



---

---

Análisis sobre la regulación del gen *rorf 3* en  
*Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

Tesis

Que para obtener el título de Biólogo presenta:

Ulises Alfredo Ruíz Díaz.

Director de Tesis: Dr. José Luíz Puente García

México. D.F. 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.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio del Dr. José Luis Puente García del Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca Morelos, México.

Este trabajo fue asesorado por el Comité Tutorial:

Dr. José Luis Puente García

Dr. Victor Humberto Bustamante Santillán

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

M en BB. Claudia Andrea Segal Kischinovsky

Dra. Laura Kawasaki Watanabe

Durante el desarrollo de este trabajo el autor fué becario del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, y del programa de Becas para la elaboración de Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación (Probetel).

## AGRADECIMIENTOS

A todos los miembros del tres veces H. Lab. **Puente/Calva**, empezando por José Luis, Edmundo, Pancho, Richard, Rosalviux, Juan, Toño, Carmen, Miguel Angel, Victor A., Bety, Juan, Tomas, Marcos, Diana,, Amapola , Paty, Elvira, especialmente a Victor B y Jenny por la discusión de mis resultados y a Mario por la ayuda del primer extension, a las H24: Karol, Alma, Vero, Cristina, Myryam, Oli, Ale y muy pero muy especialmente a la chica que me enredó en la telaraña de sueños mágicos.....**LAURA**, J.B y yo te lo agradecemos .

A los miembros del mejor equipo de fucho que haya existido en el IBT el heróico Atlético Chamilpa y a toda la comunidad del IBT y especialmente a la comunidad del miércoles.

A las instituciones, a mis mentores y a mis amigos que me formaron o que me malformaron, **Colegio Valle del Tepeyac** (Miss Mayra Meche,Laurita Saúl Beto y Atilio) **Colegio Francés Hidalgo** (El Nene JC, al Massé, Rey, tzin tzun el ojos, chango, conchas, especialmente a mi maestro de biología, quien fué un detonador para estudiar esta carrera, a la UNAM, **C.C.H Vallejo** (el tripa,el chivo, el capu, colin) la gloriosa **FACUTAD DE CIENCIAS** por sus maestros viajes -as de prácticas y a todos mis amigos, don salud, Vanesa, Fernanda, Moco chivon, kim, susexy, Norma Erika, Aixel, Eva, Sandra, Emeline, Lisa, Löic, Márgaro, Márgara, Francesca, Sabrina, a la Familia Hernandez Reyes, Vania (fania) ,Nelly (Laslo Leslie), NATALIA (Natty Dretty). Al juebebes: Anibal y Rodri Medel,Tops, mi maestra de alemán Volke, Alya, Karlita, Carli Desecho, lolly, Silvia, Eric Rico, Florian, Marielita, STB, tapir, Beto Millares, Corpse, Ranilla.

A la familia Camacho Rico: Sra. Lilia gracias por los desayunos las pláticas, la jardinería y la humilde morada, Andreita (la Dama del Bolsazo), a don Manuel por ponerme las alas del avión, no se desespere que si le voy a pagar.

**Mención especial** a los miembros del honorable Consejo Interno por las discusiones: **Patillas, Andrés el Chaparrito** gracias por la revisión, **Sandra la Dama de los Mares**, y al que deja ir vivas a las palomas el **Fegnandiii**,..... por las ballenas, gansitos con hersheys, coronas, grimbergen, moretti, camiones, camionetas, vitrolas, aviones, caguasakis, motos barcos, mochilas, hosteles, casas de campaña, camaras.... **nunca, pero nunca, un paso adelante del otro.**

Al miércoles de Freddy: Alfre, Sata, Hunab-Ku, Bombilly,

A todos los Ruíz especialmente a mi abue Maura que se nos adelantó, a mi abuelo Alfredo que nunca conocí, a mi abue Virginia, a mi tío Lalo , Ringo y a todos los Díaz especialmente a mis Padrinos Angel (**QPD**) y Alicia, Carlos, Arturo, Julio, Diego, Ulises, Brian y a mis tías Ro, Ofe, Licha y Chayo por el apoyo en los momentos difíciles.

**CASAdE BRUJOS Juan Maquez Alfre Gúicho Baul Moria Ray Brael....nuncadejendecreerenlo increíble..... yonodejodecreerenustedes.....lomejorestáporvenir.**

Todas las personas arriba mencionadas me han enseñado algo pero existe una persona que no he mencionado que me enseñó un sexto sentido **GRACIAS**  
LA-U-RA<sup>2</sup>.

## Dedicatoria

Dedico esta tesis con todo respeto y admiración a la familia **Ruíz Díaz** : Jefe ahora sé lo difícil que es la vida gracias por estar conmigo en mente y cuerpo, espero nunca defraudarte y por favor nunca dejes de soñar. Jefa, gracias por ser mi Angel guardián, ahora los desvelos encontraron la meta, gracias por el cariño y aguante, Papás ustedes me enseñaron a conocer el mundo, cuando estuvimos en Xe-Kxel, hace 21 años en la noche más estrellada que he visto en mi vida viendo a las tortugas desovar empecé a ver hacia donde iba, hoy empiezo a llegar y estoy viendo cristalizado uno de mis sueños... ser **BIOLOGO** gracias enseñarme a perseguir mis sueños. Toto y Ku-Ku gracias por estar ahí todos estos años y por estar en uno de los pasos mas importantes en mi vida... recuerden que es precisamente la posibilidad de realizar un sueño lo que torna la vida interesante.

El orden de los Factores "**NO ALTERA**" el **pr oduct o**, **ot cudor p le** "**ARETLA ON**" \_serotcaf sol ed Nedro IE

El orden "**no altera** el **pr oduct o** de los Factore**S**.

el de los El factores **pr oduct o** no **orden altera**

El "**a b o r d e n**" de **l O S** factores <sup>altera</sup> el **pr oduct o**.

El orden **ALTERA EL** factor **pr oduct o**.

(*mi maestro de mate et al 199?*) elTi

## INDICE

<b>Introducción.....</b>	<b>9</b>
<b>Hipótesis y objetivos.....</b>	<b>26</b>
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>28</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>40</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>52</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>59</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Primera etapa de la infección de EPEC.

Figura 2. Segunda etapa de la infección de EPEC.

Figura 3. Tercera etapa de la infección de EPEC.

Figura 4. Modelo del desarrollo de la diarrea.

Figura 5. Modelo de regulación de los genes de virulencia de EPEC.

Figura 6. Alineamiento de la proteína Rorf3.

Figura 7. Esquema de fusiones transcripcionales *rorf3-cat*.

Figura 8. Análisis de la expresión de las fusiones de *rorf3-cat* a diferentes densidades ópticas en medio DME.

Figura 9. Mapeo del transcrito y análisis de la región reguladora de *rorf3*.

Figura 10. Expresión de las fusiones *rorf3-cat* en las cepas  $\Delta ler$ ,  $\Delta hns$  y  $\Delta grlA$  de EPEC.

Figura 11. Expresión de las fusiones *rorf3-cat* en medio de cultivo DME y LB.

Figura 12. Alineamiento de la región reguladora de *rorf3* de EPEC, EHEC y *Citrobacter rodentium*

Figura 13. Modelo de Regulación de *rorf3*

Tabla 1. Características de *E. coli* patógenas.

Tabla 2. Cepas.

Tabla 3. Plásmidos.

Tabla 4. Oligonucleótidos.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A.A</b>	Aminoácidos.
<b>AE</b>	Adherencia y eliminación de microvellosidades (“ <b>A</b> ttaching and <b>E</b> ffacing”) por sus siglas en inglés.
<b>Amp</b>	Ampicilina.
<b>BFP</b>	Pilus formador de “mechones” (“ <b>B</b> undle- <b>F</b> orming <b>P</b> ilus”) por sus siglas en inglés.
<b>CAT</b>	Enzima <b>C</b> loranfenicol <b>A</b> cetil <b>T</b> ransferasa.
<b>Cm</b>	Cloranfenicol.
<b>DME</b>	Méδιο para células eucariontes (“ <b>D</b> ulbecco’s <b>M</b> odified <b>E</b> agle <b>M</b> edium”) por sus siglas en inglés.
<b>DNA</b>	Acido Desoxirribonucleico, (“ <b>D</b> esoxiribonucleic <b>A</b> cid”) por sus siglas en inglés.
<b>D.O.</b>	<b>D</b> ensidad <b>ó</b> ptica.
<b>DTNB</b>	Ditio-bis (2-ácido nitrobenzóico).
<b>DTT</b>	Ditiotreitol.
<b>EAF</b>	Factor de adherencia de EPEC (“ <b>E</b> PEC <b>A</b> dherence <b>F</b> actor”) por sus siglas en inglés.
<b>EHEC</b>	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica.
<b>EPEC</b>	<i>E. coli</i> enteropatógena.
<b>ETOH</b>	Etanol
<b>Esp</b>	Proteína secretada de <i>E.coli</i> (“ <b>E</b> . <b>c</b> oli <b>S</b> ecreted <b>P</b> rotein”) por sus siglas en inglés.
<i>et al.</i>	otros colaboradores
<b>H-NS</b>	Proteína estructuradora del nucleóide bacteriano (“ <b>H</b> istone-like <b>N</b> ucleoid- <b>S</b> tructuring Protein”) por sus siglas en inglés.
<b>IHF</b>	Factor de integración al cromosoma (“ <b>I</b> ntegration <b>H</b> ost <b>F</b> actor”) por sus siglas en inglés.
<b>LA</b>	<b>A</b> dherencia <b>L</b> ocalizada (“ <b>L</b> ocalized <b>A</b> dherence”) por sus siglas en inglés.
<b>LB</b>	Medio de cultivo <b>L</b> uria <b>B</b> ertani
<b>LEE</b>	<b>L</b> ocus <b>E</b> liminador de <b>E</b> nterocitos (Locus of Enterocyte Effacement) por sus siglas en inglés.
<b>ml.</b>	Mililitros
<b>µl.</b>	microlitros.
<b>nm.</b>	Nanómetros.
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa (“ <b>P</b> olymerase <b>C</b> hain <b>R</b> eaction”) por sus siglas en inglés.
<b>RBCs</b>	Eritrocitos ( <b>R</b> ed <b>B</b> lood <b>C</b> ells) por sus siglas en inglés.
<b>RNA</b>	Acido Ribonucleico (“ <b>R</b> ibonucleic <b>A</b> cid”) por sus siglas en inglés.
<b>pg.</b>	Picogramos.
<b>TTSS</b>	<b>S</b> istema de <b>S</b> ecreción <b>T</b> ipo <b>T</b> res. (“ <b>T</b> ype <b>T</b> hree <b>S</b> ecretion <b>S</b> ystem”) por sus siglas en inglés.





