR* y el extremo 5' de *grlA*; y el de menor afinidad localizado en la región intergénica entre *rorf3* y *grlR* (Fig. 6C. Barba *et al.* 2005) (5). Cabría pensar que la afinidad de unión al DNA debería reflejar qué sitio tiene mayor impacto en la regulación transcripcional de *grlRA* por H-NS. Sin embargo, de acuerdo a

los datos obtenidos con las fusiones transcripcionales, es claro que la ausencia de H-NS permite que se incremente considerablemente la expresión de todas las fusiones que contienen el sitio de menor afinidad para la misma, esté o no presente el sitio de mayor afinidad o Ler (Fig. 5B. Barba *et al.* 2005) (5). Cabe señalar que el sitio de menor afinidad se localiza en la región que, a su vez, contiene el promotor del operón, lo cual dificulta su análisis más en detalle. A pesar de que se requiere de estudios futuros para definir con precisión cuál es el papel del sitio de mayor afinidad para H-NS, la información obtenida hasta el momento sugiere que no es tan importante para la regulación del promotor de *grlRA*, al menos en las condiciones experimentales empleadas en este estudio.

Ahondando un poco más en este último punto y tratando de explicar la función del sitio de mayor afinidad para H-NS, podemos sugerir que este sitio puede estar implicado en la regulación negativa del operón *grlRA* a bajas temperaturas, por ejemplo 30°C. Se ha descrito que a esta temperatura se favorece el superenrollamiento del DNA permitiendo el acercamiento de regiones que están relativamente alejadas (24), generalmente favorecido por la presencia de regiones curvas inherentes a la estructura del DNA, lo cual permitiría la interacción de H-NS consigo misma, dando lugar a la formación de un complejo multiproteico que impediría el acceso a la RNA polimerasa (19). Tratando de apoyar esta última hipótesis, un análisis *in silico* (http://www.ibt.unam.mx/biocomputo/dna_curvature.html) de la región ubicada entre los dos sitios de unión para H-NS sobre *grlRA*, reveló la presencia de una región curva ubicada en la región codificante de *grlR* (43). En apoyo a esta última idea, la existencia de este mecanismo de regulación negativa provista por H-NS, ha sido descrito para el promotor de *virF* de *Shigella flexneri* (24).

Regulación de la expresión del operón *grlRA* por Ler

Nuestros resultados indican que Ler regula la expresión del operón *grlRA* contrarrestando, por lo menos en parte, la represión mediada por H-NS sobre su promotor (Fig. 5B. Barba *et al.* 2005) (5). Nuestro grupo y otros laboratorios han propuesto que Ler actúa como anti-represor, puesto que elimina la represión provista por H-NS sobre la

mayoría de los promotores del LEE (11, 29, 56). En apoyo a la idea anterior, se ha observado que la expresión de los operones *LEE2* y *LEE3* no requiere de Ler en ausencia de H-NS (10, 11).

El mecanismo por el cual Ler contunde con la represión mediada por H-NS sobre los operones *LEE2-LEE3* ha empezado a dilucidarse. En este sentido, se sabe que H-NS al unirse a las secuencias reguladoras silenciadoras 1 y 2 (SRS1 y 2), las cuales flanquean a los promotores de los operones *LEE2* y *LEE3*, favorece la formación de un complejo núcleo-represor, el cual probablemente es estabilizado por la interacción de H-NS consigo misma. En este contexto, se ha observado que la unión específica de Ler a la SRS1 desestabiliza el complejo núcleo-represor y libera la expresión de los operones *LEE2* y *LEE3* (10, 11). Un modelo similar se ha propuesto para la regulación del operón *LEE5* (29). Así mismo, cabe señalar que la regulación negativa mediada por H-NS es un mecanismo comúnmente encontrado en bacterias patógenas para la regulación de factores de virulencia y que en estos organismos diferentes reguladores transcripcionales positivos, pertenecientes a diversas familias de activadores transcripcionales, han evolucionado para contender con dicha represión (revisado en 19). Sin embargo, Ler resulta ser un caso particularmente interesante, ya que es un homólogo de H-NS con una función antagonista (11).

Con respecto a la regulación sobre el operón *grlRA*, Ler se une con diferentes afinidades a dos sitios comprendidos entre *rorf3* y *grlRA* (Fig. 6. Barba *et al.* 2005) (5). En contraste a la regulación provista por H-NS, los dos sitios encontrados para Ler pueden mediar, de manera independiente, la expresión de *grlRA*, ya que la expresión de fusiones que llevan alguno de los dos sitios depende de Ler (Fig. 3. Barba *et al.* 2005) (5). El mecanismo por el cual Ler permite la expresión de *grlRA* aún es incierto, pero con base al mecanismo de desrepresión propuesto para el promotor P1 del operón ribosomal *rrnB* (1), proponemos que la unión de Ler, bajo condiciones de inducción, a secuencias que flanquean la región promotora de *grlRA*, puede inducir cambios estructurales que desestabilicen la unión de H-NS y de esta manera libere la expresión del promotor.

Otra observación interesante es el hecho de que sólo en ausencia de ambas NRSs, y más aún en ausencia de H-NS, la expresión del promotor de *grlRA* se vuelve independiente de Ler. Lo anterior contrasta con la regulación observada para los promotores de los operones *LEE2-LEE3*, en donde se observa que en ausencia de sólo una de las SRSs o de H-NS, estos promotores se expresan a los mismos niveles y en forma independiente de Ler, apoyando el modelo que indica que los SRSs son los sitios de unión del represor H-NS (11). Los datos anteriores reflejan la variabilidad que puede existir en el mecanismo por el cual Ler contunde con la represión mediada por H-NS u otros represores. Sin embargo, es importante resaltar que para el promotor de *grlRA* los NRSs no coinciden con los sitios de unión para H-NS y que en ausencia de H-NS este promotor puede llegar a ser cuatro veces más activo que en ausencia de ambos NRSs.

Otros reguladores negativos del operón *grlRA*

El análisis de las fusiones *grlRA-cat* también mostró que H-NS no es el único responsable de la regulación negativa de *grlRA*, ya que aún en su ausencia las fusiones presentan diferentes niveles de expresión (Fig. 5B. Barba *et al.* 2005) (5). Así mismo, el hecho de que la desrepresión fuera sólo parcial en presencia de uno o ambos elementos de regulación negativa (NRS), en la cepa mutante en *hns*, sugiere que factores adicionales o mecanismos que aún no están bien definidos, son requeridos para un nivel adicional de represión. Al respecto, se ha reportado que GrIR es un represor de la expresión del LEE (17, 33, 38), por tal motivo no podemos excluir la posibilidad de que la presencia de la región codificante para esta proteína, en algunas de las fusiones, tenga una influencia negativa sobre la expresión de su propio promotor.

Regulación negativa de la expresión de *ler*

La expresión de *ler* también está regulada por H-NS. Reportes anteriores muestran que H-NS reprime la expresión de *ler* a 27°C (56). Nuestras observaciones, además de confirmar el papel de H-NS sobre la regulación de *ler*, también muestran que esta proteína puede ejercer su regulación a 37°C. El análisis de las fusiones mostró que H-NS interactúa sobre la UTR de *ler*, (posiciones +80 a +216) (Fig. 5). Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre para promotores regulados por Ler, en ausencia de H-NS la

expresión de *ler* no se vuelve totalmente independiente de GrlA (Fig. 2C. Barba *et al.* 2005) (5). Estos resultados sugieren que, como ya se había mencionado antes, GrlA se requiere para activar la expresión de *ler*. Sin embargo, estos datos no excluyen la posibilidad de que GrlA pueda contender, en parte, con la represión mediada por H-NS o con elementos adicionales encontrados en la UTR. Al respecto, existen evidencias de que algunos reguladores transcripcionales poseen una doble función, es decir tanto de activador como de desrepresor, como es el caso del regulador ToxT, el cual permite la expresión de *ctx* y *tcp* en *Vibrio cholerae* (60).

Cabe señalar que la fusión pCR_{ler}-80 se expresa de manera similar en *C. rodentium* Δ *grlA* y *E. coli* K-12, lo cual indica que dicha expresión es independiente de GrlA. Esta observación sugiere que río arriba de la posición -80, hay un motivo de regulación que modula negativamente la expresión de *ler*. Un posible candidato es la proteína Hha, la cual regula de manera negativa la expresión de *ler* uniéndose a su región reguladora, aunque el sitio preciso de unión no ha sido definido (53). Por otro lado, tomando en consideración que IHF es una proteína esencial para la expresión de *ler* en EPEC, la cual se une a su región reguladora sobre una secuencia localizada río abajo de la posición -80 (26), y que la actividad independiente de GrlA observada para la fusión pCR_{ler}-80, se abate para la fusión pCR_{ler}-40, la cual carece del sitio de unión a IHF, plantea la posibilidad de que IHF sea la responsable de generar cambios estructurales en el DNA que parcialmente eliminan la regulación negativa ejercida por alguna proteína (por ejemplo Hha) al unirse corriente arriba del promotor. Así mismo, existe también la posibilidad de que la unión de IHF ayude a contender con la regulación negativa provista por H-NS sobre el promotor de *ler*.