## Resumen

Dentro de la familia de bacterias patógenas diarreogénicas que producen lesión de adherencia y destrucción (AE), se encuentra *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC). Esta es una bacteria Gram-negativa que infecta a niños menores de dos años, principalmente en países en vías de desarrollo. Los genes involucrados en la formación de esta lesión se encuentran en la isla de patogenicidad LEE, (“Locus of Enterocyte Effacement”), organizados en al menos 5 operones. El LEE de EPEC, EHEC y *C. rodentium* muestra una elevada similitud a lo largo de toda la secuencia. Dentro de la región LEE, se localiza el gen *rorf3*, orientado divergentemente con respecto al operón compuesto por los genes *grlR* y *grlA*. Dichos genes se encuentran ubicados entre los operones *LEE1* y *LEE2*, y contienen principalmente genes que codifican para componentes del sistema de secreción tipo III. A pesar de que no se sabe la función del producto de *rorf3*, éste es importante para la secreción de distintos efectores. En el presente trabajo se reporta el inicio de transcripción de *rorf3*, así como el análisis de la expresión de las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* en distintas cepas mutantes en reguladores transcripcionales y la evaluación en distintos medios de cultivo. Considerando los resultados que arroja este trabajo, podemos concluir que el medio de cultivo LB no tiene un efecto represor en la expresión de *rorf3*, como sucede para otros genes del LEE, y que la regulación de la expresión de *rorf3* involucra elementos en *trans* como Ler, H-NS y GrlA.

## INTRODUCCION

*Escherichia coli* es una bacteria móvil Gram-negativa, que mide de 2 a 3  $\mu\text{m}$  de longitud, de apariencia cilíndrica y que tan sólo pesa aproximadamente 1 pg (Farmer *et al.*,1991; Howard *et al.*, 1999)

La molécula de DNA que constituye el cromosoma de la cepa K12 de *E. coli* es aproximadamente 700 veces más grande que la misma bacteria, consta de 4,639,221 pares de bases que constituyen aproximadamente 4,400 genes (Hinton *et al.*,1997). Esta bacteria tiene como hábitat natural el tracto gastrointestinal de animales de sangre caliente, encontrándose generalmente en la microbiota intestinal de los humanos, en donde puede replicarse en tan solo 20 minutos. Si cultivamos una sola célula con suficientes nutrientes, en 24 horas tendríamos  $7 \times 10^{21}$  células, con una tasa de mutación espontánea de  $10^{-7}$  por generación (Howard *et al.*, 1999). Por otro lado, si consideramos los eventos de transferencia horizontal entre las bacterias, nos llevaría a pensar que el flujo de pérdida y ganancia de material genético da como resultado una amplia gama de variedades genéticas, dentro de las cuales algunas pueden ser patógenas en diversos mamíferos, incluyendo al hombre.

Las cepas de *E. coli* que causan enfermedades gastrointestinales se pueden clasificar en al menos seis distintas categorías dependiendo de los mecanismos de patogenicidad que presentan, y son:

*E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

*E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

*E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

*E. coli* enteropatógena (EPEC)

*E. coli* enteroagregativa (EAEC)

*E. coli* difusoadherente (DAEC)

Algunas de las características de estas cepas se mencionan en la tabla 1.

## **EPEC**

Hace ya más de 50 años que Bray *et al.* (1945) identificaron una cepa de *E. coli* que ocasionaba serios problemas de salud pública en niños debido a la diarrea que ésta provocaba. Unos años más tarde, Neter *et al.* (1955) nombraron a esta cepa *E. coli* enteropatógena (EPEC). Como resultado de los estudios realizados en los años siguientes, se llegó a la conclusión de que los mecanismos de virulencia de esta bacteria no eran atribuibles a enterotoxinas, sino a otro mecanismo desconocido (Levine *et al.*, 1978).

Las cepas de EPEC están asociadas a mortalidad en niños menores de dos años de edad en países en vías de desarrollo, debido a la diarrea acuosa, vómito y fiebre que provocan. En algunos reportes el índice de mortalidad por brotes de EPEC llega a ser de 30%.

Sin embargo, también existen brotes epidémicos en países como Estados Unidos y el Reino Unido, sobre todo en guarderías y en hospitales pediátricos (Finlay *et al.* 2000). A principio de los años 90`s, EPEC fue la causa principal de diarrea en niños en lugares como Sao Paulo (Brasil), y en Johannesburgo (Sudáfrica), incluso por encima de la diarrea causada por rotavirus (Donnenberg *et al.*, 1992). Aún se desconocen los mecanismos específicos de virulencia por los cuales EPEC origina la diarrea, sin embargo, en los últimos años varios grupos de investigación se han dado a la tarea de investigar a fondo los mecanismos de virulencia de este intrigante microorganismo.

### **MECANISMOS DE PATOGENICIDAD DE EPEC**

Gracias al amplio estudio que se ha realizado de la interacción de EPEC con células epiteliales, se han identificado tres etapas en las cuales EPEC infecta a la célula hospedante y éstas son: **adherencia localizada (AL)**, **transducción de señales** y **adherencia íntima (AE)**. Asimismo, se han identificado algunos genes cromosómicos y plasmídicos involucrados en estas lesiones.

### **ADHERENCIA LOCALIZADA**

El término adherencia localizada (**Fig.1**) se refiere al establecimiento de microcolonias bacterianas en unión no íntima con la célula hospedante. Se sabe que la adherencia de las bacterias es un paso fundamental en la localización de un nicho apropiado para su sobrevivencia y que usualmente es mediada por algún tipo de fimbria (Edwards y Puente,1998) (**Fig.1**).

**Tabla 1. Características principales de las distintas cepas patógenas de *E. coli* patógenas**

<b>CEPAS</b>	<b>SINTOMAS CLINICOS</b>	<b>EPIDEMIOLOGIA</b>	<b>FACTORES DE VIRULENCIA</b>	<b>INTERACCIÓN CON ENTEROCITOS</b>
<b>ETEC</b>	Diarrea acuosa aguda.	Niños menores de dos años y turistas (diarrea del viajero). La diarrea es parecida a la producida por el cólera.	ST ("heat-stable toxin") y LT ("heat-labile toxin"), CFA ("colonization factors").	Adherencia por medio de fimbrias sin cambios morfológicos en el intestino distal.
<b>EHEC</b>	Diarrea con sangre, fiebre, vómito, dolor abdominal. Síndrome urémico hemolítico. Colitis hemorrágica.	Niños y adultos que la adquieren por comer carne cruda o mal cocida.	STX ("Shiga toxin"), AE (Attaching and effacement), Intimina, pO157, enterohemolisina	Adherencia individual o en grupo lesión AE, no invasiva.
<b>EIEC</b>	Diarrea con moco y sangre o acuosa, también se presenta cuadro disentérico.	Usualmente adultos.	Invasividad debido a un plásmido de 140 MDa. Sistema de secreción tipo III. Destrucción de células.	Invasión en células de colon, multiplicación interna, eventualmente muerte celular. Patrón invasivo transepitelial.
<b>EPEC</b>	Diarrea aguda, dolor abdominal, vómito y baja fiebre.	Casos esporádicos en países desarrollados, principalmente niños menores de 2 años en países en vías de desarrollo.	AE, BFP ("Bundle forming pilus"), plásmido EAF, intimina, Tir.	Adherencia localizada en intestino proximal; lesión AE.
<b>EAEC</b>	Diarrea líquida de color verde con moco sin sangre, persistente hasta 20 días.	Recién nacidos y niños menores de 2 años.	Adhesinas, (AAF) Toxinas, (EAST-1, Pet, Pic), hemolisina.	Patrón de adherencia agregativa.
<b>DAEC</b>	Diarrea acuosa sin sangre.	Niños de 1 a 5 años en países desarrollados.	Fimbria F1845 y AIDA.	Patrón de adherencia difusa, incrustación bacteriana entre microvellosidades.

Hace poco más de diez años, Girón *et al.* (1991) reportaron una fimbria producida por EPEC, de aproximadamente 7 nm de diámetro, que estaba relacionada con la adherencia localizada. Esta fimbria tiene la particularidad de agregarse en “mechones” y de ahí su nombre en inglés, BFP (“Bundle-forming pilus”). Se postula que esta fimbria utiliza como receptor a la fosfatidiletanolamina de la membrana celular de la célula hospedera (Barnett-Foster *et al.* 1999; Khursigara *et al.*, 2001).