Elementos de regulación inherentes a la Región no Traducida de *ler*

Se ha descrito, generalmente en eucariotes, que las regiones encontradas entre el inicio de la transcripción y la traducción de los genes, conocidas como regiones no traducidas (UTR), pueden llegar a estar implicadas en la regulación transcripcional o traduccional de los mismos genes. Para el caso de *ler*, las fusiones recortadas hacia el extremo 3' (fusiones pCR_{ler}-200/+) mostraron que la UTR de *ler* contiene elementos

reguladores que modulan negativamente su expresión, ya que el recorte de la secuencia localizada entre las posiciones +160 a +216, así como el de la secuencia localizada entre las posiciones +80 a +120, da como resultado el incremento de su actividad, la cual es aún dependiente de la regulación provista por GrlA y H-NS (Figs. 4 y 5).

Dada la evidencia experimental, podríamos proponer diferentes mecanismos implicados en la regulación observada en presencia o ausencia de diferentes regiones de la UTR. Por citar algunos, se ha descrito que la expresión de un gen puede estar influenciada por la presencia de estructuras secundarias que adoptan los transcritos en regiones asociadas a las UTRs. Tal es el caso de los genes involucrados en la biosíntesis de tiamina, los cuales contienen un elemento regulador conocido como “*thi box*” que ejerce su función al formar estructuras secundarias específicas en el transcrito (41). Otro ejemplo es el del replicón *repABC* del plásmido p42d de *Rhizobium etli*, para el cual, entre otras cosas, se describió la presencia de una estructura de tallo y asa corriente arriba de *repC* que secuestra el “Shine-Dalgarno” del gen y regula negativamente su transcripción (57).

Para el caso de la regulación provista por la UTR sobre la expresión de *ler*, el modelado *in silico* (http://www.genebee.msu.su/services/rna2_reduced.html) de las probables estructuras que puede adoptar la UTR contenida en las diferentes fusiones pCRler-200/+ (Fig 15 y datos no mostrados) (8), reveló la presencia de una estructura de tallo y asa ubicada, aproximadamente, entre las posiciones +130 y +210, la cual puede ser la responsable de atenuar la transcripción de *ler*, dado que la fusión que carece de esta secuencia (pCRler-200/+160), reporta un aumento de actividad de CAT de 60 veces en la cepa silvestre de *C. rodentium*, comparada con la obtenida para la fusión pCRler-200/+216, la cual posee la secuencia que forma dicha estructura secundaria (Fig. 8).