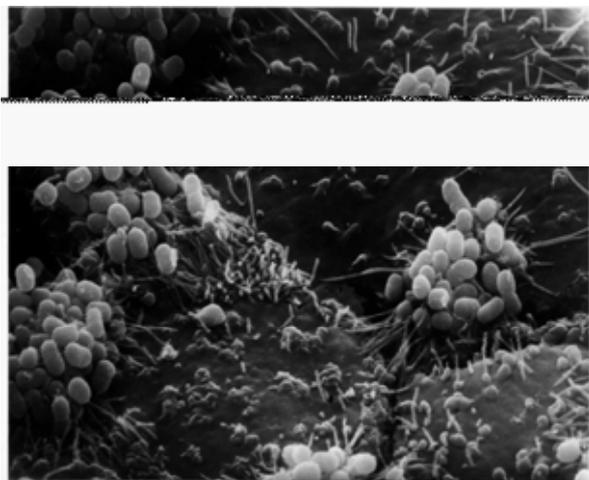
BFP es un pilus tipo IV que es sintetizado a partir de los productos de 14 genes arreglados de forma continua y localizados en un plásmido de alto peso molecular (50 a 60 MDa) conocido como EAF (“*E. coli* **A**dherence **F**actor”) (Fig.2).

Los pili tipo IV se caracterizan por medir aproximadamente 6 nm de diámetro y se extienden desde los polos bacterianos, haciendo movimientos tipo “twitching” que llegan a alcanzar velocidades de algunas decenas de micrómetros por segundo. Estos pilus se requieren para la formación de biofilms y en el movimiento coordinado de tipo “social”, permitiendo la agrupación bacteriana para expandirse en la superficie durante la infección (Skerker *et al.*, 2001).

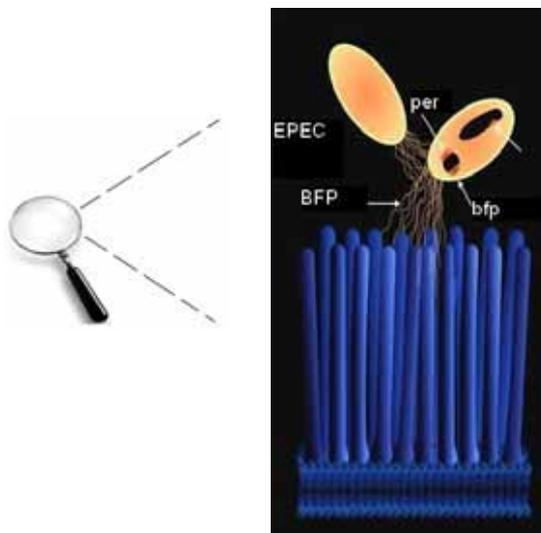
La expresión de *bfpA*, el primer gen del locus BFP, requiere de la expresión de PerA, una proteína que tiene 32% de similitud promedio en su extremo carboxilo terminal con los reguladores transcripcionales de la familia AraC/XylS. PerA es codificada por el primer gen del operón *perABC* localizado en el EAF (Gómez-Duarte *et al.*, 1995, Tobe *et al.*, 1996). Por otro lado, PerA activa su propio promotor y también es regulado por señales ambientales (Martínez-Laguna *et al.*, 1999).

Así mismo, *bfpA*, *perA* y los genes del LEE, incluyendo aquellos que codifican para los componentes del sistema de secreción tipo III (SSTT), para proteínas efectoras o para proteínas reguladoras como Ler, son inducidos *in vitro* cuando EPEC crece en medio de cultivo DMEM, durante la fase exponencial de crecimiento y a una temperatura de 37°C. En contraste, dichos genes son reprimidos por crecimiento en presencia de sales de amonio o a temperaturas por arriba o por abajo de 37°C, así como por crecimiento en medio de cultivo rico (LB) (Puente *et al.*, 1996, Bustamante *et al.*, 1998, Martínez Laguna *et al.*, 1999, Bustamante *et al.*, 2001).

A)



B)



**Fig. 1.** Adherencia Localizada. Esta es la característica principal de la primera etapa de infección por EPEC (AL). En esta etapa se observan agregados de microcolonias estabilizadas por BFP, una fimbria tipo IV, que es regulada por PerA. **A)** Micrografía de microcolonias interactuando con la célula hospedante. **B)** Esquema de la unión no íntima en la primera etapa que caracteriza la unión de EPEC con las células epiteliales.

Tomado y modificado de Finlay *et al.*, 2004

## TRANSDUCCION DE SEÑALES

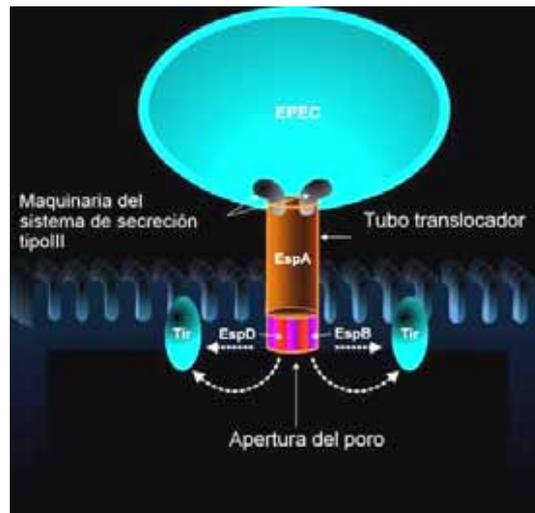
Una vez que se ha dado la adherencia localizada, en la segunda etapa (**Fig.2**) EPEC inyecta distintas proteínas a la célula huésped a través del SSTT. Estas proteínas efectoras ocasionan diferentes cambios en las vías de señalización de la célula hospedera, lo que lleva, entre otras cosas, a la destrucción de las microvellosidades de la célula epitelial, la reorganización de los filamentos de actina y a cambios drásticos de la arquitectura del citoesqueleto.

El LEE codifica para el SSTT que comprende las proteínas Esc, las cuales integran el aparato de secreción, las proteínas secretadas EspA, EspB y EspD, que forman el translocón, las proteínas efectoras EspH, EspF, EspG y Map, así como también, intimina y Tir (“**T**ranslocated **I**ntimin **R**eceptor”) que son necesarias para la adherencia íntima. Estos genes son importantes para la formación de la lesión A/E, ya que cualquier tipo de mutación en estos genes, a excepción de *espF*, *espG* y *espH*, la previene (Nataro y Kaper, 1998).

Los sistemas de secreción tipo III se encuentran principalmente en bacterias Gram-negativas patógenas de plantas y animales. Este es un mecanismo común que utilizan las bacterias para translocar proteínas específicas hacia la célula huésped y así modular o interferir procesos celulares (**Fig.2**) (Plano *et al.*, 2001).

Aunque algunas de las proteínas que pertenecen al translocón han sido identificadas, sus secuencias de aminoácidos entre distintas bacterias son poco conservadas, aunque las proteínas muestran similitudes estructurales como segmentos transmembranales y regiones de bobina (“coiled-coil”) (Büttner *et al.*, 2002).

El SSTT de EPEC, al igual que en otras bacterias, está compuesto por una estructura en forma de “jeringa y aguja”. La aguja está constituida principalmente por la proteína EscF en la base del translocón; dicha proteína muestra homología con las principales estructuras aciculares de los SSTT, y posee 25% de identidad con MxiH de *Shigella* sp y 24% de identidad con *Salmonella thyphimurium*, respectivamente (Clarke *et al.*, 2003). En experimentos realizados con mutantes en *escF* no hay inducción de la lesión AE y también se le ha asociado con la actividad hemolítica en presencia de eritrocitos (RBCs), ya que la mutación en dicha proteína reduce dramáticamente esta actividad. La aguja del SSTT de EPEC es similar a una “vaina” y tiene un diámetro aproximado de 120 Å con un canal central de 25 Å de diámetro por el cual las proteínas secretadas son transportadas (Daniell *et al.*, 2003). Este puede llegar a medir más de 600 nm de longitud, 10 veces más larga a la utilizada por *Shigella* y semejando un puente entre la bacteria y la célula hospedante. Se ha identificado que dicha vaina consta principalmente de filamentos de la proteína EspA; una estructura que *Shigella* y *Salmonella* no poseen (Kachiko *et al.*, 2001). En cuanto a EspD, se sabe que se inserta en la membrana celular y actúa en la formación de poros membranales (Shaw *et al.*, 2001).



**Fig. 2.** Segunda etapa de la infección por EPEC. Durante esta etapa se lleva a cabo la translocación de proteínas efectoras, desde la bacteria hacia la célula hospedera, por medio del sistema de secreción tipo III. Algunas de estas proteínas alteran rutas de transducción de señales en la célula (EspB, EspH, Map, NleA, etc) o se requieren para la adhesión íntima (Tir). Tir, la cual es fosforilada en la célula e insertada en la membrana. Otras moléculas efectoras son: EspB, EspF, EspG, EspH, Map y NleA. Tomado y modificado de Vallance y Finlay 2000.

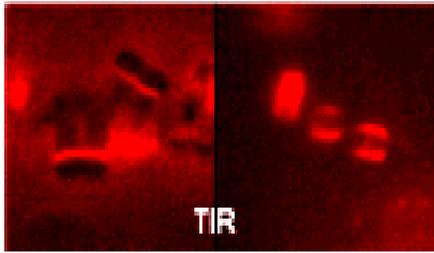
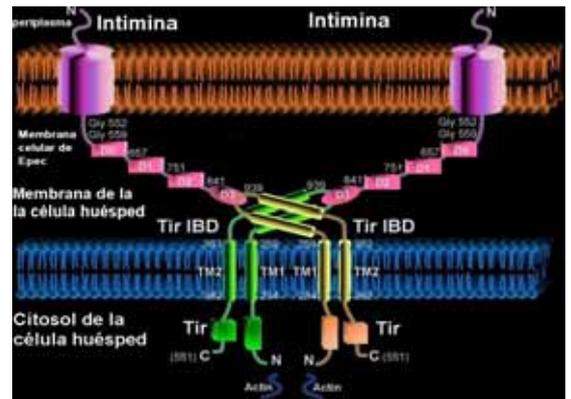
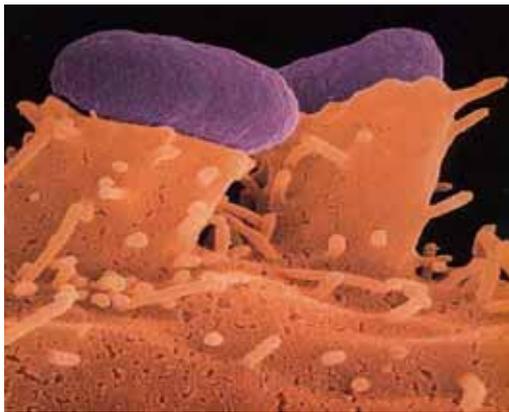
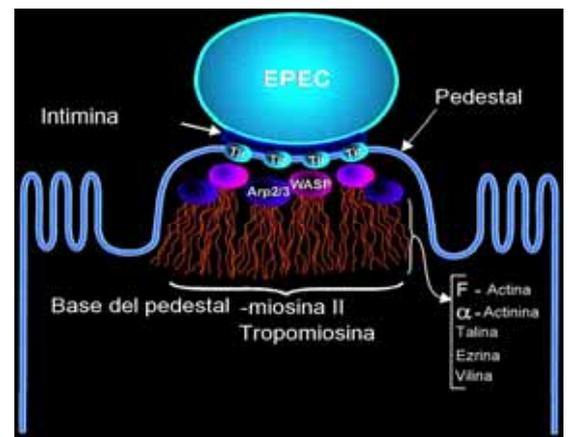
### ADHERENCIA INTIMA

En la tercer etapa (**Fig.3**) de la infección, se llevan a cabo distintos cambios estructurales y funcionales dentro de los cuales se da una unión íntima con la célula huésped y el rearrreglo del citoesqueleto, formándose una estructura de copa o pedestal justo por debajo del sitio de unión de la bacteria. Esta adhesión íntima es mediada por una proteína de membrana externa de 94 kDa llamada Intimina. Sin embargo, se ha propuesto que otros factores intervienen en la unión con las células huésped como las  $\beta$ -integrinas (Frankel *et al.*, 1996).

Otra de las proteínas que es translocada al interior de la célula huésped es Tir (Kenny *et al.*, 1997). *tir* está codificada en el operón *LEE5* junto con *cesT* que codifica para una chaperona que necesita para que sea translocada (Abe *et al.*, 1999; Sánchez-SanMartín *et al.*, 2001). Tir es fosforilada en residuos de tirosina, serina y treonina y actúa como receptor de la intimina que es una proteína de membrana externa codificada por el tercer gen (*eae*) del mismo operón. Se ha demostrado que el rearrreglo del citoesqueleto de la célula huésped es mediado por Tir a través del reclutamiento de proteínas adaptadoras, tales como Nck1 y Nck2, que reclutan a su vez a N-WASP, la cual interactúa con el complejo Arp2/3 que nuclea actina (Campellone *et al.*, 2002; Gruenheid *et al.*, 2001; Kalman *et al.*, 1999).

También se sabe por estudios de inmunofluorescencia que debajo de la bacteria se agregan filamentos de F-actina,  $\alpha$ -actinina, talina, ezrina y vilina, encontrándose también miosina II y tropomiosina en la base del pedestal (Gruenheid *et al.*, 2001).

.

**A****B****C****D**

**Fig.3.** Adherencia íntima; esta etapa se caracteriza por la interacción de la Intimina con Tir, dando lugar a la reorganización de actina formando así la estructura de copa o pedestal.

**A)** Formación del pedestal vista en microscopio de fluorescencia. **B)** Modelo sugerido para la unión en forma de bisagra de Tir con intimina. Tomado y modificado de Sanger *et al.*, 1996. **C)** Vista en microscopio electrónico de barrido de la formación del pedestal mediado por la interacción de Tir con la Intimina.

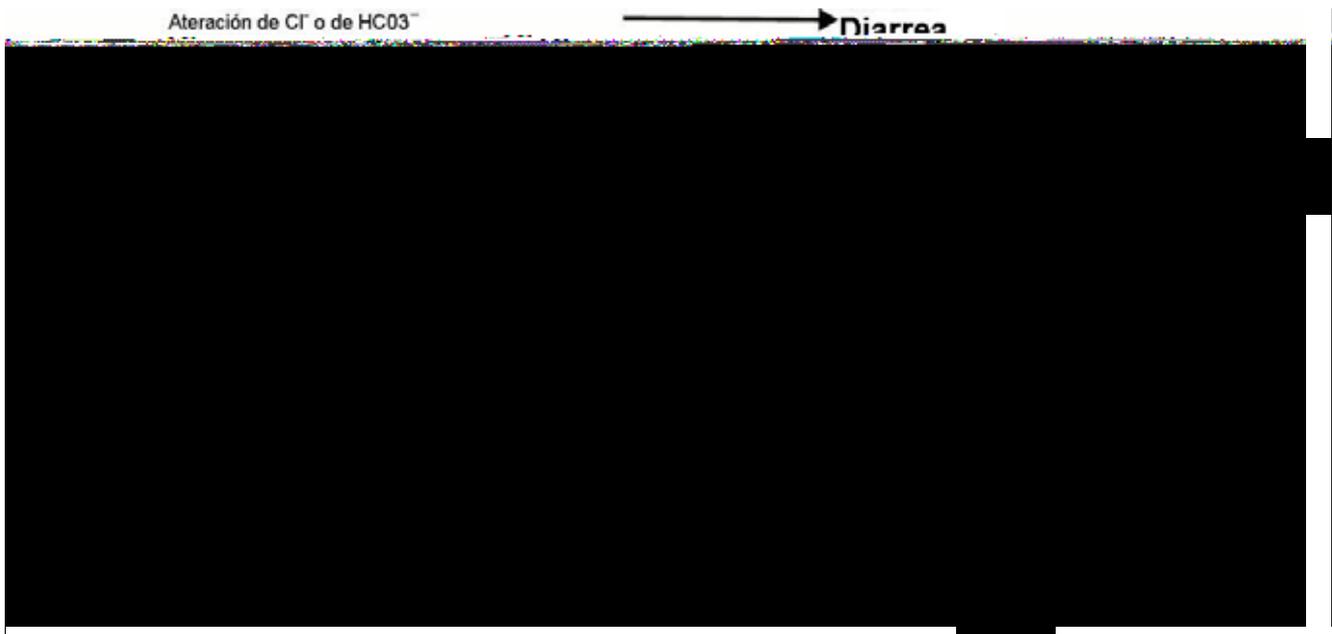
**D)** Modelo a detalle de la formación del pedestal en la cual se ve el reclutamiento de distintas proteínas del citoesqueleto. Tomado y modificado de Finlay *et al.*, 2004

### **Distintos mecanismos asociados a la diarrea producida por EPEC**

Aunado a esto, EPEC modula otros procesos celulares tales como la resistencia transepitelial y la permeabilidad de las uniones estrechas como consecuencia de la fosforilación de la cadena ligera de miosina y ezrina (proteínas involucradas en la regulación de la permeabilidad de las uniones estrechas) **(Fig.4)** Por otro lado, la ocludina es desfosforilada causando la disociación de las uniones estrechas. Se cree que estos efectos actúan sinérgicamente en la estabilidad de las uniones estrechas lo que conlleva a un incremento en la permeabilidad epitelial (Vallance *et al.*, 2000). La enzima PI3K (fosfatidilinositol 3-cinasa) es afectada, evitando la fagocitosis de EPEC. También se ven afectados el flujo intracelular de  $Ca^{2+}$  y la secreción de iones, aunque los efectores no hayan sido aún identificados (Nataro *et al.*, 1998).

Aunque la contribución de la lesión A/E a la diarrea aún no está bien definida, se sabe que la adherencia de EPEC a una monocapa polarizada de células epiteliales resulta en una disminución en la resistencia eléctrica transepitelial, con lo que se incrementa la permeabilidad epitelial (Spitz *et al.*, 1995).

Stein *et al.* (1996) han sugerido que la señalización de EPEC modifica la entrada y la salida de iones a través de la membrana, por lo que la secreción de cloro podría explicar la diarrea temprana. Además, la pérdida de microvellosidades en células epiteliales lleva a la disminución en la absorción, a lo cual podría también atribuirse la generación de diarrea (Nataro *et al.*, 1998). Como se ha visto, al parecer existen varios eventos por los cuales EPEC podría causar diarrea; sin embargo, se requieren más investigaciones para tener un esquema más claro.



**Fig. 4.** Modelo propuesto para el desarrollo de diarrea debido a diversos mecanismos. Posibles causas para el desarrollo de la diarrea son la pérdida de absorción por la eliminación de microvellosidades, decremento en la resistencia eléctrica, secreción de iones y daño en la integridad en las uniones estrechas.

### **Isla de patogenicidad LEE**

La región LEE de EPEC (E2348/69) se localiza en el minuto 82 del cromosoma con respecto al genoma de *E. coli* K12, interrumpiendo el gen del tRNA de selenocysteina (*selC*) (McDaniel *et al.*, 1995) (**Fig.5**). Esta isla es suficiente para que una cepa de *E. coli* K12 induzca la lesión, lo que sugiere que dicha isla contiene todos los elementos necesarios involucrados en este fenómeno (McDaniel *et al.*, 1997).

De manera interesante, *SelC* también es un sitio donde está insertado el retrofago fR73 y una isla de patogenicidad (PAI) de 70 kpb en *E. coli* uropatógena, indicando que este sitio es un “hot spot” para la inserción de genes de virulencia (Nataro y Kaper 1998).