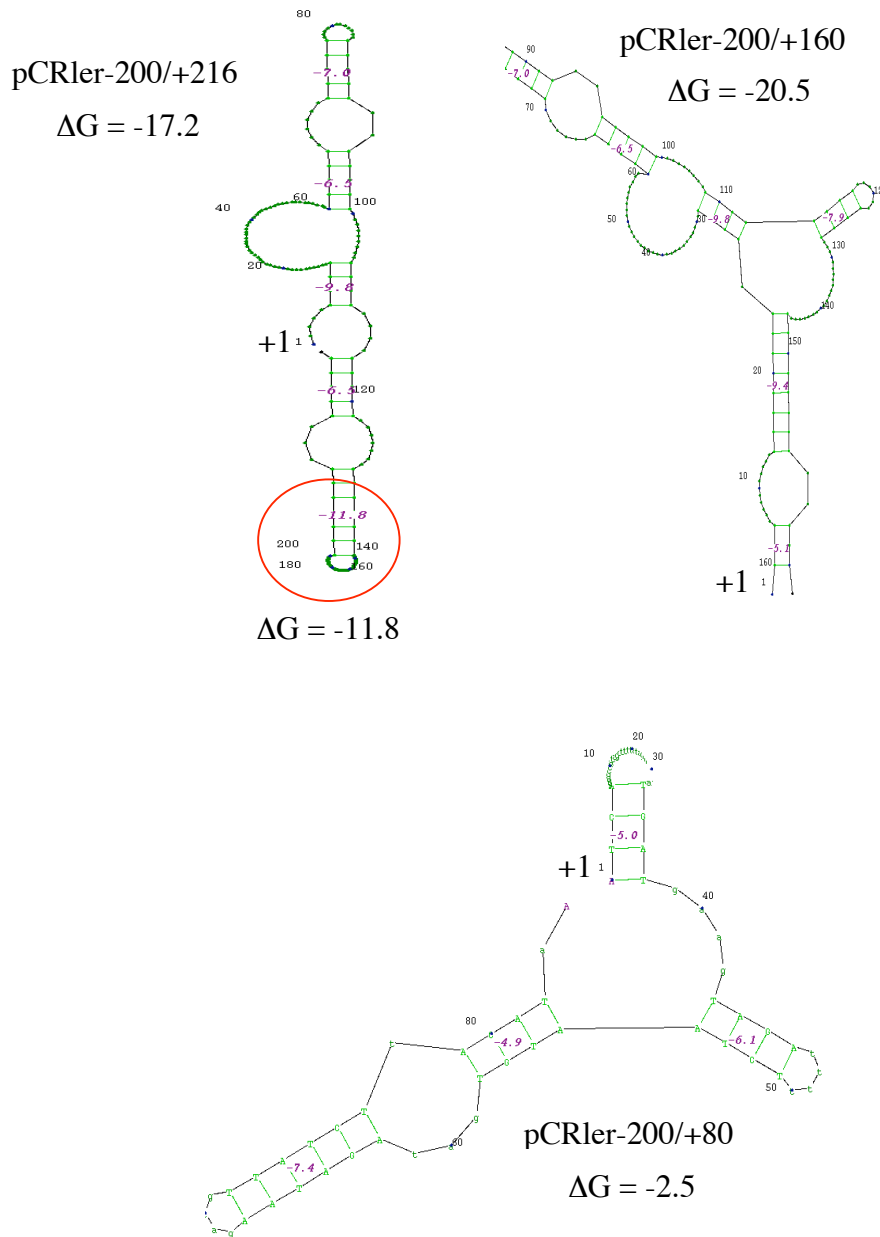


Fig. 15. Modelado de las UTR de *ler* (+1 a +160). Se muestra el modelado *in silico* de las UTRs contenidas en las fusiones pCRler-200/+216, +160 y + 80 (8). Se presenta la estructura correspondiente a cada UTR de la fusión y abajo del nombre de cada una de ellas se muestra ΔG de cada estructura. Un círculo rojo señala la estructura de tallo y asa presente en la fusión pCRler-200/+216 y abajo de ésta, la ΔG de dicha estructura secundaria. También se señala la posición en la que se encuentra el +1 en cada fusión.

A pesar de la probable existencia de la estructura de tallo y asa, no podemos excluir la posibilidad de que una proteína reguladora interactúe sobre la UTR del mRNA de *ler* y por ende regule negativamente su expresión. En apoyo a lo anterior, en los últimos años se ha dilucidado el mecanismo de acción del sistema de regulación global Csr (“Carbone storage regulator” CsrA y CsrB). En donde CsrA es una proteína que se une al RNA y facilita la decadencia de transcritos de mRNA específicos de un gran número de genes de mantenimiento celular (47) o de virulencia, como es el caso de los reguladores *hilC* y *hilD* de *Salmonella enterica* (2, 3). Por otro lado, CsrB es una molécula de mRNA no traducido que antagoniza la actividad de CsrA por medio de la formación de un complejo globular (47).

Como se mencionó líneas arriba, el mecanismo por el cual la UTR regula la expresión de *ler* aún no está definido. Sin embargo, con base a que la secuencia que compone la UTR está ampliamente conservada entre EPEC, EHEC y *C. rodentium*, creemos que el mecanismo de regulación provisto por la UTR sobre la expresión de *ler* está conservado entre los tres organismos.

No obstante a que hacen falta experimentos que expliquen cómo la UTR de *ler* regula su expresión, es claro que las evidencias mostradas en este trabajo abren un nuevo panorama del estudio de la regulación de *ler* y en general de los genes contenidos en el LEE los cuales, de manera general, contienen UTRs relativamente largas cuyo papel en regulación a la fecha nadie ha explorado.

Conclusión

En conclusión, nuestros datos apoyan claramente la existencia del circuito (“loop”) de regulación positiva entre Ler y GrlA. Si bien en este punto aún no nos es posible definir cuál de las proteínas es responsable de iniciar el circuito regulador, sí podríamos proponer que, bajo condiciones de inducción, niveles basales preexistentes de Ler y/o GrlA adoptan una conformación adecuada que permite la activación recíproca de los promotores de *grlRA* y *ler*, respectivamente. Alternativamente, o en paralelo, el incremento inicial de la expresión de *ler* o *grlRA* podría estar mediado por cambios estructurales en el DNA, y/o la participación de otras proteínas reguladoras (por ejemplo, reguladores globales), que promovieran un estado más competente para la transcripción de ambos promotores. Una vez activado el circuito, éste incrementaría la concentración celular de Ler, la cual posteriormente podría contender con la represión mediada por H-NS sobre varios promotores dentro y fuera del LEE.