La isla de patogenicidad consta de 35,624 pb con un contenido de G+C promedio de 38.36 %, que contrasta con el 50.8 % del cromosoma de *E. coli* (Blattner *et al.*, 1997), lo que indica que fue adquirida por transferencia horizontal (Nataro *et al.*, 1998).

El LEE contiene 41 genes arreglados en por lo menos 5 operones principales denominados *LEE1*, *LEE2*, *LEE3*, *LEE4*, y *LEE5*, que son regulados negativamente por H-NS y GrIR, y positivamente por GrIA y Ler, exceptuando el operón *LEE1* (ver más adelante).

Dentro de las proteínas reguladoras se encuentra H-NS que pertenece a un grupo de proteínas que se asocian con el DNA y tienen un papel importante en la organización del cromosoma de la bacteria (Dersch *et al.*, 1993). H-NS es un polipéptido que consta de 137 aminoácidos y puede unirse a RNA y DNA linear o de doble cadena, mostrando mayor afinidad por segmentos curvos de DNA de doble cadena ricos en A-T (Falconi *et al.*, 1988). La unión de H-NS al DNA provoca cambios en el enrollamiento, el empaquetamiento y expresión genética (Elliott *et al.*, 2000). H-NS tiene homología con StpA, que también está presente en *E. coli*, BpH3 de *Bordetella pertusis* y otras proteínas como XrvA, HrvA, SPB, (Goyard and Bertin 1997; Tendeng y Bertin 2003).

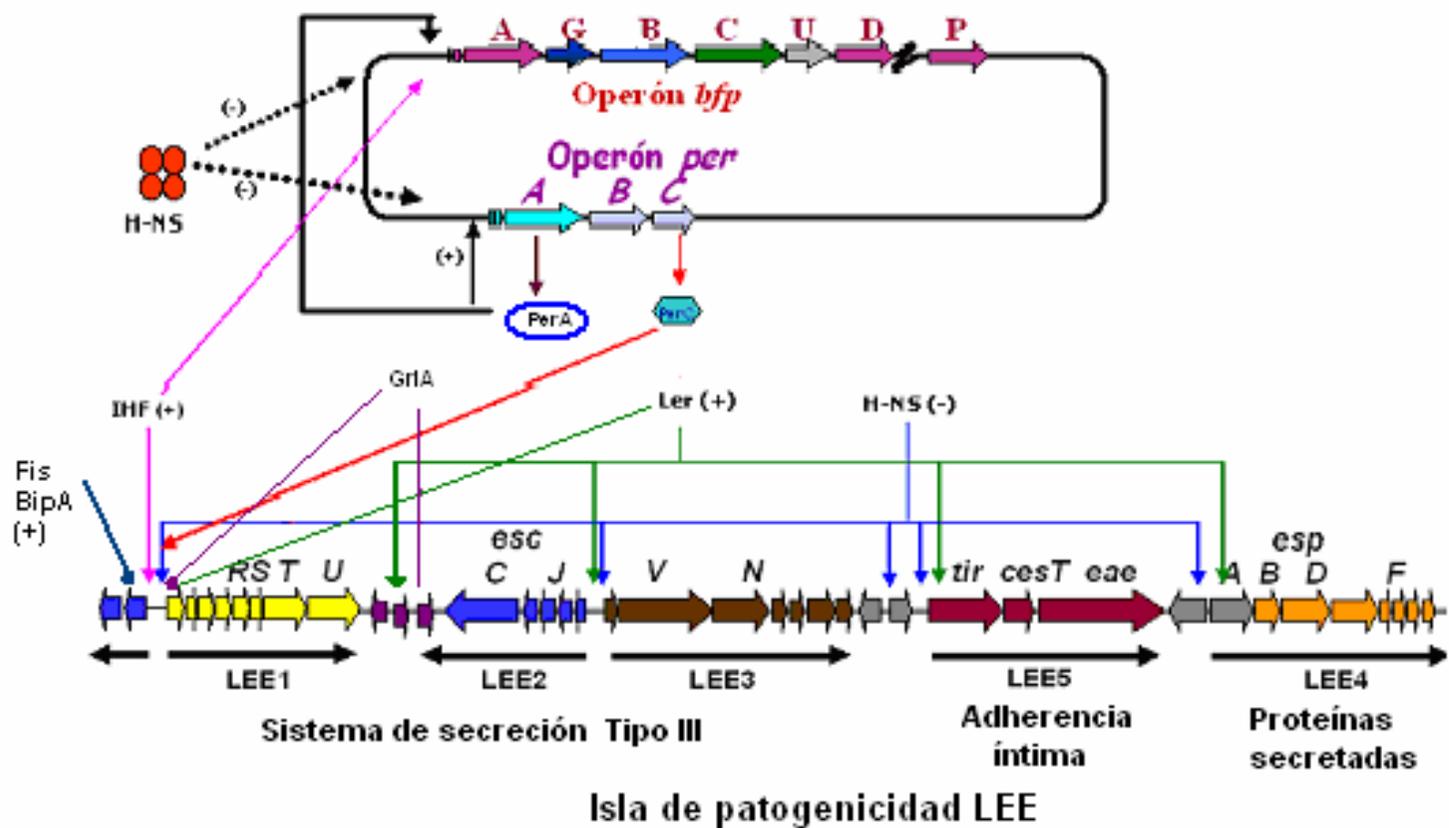


Fig.5

**Fig. 5.** Modelo de la regulación de los genes de virulencia de la isla LEE en EPEC. La organización del plásmido de alto peso molecular EAF se muestra en la parte superior de la figura. Este plásmido contiene los operones *bfp* y *per* que son reprimidos por H-NS a temperaturas bajas. En condiciones de inducción, PerA activa la expresión de su propio promotor y también activa el operón *bfp*. La activación de *per* permite también la expresión del producto del gen *perC*, el cual está involucrado en la regulación positiva del operón *LEE1*. El primer gen de este operón codifica para la proteína Ler, la cual regula positivamente al resto de los promotores del LEE, y su expresión también es controlada por reguladores globales como Fis, BipA e IHF o por el regulador específico GrIA, el cual también es codificado por el LEE. Los 41 marcos de lectura abiertos (*orf* por sus siglas en inglés “open reading frames”) del LEE están organizados en 5 operones policitrónicos (*LEE1-LEE5*), 2 operones bicitrónicos y cinco genes de los cuales el *LEE 1,2* y *3* están relacionados con el sistema de secreción tipo III, el operón *LEE5* está relacionado con la adherencia íntima y el operón *LEE4* está relacionado con el translocón y algunas proteínas secretadas. Estos operones también son reprimidos por H-NS y la función de Ler es eliminar dicha represión compitiendo, en parte, por los mismos sitios de unión a DNA que H-NS reconoce. También se sabe que estos factores de virulencia están regulados por señales fisicoquímicas y ambientales como la temperatura y la presencia de amonio o por el medio cultivo.

Otra de las proteínas importantes para la regulación de LEE es Ler (“LEE Encoded Regulator”), este es el producto del primer gen del operón *LEE1* y es regulado positivamente por PerC (Martínez Laguna *et al.*, 1999), y el heterodímero IHF (“Integration Host Factor”), el cual se une corriente arriba del promotor de *ler* (Friedberg *et al.*, 1999). IHF es una proteína involucrada en diferentes procesos celulares tales como la replicación, transcripción y empaquetamiento del DNA. Por otro lado, se ha propuesto que *ler* es regulado por “Quorum Sensing” o “detección grupal”, que se relaciona con la detección de la densidad bacteriana a través de sustancias parecidas a hormonas llamadas

autoinductoras y algunos nombres de estos compuestos utilizados por EPEC son, QseA, QseBC (Sperandio *et al.*, 2002, Sircili *et al.*, 2004).

Otras de las proteínas involucradas en la regulación positiva de Ler son Fis (factor for inversion stimulation), la cual está involucrada en la formación del nucleóide bacteriano (Goldberg, *et al.*, 2001), y GrlA (global regulator of LEE activator), la cual está altamente conservada entre los patógenos que forman la lesión A/E. Esta proteína pertenece al operón *grlRA* localizado entre el gen *rorf3* y el operón *LEE2*, dentro de la isla LEE, además se sabe que GrlA tiene un motivo hélice-vuelta-hélice característico de la unión a DNA en su dominio N terminal.

Como dato adicional, el homólogo de GrlA en *E. coli* (Caif), está involucrada en la inducción dependiente de carnitina de los operones *cai* y *fix* en condiciones anaeróbicas (Eichler *et al.*, 1996., Deng *et al.*, 2004).

En un alineamiento realizado por Sperandio *et al.* (1999) encontraron que existe cierta homología en el extremo carboxilo de Ler con el regulador global H-NS, sugiriendo que ambas proteínas podrían competir por el sitio de unión a DNA. Más tarde, Bustamante *et al.* (2001) propusieron que Ler más que actuar como activador, actúa como desrepressor aliviando la represión efectuada por H-NS.



## JUSTIFICACION

Un estudio sistemático sobre el papel que juegan los 41 genes del LEE en la virulencia de *C. rodentium* en ratones y en la formación de las lesiones A/E en células en cultivo, mostraron que el producto del gen *rorf3* es necesario para la virulencia de esta bacteria y para translocar proteínas efectoras dentro de la célula huésped (Deng *et al.*, 2004). Datos más recientes sugieren que Rorf3 comparte homología con muramidasa asociadas a otros SSTT y que su actividad hidrolítica sobre el peptidoglucano es crítica para el ensamblaje del SSTT (Deng *et al.*, 2005). El presente trabajo se desarrolló con el fin de conocer las condiciones y mecanismos que regulan la expresión de este importante gen que no forma parte de ninguno de los operones del LEE.