Por otro lado, para prevenir la posible acumulación celular de Ler o de proteínas codificadas por genes regulados por Ler, que pudiera ser nociva para la bacteria, el circuito regulador entre Ler y GrlA podría ser modulado negativamente. Una opción sería la propia Ler, una vez que alcanzara la concentración umbral que permite la represión de su propia transcripción (7). Otro candidato es GrlR, el cual recientemente se ha involucrado en la regulación negativa de *ler* (17) y de los genes regulados por Ler, principalmente en medio LB (38) (33). Así mismo, se ha reportado que GrlR es capaz de interactuar específicamente con GrlA (14), lo cual podría bloquear el efecto positivo de GrlA sobre la transcripción de *ler* y, por tanto, de la actividad del circuito Ler-GrlA. De manera interesante, como se muestra aquí, *grlR* es cotranscrito con *grlA* de una manera dependiente de Ler, lo cual nos lleva a sugerir que cuando el circuito de retroalimentación es activo, mecanismos de regulación adicional (postranscripcional, traduccional, o postraduccional), permiten la inactivación de GrlR, lo cual conlleva a un incremento en la concentración de Ler y/o GrlA, hecho que repercute de manera favorable en el circuito de regulación descrito en este estudio.

Con respecto a la existencia del circuito de regulación recíproca en los otros patógenos formadores de la lesión A/E, proponemos que es funcionalmente similar, ya que la expresión de proteínas codificadas en el LEE es abolida en mutantes de EPEC y EHEC en *grlA* (35, 58). Así mismo, la expresión del operón *grlRA* es abolida en los mismos fondos genéticos mutantes en *ler* ((22) y nuestros datos no publicados). Sin embargo, el significado preciso del acoplamiento transcripcional de *grlR-grlA* y el mecanismo por el cual GrlR regula negativamente la expresión de los genes LEE, son actualmente motivo de estudio. Con base en lo anterior, se presenta en la figura 16 un modelo de la regulación de los genes del LEE, enfatizando los circuitos de regulación positiva y negativa que controlan la expresión de *ler*.

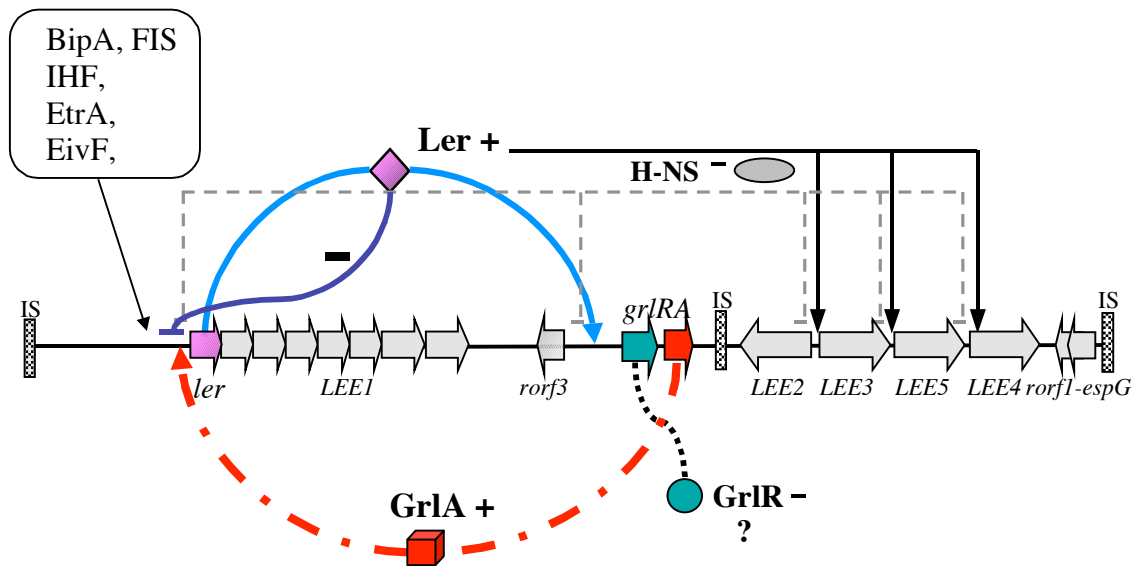


Fig. 16. Modelo de la regulación del LEE en los patógenos que desarrollan la lesión A/E. Ler regula positivamente la expresión de los genes del LEE contrarrestando la represión mediada por H-NS sobre sus promotores. La expresión de *ler* es altamente regulada por reguladores específicos, tales como GrlA, GrlR y PerC, así como también por reguladores globales, tales como IHF, Fis, BipA, EtrA, EivF y QseA. Niveles apropiados de la expresión de *ler* son mantenidos por un circuito de regulación positiva, formado por Ler y GrlA, el cual puede ser modulado negativamente por GrlR a través de un mecanismo que aún no está bien definido, o por la habilidad que tiene Ler de auto-regular su propia expresión.