## HIPOTESIS

Si Ler regula positivamente la expresión de los genes que se encuentran dentro de la isla de patogenicidad LEE aliviando la represión que ejerce H-NS, entonces *rorf3* es regulado por un mecanismo similar.

## **OBJETIVO GENERAL**

- Estudiar los mecanismos moleculares que intervienen en la regulación de la expresión de los factores de virulencia en *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

## **OBJETIVO PARTICULAR**

- Estudiar la expresión y regulación transcripcional del gen *rorf3* de la isla de patogenicidad LEE de EPEC.

## **OBJETIVOS EXPERIMENTALES**

- Determinar el inicio de transcripción de *rorf3*.
- Construcción y caracterización de fusiones transcripcionales de *rorf3* al gen reportero *cat*.
- Determinar el nivel de expresión de las fusiones *rorf3-cat* en diferentes cepas mutantes de EPEC cultivadas en diferentes condiciones de crecimiento.

## MATERIALES Y METODOS

### Cepas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Las cepas y plásmidos utilizados en este trabajo se mencionan en la tabla 2 y 3, respectivamente. Los medios de cultivo usados fueron LB (Luria Bertani) y medio de cultivo para células eucariontes tipo DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”, Gibco BRL) suplementados con ampicilina (100 µg/ml), ácido nalidíxico (25 µg/ml) o estreptomina (100 µg/ml), según fuera el caso. Los cultivos bacterianos se crecieron a 37°C en tres condiciones diferentes, en baños con agitación a 200 RPM o estáticos con y sin 5% de CO<sub>2</sub>.

**Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo.**

Cepa o plásmido	Características	Origen
MC4100	Cepa derivada de <i>E. coli</i> K12 F- <i>araD</i> 139Δ( <i>argF lac</i> ) U169 <i>rps L</i> 150 <i>relA</i> 1 <i>flbB</i> 5301 <i>deoC</i> 1 <i>ptsF</i> 25 <i>rbcR</i> , resistente a estreptomina	Colección del laboratorio
E2348/69	EPEC O127:H6, contiene el plásmido EAF (69 kb) y un plásmido críptico (3 kb), resistente a Ac. Nalidíxico.	Levine <i>et al.</i> , 1978.
E2348/69 Δ <i>ler</i>	Cepa derivada de EPEC, mutante en <i>ler</i> (sustracción en fase de <i>ler</i> ), resistente a Ac. Nalidíxico.	Bustamante <i>et al.</i> , 2001.
E2348/69 Δ <i>grlA</i>	Cepa de EPEC, <i>grlA</i> ::Km.	Vázquez, A. (datos no publicados)
E2348/69 Δ <i>hns</i>	Cepa de EPEC, mutante en <i>hns</i> ::Km	Vázquez, A.(datos no publicados)
JPN15	Cepa de EPEC carente del plásmido EAF y resistente a ácido Nalidíxico	Jerse <i>et al.</i> , 1990
JPN15 Δ <i>grlA</i>	Cepa de EPEC derivada de JPN15 <i>grlA</i> ::Km.	Vázquez, A. (Datos no publicados)

**Tabla 3. Plásmidos utilizados en este estudio.**

<b>PLÁSMIDOS</b>	<b>CARACTERISTICAS</b>	<b>ORIGEN</b>
pKK232-8	Derivado de pBR322 que contiene el gen para la cloranfenicol acetil transferasa ( <i>cat</i> ) sin promotor, resistente a Amp.	Brosius <i>et al.</i> ,1984.
pEPr3-1	Derivado de pKK232-8, que contiene la fusión <i>pEPr3-1-cat</i> , contiene la región promotora de <i>rorf3</i> de -198 a +123.	Este estudio.
pEPr3-2	Derivado de pKK232-8, que contiene la fusión <i>pEPr3-2-cat</i> , contiene la región promotora de <i>rorf3</i> de -198 a +435.	Este estudio.
pEPr3-3	Derivado de pKK232-8, que contiene la fusión <i>pEPr3-3-cat</i> , contiene la región promotora de <i>rorf3</i> de -408 a +123.	Este estudio.
pEPr3-4	Derivado de pKK232-8 contiene la región promotora de <i>rorf3</i> de -408 a +435.	Este estudio.

### **OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS**

Los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo para amplificar fragmentos de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y reacciones de secuenciación se diluyeron a una concentración de 25  $\mu$ M y se presentan en la tabla **No.4**. Estos oligonucleótidos fueron solicitados a la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología-UNAM.

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de las fusiones transcripcionales**

<b>NOMBRE</b>	<b>SECUENCIA 5' ----- 3'*</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>
<b>rorf3 HBF</b>	<b>TCG Gaa gct tAC AGA TCT T AA ATG AG</b>	<b>29 bases, introduce un sitio de restricción <i>Hind</i> III.</b>
<b>orf10 HBR</b>	<b>ACA GAA GTC TTA TCG CCG CCA Ggg atc cTA TTT CC</b>	<b>35 bases, introduce un sitio de restricción <i>Bam</i> HI.</b>
<b>rorf3 LUM</b>	<b>GTA TTA AAG Taa gct tCA TTA TAC GCA CC</b>	<b>29 bases, introduce un sitio de restricción <i>Hind</i> III .</b>
<b>orf10 LUM</b>	<b>TAA TTA ATg gat ccATAA ATT TGG C</b>	<b>25 bases, introduce un sitio de restricción <i>Bam</i> HI.</b>

\*En minúsculas se indica la secuencia del sitio de restricción introducido.

### **Construcción de fusiones transcripcionales**

Se construyeron fusiones transcripcionales de distintas longitudes de la región intergénica de *rorf3* y *orf10* fusionadas al gen reportero *cat* para monitorear la expresión del gen *rorf3*. Para esto se amplificaron los fragmentos de DNA por medio de la técnica de PCR (ver más adelante), y se utilizó como molde DNA cromosomal de la cepa E2348/69 de EPEC. Los oligonucleótidos se diseñaron para introducirles los sitios de restricción de las enzimas *Bam*HI-*Hind*III (Tabla 4).

Los fragmentos obtenidos por el PCR se digirieron con las enzimas *Bam*HI-*Hind*III y se clonaron en el vector de mediano número de copias pKK232-8 que tiene el gen reportero *cat* el cual carece de promotor (Tabla3). Posteriormente los productos se introdujeron a distintas cepas por electroporación utilizando el electroporador “Gene Pulser” (BioRad) a 1.8 kV, 25  $\mu$ F, y 20 $\Omega$ .

### Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación de los fragmentos de DNA se llevaron a cabo por medio de la técnica de PCR. Las condiciones de alineamiento variaron en cada reacción dependiendo de la Tm de los oligos. Para la reacción se utilizaron los termocicladores Perkin-Elmer 480 o Statagene Robo Cycler Gradient 40. A manera de ejemplo, a continuación se muestra una mezcla de reacción y las condiciones utilizadas:

#### Mezcla de reacción

<b>H<sub>2</sub>O</b>	60.5 $\mu$ l
<b>Regulador 10x</b>	10.0 $\mu$ l
<b>MgCl<sub>2</sub> 25mM</b>	10.0 $\mu$ l
<b>DNTP (1.25mM)</b>	16.0 $\mu$ l
<b>Oligo1 (25<math>\mu</math>M)</b>	1.0 $\mu$ l
<b>Oligo2 (25<math>\mu</math>M)</b>	1.0 $\mu$ l
<b>DNA</b>	1.0 $\mu$ l
<b>Enzima Taq polimerasa (5U/<math>\mu</math>L)</b>	0.5 $\mu$ l
<b>Total</b>	100.0 $\mu$ l

#### Condiciones de reacción

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Ciclos</b>
5	95 ° C	1
1.5	94 ° C	30
1.5	45 ° C	
1.5	72 ° C	
10	72 ° C	1

Los productos de las reacciones se observaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, el cual se tiñó con bromuro de etidio. Posteriormente, se purificaron por precipitación o con el estuche comercial “Gene Clean”(Bio 101 Systems).

### **Digestiones con enzimas de restricción**

Para las digestiones se utilizaron las enzimas de Invitrogen *Bam*HI y *Hind*III (Invitrogen) y las condiciones recomendadas por la misma compañía, aunque el volumen de cada reacción fue variable. A continuación se muestra una reacción a manera de ejemplo.

<b>DNA (~40 ng)</b>	<b>7.0 µl</b>
<b>Regulador 10x</b>	<b>2.0 µl</b>
<b>Enzima (~5 U)</b>	<b>0.7 µl</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>10.3 µl</b>
<b>Total</b>	<b>20.0 µl</b>

## Ligaciones

Para las reacciones de ligación se utilizaron las siguientes condiciones. Se genera una mezcla del vector y el inserto con una proporción 1:5. El volumen en microlitros que se agrega a la reacción depende de las concentraciones de inserto y del vector. La mezcla se incubó a 4°C durante toda la noche y después se utilizó para transformar células electrocompetentes. Ejemplo de mezcla de reacción.

<b>DNA (vector)~10 ng</b>	<b>1.0 µl</b>
<b>DNA (inserto) ~30 ng</b>	<b>6.5 µl</b>
<b>Regulador</b>	<b>2.0 µl</b>
<b>Enzima T4 DNA ligasa</b>	<b>0.5 µl</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>10 µl</b>
<b>Total</b>	<b>20 µl</b>

## Preparación de células electrocompetentes

La cepa se creció durante toda la noche en 5 ml de medio LB con su antibiótico correspondiente. Al otro día, se inoculó un matraz con 50 ml de medio LB con 1 ml del cultivo anterior y se dejó creciendo en agitación a 37°C hasta llegar a una D.O.<sub>600</sub> de 0.6. El cultivo se dejó en hielo por 10 min y posteriormente, se centrifugó a 5,000 rpm por 10 min a 4°C. Las células se resuspendieron en 20 ml de agua Milli-Q estéril fría y se centrifugaron como ya se mencionó; este paso se repitió dos veces. Las células se resuspendieron en 10 ml de glicerol al 10% frío y se centrifugó como se ha mencionado.

Posteriormente, las células se resuspendieron en 300  $\mu$ l de glicerol frío y se hicieron alícuotas de 50  $\mu$ l que permanecieron congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **Minipreparaciones de DNA plasmídico.**

Se tomaron 3 ml de un cultivo saturada de la cepa de interés crecida en LB con el antibiótico correspondiente y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 3 min. Se tiró el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 200  $\mu$ l de solución GET (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM), y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 200  $\mu$ l de solución 2 (NaOH 10 N, SDS 20%), se mezcló y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. A esta mezcla se le añadieron 200  $\mu$ l de acetato de potasio 3M (pH 7.8), se agitó y se incubó durante 10 min en hielo. Después la mezcla se centrifugó durante 10 min a 12,000 rpm y se tomaron 600  $\mu$ l del sobrenadante. A esta solución y se le agregaron 300  $\mu$ l de fenol (pH 7.5) y 120  $\mu$ l de cloroformo alcohol isoamílico, se agitó vigorosamente durante 5 min a temperatura ambiente y se centrifugó 8 min a 12,000 rpm. En seguida se colectaron 500  $\mu$ l de la fase acuosa y se le agregó 1 ml de etanol absoluto. Esta mezcla se centrifugó durante 15 min a 10,000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$  y la pastilla obtenida se lavó con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó durante 10 min. La pastilla se secó al vacío en un aparato tipo Savant durante 10 min y, finalmente, se resuspendió en 40  $\mu$ l de agua. Los plásmidos se observaron en un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio.

## REACCION DE SECUENCIA

La secuenciación de las construcciones se llevó a cabo con el estuche comercial "Termosequenase" (Amersham). El oligonucleótido se fosforiló con la siguiente reacción:

<b>OLIGONUCLEÓTIDO 25 <math>\mu</math>m</b>	<b>0.4 <math>\mu</math>l</b>
<b>REGULADOR cinasa (10x)</b>	<b>0.1 <math>\mu</math>l</b>
<b>dATP-<math>\gamma</math> <sup>32</sup> P (5<math>\mu</math>Ci)*</b>	<b>0.4 <math>\mu</math>l</b>
<b>T4 PNK (5 U/ml)</b>	<b>0.2 <math>\mu</math>l</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>8.0 <math>\mu</math>l</b>
<b>TOTAL</b>	<b>10.0 <math>\mu</math>l</b>

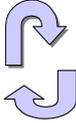
\*la cantidad de marca radioactiva que se utiliza es de acuerdo a su decaimiento.

La reacción se incubó a 37°C por 30 min, después se calentó por 5 min a 65°C para inactivar la enzima. La mezcla de reacción de secuencia se describe a continuación:

<b>*DNA TEMPLADO (600-800 ng)</b>	<b>10. <math>\mu</math>l</b>
<b>REGULADOR 10x</b>	<b>2.4 <math>\mu</math>l</b>
<b>OLIGO fosforilado</b>	<b>1.0 <math>\mu</math>l</b>
<b>Enzima TERMO sequenase</b>	<b>0.6 <math>\mu</math>l</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	<b>6.0 <math>\mu</math>l</b>
<b>TOTAL</b>	<b>20 <math>\mu</math>l</b>

\*La cantidad de DNA templado puede variar según la concentración del mismo.

En 4 tubos Eppendorff para PCR de 0.5 ml se agregaron 4  $\mu$ l de cada uno de los terminadores (ddNTP's), después se añadieron 5  $\mu$ l de la mezcla de reacción y se colocó una gota de aceite mineral. La reacción de secuencia se realizó con las siguientes condiciones:

TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
94°C	5 min.	1 ciclo
94°C	30 seg.	50 ciclos
47°C	30 seg.	
60°C	2 min.	

Al terminar, se añadieron 4  $\mu$ l de solución de paro (formamida 95%, azul de bromofenol). Las reacciones se cargaron en un gel para electroforesis de poliacrilamida-urea al 8%, que previamente se precalentó por 30 min a 60 W. Las muestras se calentaron por 3 min a 80°C, para deshacer estructuras secundarias y se colocaron en los pozos del gel, el cual se corrió a 60 W de 3 a 9 horas. Por último el gel se secó 1 hora a 80°C en un secador al vacío, posteriormente el gel se expuso en un casete para el Phospho Imager (Molecular Dynamics).

## **Determinación de la actividad de CAT**

El ensayo de cloranfenicol acetil transferasa CAT se realizó como se describe a continuación:

Inicialmente se preparó un extracto crudo. Primero las bacterias se concentraron por centrifugación a una velocidad de 14,000 rpm por 1 minuto y se lavaron con 600  $\mu$ l de solución TDTT (Tris-HCL 50 mM, pH 7.8 y DL dithiothreitol 30  $\mu$ M). La pastilla se resuspendió en 500  $\mu$ l de TDTT y se sonicaron por 1 min en hielo. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación (10,000 rpm) durante 15 minutos a 4°C y los sobrenadantes se transfirieron a tubos limpios.

Para la determinación de la actividad de CAT, se colocaron 5  $\mu$ l de cada extracto por duplicado en una placa de ELISA de 96 pozos, seguidos de 200  $\mu$ l de la mezcla de reacción que contenía DTNB 1 mM (5,5-ditio-bis(2-ácido nitrobenzónico) acetil-CoA 0.1 mM, cloranfenicol 0.1 mM, Tris-HCl 0.1 M pH 7.8. Los cambios en absorbancia a 410 nm se registraron cada 5 seg durante 5 min usando un lector de microplacas (Scanning Autoreader and Microplate Workstation, Ceres 900C) y el programa KC3Jr para la determinación de las cinéticas. Las actividades se obtuvieron por interpolación con una curva estándar compuesta de concentraciones de 0 a 2500 U/ml de la enzima cloranfenicol acetil transferasa purificada. Las concentraciones de proteína de los extractos usados en el ensayo de CAT se determinaron con el estuche para cuantificación de proteínas BCA (Pierce, Rockford. IL, EUA). Las concentraciones de las proteínas se obtuvieron por la interpolación con una curva estándar compuesta de concentraciones de 0.1 a 1.5 mg de albúmina de

suero bovino. Estos valores se usaron para calcular la actividad específica de CAT.

### **Extracción de RNA para “primer extension”**

Se extrajo RNA total para la realización del “primer extension” utilizando el estuche comercial RNeasy Mini Kit (QIAGEN).

Brevemente, las bacterias se cultivaron en medio DMEM a 37°C en agitación. Cuando los cultivos llegaron a una densidad óptica de 0.8 a 600 nm, se tomaron muestras de 1ml y se centrifugaron a 8,000 rpm a 4°C durante 5 minutos. Se decantó el sobrenadante para conservar la pastilla celular, la cual se resuspendió en 150 µl de amortiguador TE con lisozima y se incubó 5 min a temperatura ambiente. A la solución se le agregaron 350 µl de regulador de lisis (RLT) y se mezcló hasta homogenizar. A la muestra se le añadieron 250 µl de etanol absoluto y se mezcló. El lisado se transfirió a una columna colocada en un tubo de 2 ml y se centrifugó por 15 seg a 10,000 rpm y se tiró el sobrenadante. Posteriormente, a la columna se le añadieron 700 µl de regulador de lavado (RW1) y se centrifugó durante 15 seg a 10,000 rpm. Se eliminó el sobrenadante, la columna se transfirió a un tubo nuevo. A la columna se le agregaron 500 µl de regulador de lavado concentrado (RPE), y se centrifugaron durante 15 seg. a 10,000 rpm. Se tiró el sobrenadante, y a la columna se le agregaron 500 µl de amortiguador de lavado concentrado (RPE) y se centrifugaron durante 2 min a 10,000 rpm. Finalmente se cambió la columna a un tubo nuevo y se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min para obtener el RNA, el cual, se cuantificó por absorbancia a 260 nm.

## Primer Extension

Para las reacciones de primer extension los oligos complementarios al extremo 5' del gen estructural *rorf3* u *ompA* se marcaron radioactivamente con [ $\gamma^{32}$ ]-dATP utilizando la enzima polinucleótido cinasa T4. Los oligonucleótidos marcados se mezclaron con 20  $\mu$ g de RNA total para el caso del oligo de *rorf3* y de 1  $\mu$ g para el correspondiente a *ompA*, el cual fue utilizado como control de carga. El alineamiento de los oligos y el transcrito correspondiente se llevó a cabo desnaturalizando primero la mezcla a 90°C por 3 min y después enfriándola lentamente hasta una temperatura de 50°C.