Perspectivas

Definir en detalle el mecanismo por el cual GrlA permite la transcripción de *ler*, para ello se plantea lo siguiente:

- Probar si GrlA interacciona con las subunidades de la RNA polimerasa y, en su caso, si esta interacción le permite unirse al DNA.
- Evaluar si GrlA contienda con la represión mediada por H-NS u otro regulador negativo.

Utilizar a GrlA como modelo para caracterizar dominios funcionales y la estructura de las proteínas pertenecientes a esta nueva familia de reguladores transcripcionales.

Identificar si GrlR es capaz de reprimir, de manera directa, la transcripción de su propio promotor y/o el de *ler*, ya que se ha reportado que GrlR reprime la expresión de los genes del LEE.

Definir qué papel juega en la regulación de *ler* la interacción entre GrlR y GrlA.

Evaluar si el sitio de mayor afinidad para H-NS, ubicado sobre la región intergénica localizada entre *grlR* y *grlA*, tiene un efecto sobre la expresión del promotor del operón *grlRA*.

Definir el mecanismo por el cual la UTR de *ler* regula negativamente su propia expresión.

- Hacer mutaciones puntuales en la probable estructura de tallo asa formada en la región contenida entre +130 y +210 de *ler*.
- Evaluar si alguna proteína reguladora, tal como CsrA o Rnasa E, interactúan sobre la UTR de *ler* y de esta manera regulan negativamente la expresión del gen.

Bibliografía

1. **Afflerbach, H., O. Schroder, and R. Wagner.** 1999. Conformational changes of the upstream DNA mediated by H-NS and FIS regulate *E. coli* RrnB P1 promoter activity. *J. Mol. Biol.* **286**:339-353.
2. **Altier, C., M. Suyemoto, and S. D. Lawhon.** 2000. Regulation of *Salmonella enterica* serovar typhimurium invasion genes by *csrA*. *Infect. Immun.* **68**:6790-6797.
3. **Altier, C., M. Suyemoto, A. I. Ruiz, K. D. Burnham, and R. Maurer.** 2000. Characterization of two novel regulatory genes affecting *Salmonella* invasion gene expression. *Mol. Microbiol.* **35**:635-646.
4. **Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl.** 1989. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, New York, N.Y.
5. **Barba, J., V. H. Bustamante, M. A. Flores-Valdez, W. Deng, B. B. Finlay, and J. L. Puente.** 2005. A Positive Regulatory Loop Controls Expression of the Locus of Enterocyte Effacement-Encoded Regulators Ler and GrlA. *J. Bacteriol.* **187**:7918-7930.
6. **Barnard, A., A. Wolfe, and S. Busby.** 2004. Regulation at complex bacterial promoters: how bacteria use different promoter organizations to produce different regulatory outcomes. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**:102-108.
7. **Berdichevsky, T., D. Friedberg, C. Nadler, A. Rokney, A. Oppenheim, and I. Rosenshine.** 2005. Ler is a negative autoregulator of the *LEE1* operon in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**:349-357.
8. **Brodsky, L. I., V. V. Ivanov, K. d. Ya.L., L. A.M., N. V.K., F. S.I., and D. V.A.** 1995. GeneBee-NET:Internet-based server for analyzing biopolymers structure. *Biochemistry* **60**:923-928.
9. **Buchet, A., W. Nasser, K. Eichler, and M. A. Mandrand-Berthelot.** 1999. Positive co-regulation of the *Escherichia coli* carnitine pathway *cai* and *fix* operons by CRP and the CaiF activator. *Mol. Microbiol.* **34**:562-575.
10. **Bustamante, V. H., J. A. Ibarra, K. Carrillo, A. Vazquez, and J. L. Puente.** 2004. The locus of enterocyte effacement-encoded regulator (Ler) overcomes repression of type III secretion operons by modifying a nucleoprotein complex formed by H-NS. Presented at the 104th General Meeting of the American Society for Microbiology, New Orleans LA., 23 to 27 May 2004.

11. **Bustamante, V. H., F. J. Santana, E. Calva, and J. L. Puente.** 2001. Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol. Microbiol.* **39**:664-678.
12. **Casadaban, M. J.** 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* **104**:541-555.
13. **Crane, J. K., B. P. McNamara, and M. S. Donnenberg.** 2001. Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* **3**:197-211.
14. **Creasey, E. A., R. M. Delahay, S. J. Daniell, and G. Frankel.** 2003. Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**:2093-2106.
15. **Dean, P., M. Maresca, and B. Kenny.** 2005. EPEC's weapons of mass subversion. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:28-34.
16. **Deng, W., Y. Li, B. A. Vallance, and B. B. Finlay.** 2001. Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. *Infect. Immun.* **69**:6323-6335.
17. **Deng, W., J. L. Puente, S. Gruenheid, Y. Li, B. A. Vallance, A. Vazquez, J. Barba, J. A. Ibarra, P. O'Donnell, P. Metalnikov, K. Ashman, S. Lee, D. Goode, T. Pawson, and B. B. Finlay.** 2004. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:3597-3602.
18. **Deng, W., B. A. Vallance, Y. Li, J. L. Puente, and B. B. Finlay.** 2003. *Citrobacter rodentium* translocated intimin receptor (Tir) is an essential virulence factor needed for actin condensation, intestinal colonization and colonic hyperplasia in mice. *Mol. Microbiol.* **48**:95-115.
19. **Dorman, C. J.** 2004. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:391-400.
20. **Eichler, K., A. Buchet, R. Lemke, H. P. Kleber, and M. A. Mandrand-Berthelot.** 1996. Identification and characterization of the *caiF* gene encoding a potential transcriptional activator of carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**:1248-1257.
21. **Elliott, S. J., E. O. Krejany, J. L. Mellies, R. M. Robins-Browne, C. Sasakawa, and J. B. Kaper.** 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.
22. **Elliott, S. J., V. Sperandio, J. A. Giron, S. Shin, J. L. Mellies, L. Wainwright, S. W. Hutcheson, T. K. McDaniel, and J. B. Kaper.** 2000. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **68**:6115-6126.
 23. **Elliott, S. J., L. A. Wainwright, T. K. McDaniel, K. G. Jarvis, Y. K. Deng, L. C. Lai, B. P. McNamara, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper.** 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. Mol. Microbiol. **28**:1-4.
 24. **Falconi, M., B. Colonna, G. Prosseda, G. Micheli, and C. O. Gualerzi.** 1998. Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor H-NS. Embo. J. **17**:7033-7043.
 25. **Flores-Valdez, M. A., J. L. Puente, and E. Calva.** 2003. Negative osmoregulation of the *Salmonella ompS1* porin gene independently of OmpR in an *hns* background. J. Bacteriol. **185**:6497-6506.
 26. **Friedberg, D., T. Umanski, Y. Fang, and I. Rosenshine.** 1999. Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **34**:941-952.
 27. **Goldberg, M. D., M. Johnson, J. C. Hinton, and P. H. Williams.** 2001. Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **41**:549-559.
 28. **Grant, A. J., M. Farris, P. Alefounder, P. H. Williams, M. J. Woodward, and C. D. O'Connor.** 2003. Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). Mol. Microbiol. **48**:507-521.
 29. **Haack, K. R., C. L. Robinson, K. J. Miller, J. W. Fowlkes, and J. L. Mellies.** 2003. Interaction of Ler at the *LEE5 (tir)* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **71**:384-392.
 30. **Hayward, R. D., J. M. Leong, V. Koronakis, and K. G. Campellone.** 2006. Exploiting pathogenic *Escherichia coli* to model transmembrane receptor signalling. Nat. Rev. Microbiol. **4**:358-370.
 31. **Hecht, G.** 2001. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions. VII. Enteropathogenic *Escherichia coli*: physiological alterations

- from an extracellular position. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **281**:G1-7.
32. **Iyoda, S., and H. Watanabe.** 2004. Positive effects of multiple *pch* genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HEp-2 cells. *Microbiology* **150**:2357-2571.
 33. **Iyoda, S., and H. Watanabe.** 2005. ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**:4086-4094.
 34. **Kenny, B.** 2002. Mechanism of action of EPEC type III effector molecules. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**:469-477.
 35. **Laaberki, M. H., N. Janabi, E. Oswald, and F. Repoila.** 2006. Concert of regulators to switch on LEE expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: Interplay between Ler, GrlA, HNS and RpoS. *Int. J. Med. Microbiol.* In Press.
 36. **Lara-Ochoa, C.** 2004. Mutantes del Activador Transcripcional PerA que Alteran la Expresión de los genes *bfp* en *Escherichia coli* enteropatógena. Tesis de Maestría. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Puebla, Puebla.
 37. **Levine, M. M., Bergquist, E.J., Nalin, D.R., Waterman, D.H., and R. B. Hornick, Young, C.R., and Sotman, S.** 1978. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* **1**:1119-1122.
 38. **Lio, J. C., and W. J. Syu.** 2004. Identification of a negative regulator for the pathogenicity island of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biomed. Sci.* **11**:855-863.
 39. **Mayer, M. P.** 1995. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**:41-46.
 40. **Mellies, J. L., S. J. Elliott, V. Sperandio, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper.** 1999. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol. Microbiol.* **33**:296-306.
 41. **Miranda-Ríos, J., M. Navarro, and M. Soberón.** 2001. A conserved RNA structure (*thi* box) is involved in regulation of thiamin biosynthetic gene expression in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**:9736-9741.

42. **Nataro, J. P., and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. **11**:142-201.
43. **Olivares-Zavaleta, N., R. Jauregui, and E. Merino.** 2006. Genome analysis of *Escherichia coli* promoter sequences evidences that DNA static curvature plays a more important role in gene transcription than has previously been anticipated. Genomics **87**:329-337.
44. **Perna, N. T., G. F. Mayhew, G. Posfai, S. Elliott, M. S. Donnenberg, J. B. Kaper, and F. R. Blattner.** 1998. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Infect. Immun. **66**:3810-3817.
45. **Porter, M. E., P. Mitchell, A. Free, D. G. Smith, and D. L. Gally.** 2005. The *LEE1* promoters from both enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* can be activated by PerC-Like proteins from either organism. J. Bacteriol. **187**:458-472.
46. **Porter, M. E., P. Mitchell, A. J. Roe, A. Free, D. G. Smith, and D. L. Gally.** 2004. Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, PerA from enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **54**:1117-1133.
47. **Romeo, T.** 1998. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. Mol. Microbiol. **29**:1321-1330.
48. **Rosenshine, I., S. Ruschkowski, M. Stein, D. J. Reinscheid, S. D. Mills, and B. B. Finlay.** 1996. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. Embo. J. **15**:2613-2624.
49. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press., Cold Spring Harbor, NY.
50. **Sanchez-SanMartin, C., V. H. Bustamante, E. Calva, and J. L. Puente.** 2001. Transcriptional regulation of the *orf19* gene and the *tir-cesT-eae* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **183**:2823-2833.
51. **Schauer, D. B., and S. Falkow.** 1993. Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. Infect. Immun. **61**:2486-2492.
52. **Shah, I. M., and R. E. Wolf, Jr.** 2004. Novel protein--protein interaction between *Escherichia coli* SoxS and the DNA binding determinant of the RNA polymerase alpha subunit: SoxS functions as a co-sigma factor and redeploys

- RNA polymerase from UP-element-containing promoters to SoxS-dependent promoters during oxidative stress. *J. Mol. Biol.* **343**:513-532.
53. **Sharma, V. K., and R. L. Zuerner.** 2004. Role of hha and ler in transcriptional regulation of the *esp* operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* **186**:7290-7301.
 54. **Sircili, M. P., M. Walters, L. R. Trabulsi, and V. Sperandio.** 2004. Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. *Infect. Immun.* **72**:2329-2337.
 55. **Tu, X., I. Nisan, C. Yona, E. Hanski, and I. Rosenshine.** 2003. EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **47**:595-606.
 56. **Umanski, T., I. Rosenshine, and D. Friedberg.** 2002. Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**:2735-2744.
 57. **Venkova-Canova, T., N. E. Soberón, M. A. Ramírez-Romero, and M. A. Cevallos.** 2004. Two discrete elements are required for the replication of a *repABC* plasmid: an antisense RNA and a stem-loop structure. *Mol. Microbiol.* **54**:1431-1444.
 58. **Villalba-Velázquez, M. I.** 2006. Estudio sobre el papel de PerC y GrlA en la regulación del gen ler de *Escherichia coli* enteropatógena. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos.
 59. **Wales, A. D., M. J. Woodward, and G. R. Pearson.** 2005. Attaching-effacing Bacteria in Animals. *J. Comp. Pathol.* **132**:1-26.
 60. **Yu, R. R., and V. J. DiRita.** 2002. Regulation of gene expression in *Vibrio cholerae* by ToxT involves both antirepression and RNA polymerase stimulation. *Mol. Microbiol.* **43**:119-134.
 61. **Zhang, A., S. Rimsky, M. E. Reaban, H. Buc, and M. Belfort.** 1996. *Escherichia coli* protein analogs StpA and H-NS: regulatory loops, similar and disparate effects on nucleic acid dynamics. *Embo. J.* **15**:1340-1349.