La reacción de extensión del oligonucleótido se realizó con 10 U (0.8  $\mu$ l), de la enzima Transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis (MLV) (Amersham LIFE SCIENCE Inc. Cleveland, Ohio) durante 1.5 hrs a una temperatura de 37°C con regulador de la enzima AMV, DTT 1mM (5  $\mu$ l), DNTPs 100 mM (1.5  $\mu$ l) y 1.7  $\mu$ l de inhibidor de RNAsa (Amersham LIFE SCIENCE Inc. Cleveland, Ohio). Los productos obtenidos se precipitaron con 10 volúmenes de butanol y se mezcló e incubó en hielo durante 10 min. En seguida la mezcla se centrifugó por 3 min a 14,000 rpm y se le realizaron 3 lavados con etanol al 70%. Después la pastilla se secó al vacío en un aparato tipo Savant y por último, se le agregó 5  $\mu$ l de solución de paro (formamida 95% y azul de bromofenol). Las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida 8%, 7M y solución de boratos (TBE). Para revisar la concentración y la calidad del RNA se realizó una reacción de PE utilizando un oligonucleótido específico para el transcrito del gen *ompA*. Paralelamente, se realizaron las reacciones necesarias para determinar la secuencia de la región analizada, utilizando el

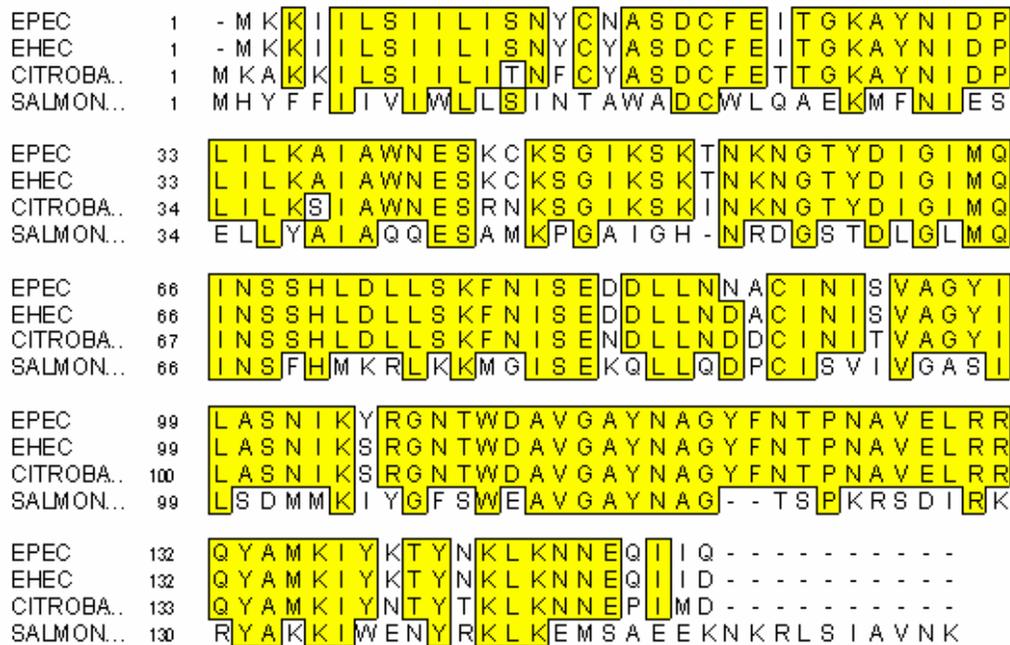
mismo oligonucleótido y DNA del plásmido derivado del pKK232-8, el cual tiene clonado lleva el fragmento que comprende el gen y la región reguladora analizada.

## RESULTADOS

Con el propósito de obtener información acerca de una posible función de Rorf3 de EPEC se realizó una búsqueda tipo BLAST (**Fig.6**) para revisar si existía en la base de datos del GeneBank alguna proteína homóloga de función ya asignada (Altschul *et al.*, 1990). Como era de esperarse, los resultados indicaron una gran identidad con el Rorf3 de los patógenos EHEC y *C. rodentium*; sin embargo, no han sido asignadas las funciones para éstos. El producto de *rorf3* también muestra similitud con una proteína de 18,369 Da de *Salmonella enterica* serovar Typhi llamada lagB con 44% de identidad y 54% de similitud. Se sabe muy poco de la función de lagB, pero al parecer tiene un efecto hemolítico en células HeLa (Miras *et al.*, 1995).

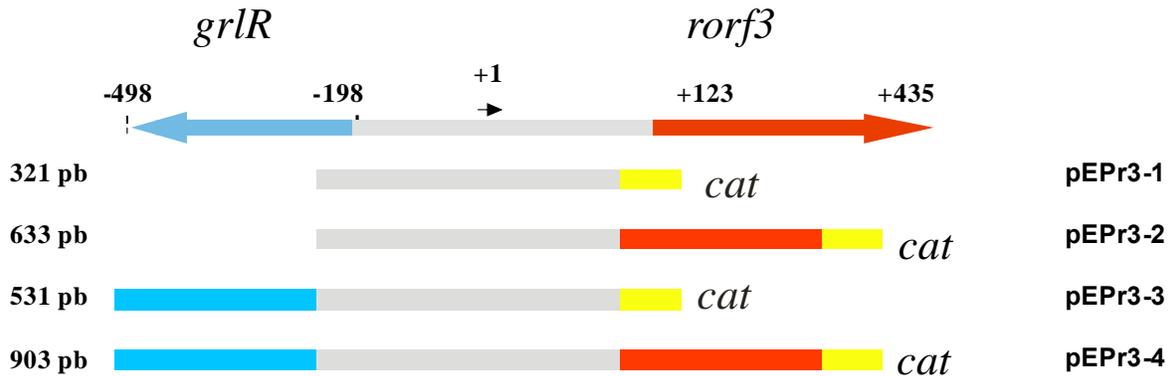
Por otra parte, Rorf3 también tiene un 34% de identidad y 45% de similitud con la proteína IpgF de *Shigella flexneri*. En el análisis de la región N-terminal de IpgF muestra una secuencia señal que sugiere que esta proteína es transportada (Allaoui *et al.*, 1993). Una mutante de *S. flexneri ipgF* muestra la misma habilidad que la silvestre para invadir células, por lo que al parecer no tiene ningún papel relevante en el mecanismo de invasión de *S. flexneri*. Además del parecido con las proteínas antes mencionadas, *rorf3* también se parece a una proteína de *Chromobacterium violaceum* (datos no mostrados) la cual, al igual que EPEC, posee un TTSS (Brazilian National Genome Project Consortium 2003). Como dato adicional se sabe que es una bacteria que se encuentra en zonas tropicales y pocas veces se ha relacionado con enfermedades en humanos, pero que cuando infecta llega a ser fulminante y causa la muerte en menos de 48 hrs (Chen *et al.*, 2003).

Por datos obtenidos por Deng *et al.* (2004), al realizar una disección de la isla LEE en *C. rodentium*, notaron que la mutante *rorf3* tiene disminuida la secreción de proteínas efectoras, lo que fortalece la hipótesis de que esta proteína estaría relacionada con la translocación y secreción de proteínas vía el SSTT.



**Fig. 6.** Alineamiento del producto de *rorf3* de EPEC, EHEC, *C. rodentium* e IpgH de *Salmonella* de acuerdo al resultado obtenido con el BLAST (Altschul *et al.*,1990).

Para delimitar la región reguladora de *rorf3* se construyó una serie de 4 fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* en el plásmido pKK232-8, con fragmentos que abarcan distintas longitudes de la secuencia corriente arriba del gen (Fig.7).

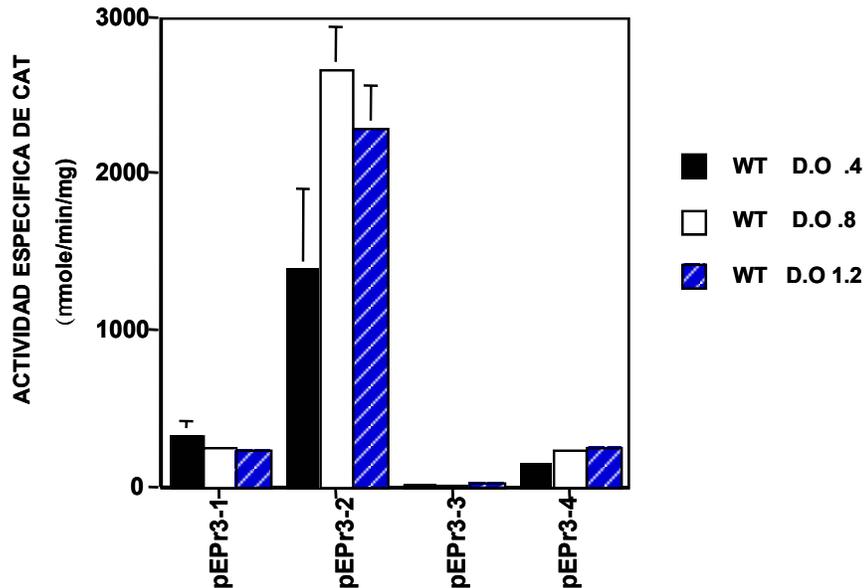


**Fig.7.** Representación esquemática de la construcción de fusiones transcripcionales de *rorf3* al gen reportero *cat*. La flecha con +1 marca el inicio de transcripción de *rorf3*. El plásmido **pEPr3-1** contiene 321 pb y comprende de -198 a +123 con respecto al inicio de transcripción. El plásmido **pEPr3-2** contiene 633 pb y comprende de -198 a +435 con respecto al inicio de transcripción. El plásmido **pEPr3-3** contiene 531 pb y comprende de -498 a +123 con respecto al inicio de transcripción. El plásmido **pEPr3-4** contiene 903 pb y comprende de -498 a +435 con respecto al inicio de transcripción.

Una vez que se construyeron las fusiones transcripcionales y se verificaron por secuencia, se introdujeron a la cepa EPEC E2348/69. La cinética de expresión de cada fusión se determinó midiendo la actividad de CAT, a partir de muestras tomadas a distintas densidades ópticas, de cultivos crecidos en DMEM con agitación a 37°C. Con el fin de simplificar la gráfica, sólo se muestran los valores a tres densidades (0.4, 0.8 y 1.2), los cuales reflejan el punto en el que se alcanza la actividad máxima (**Fig.8**).

Con este experimento notamos distintos niveles de actividad para cada fusión, indicándonos que éstas contienen o carecen de elementos importantes para la regulación positiva o negativa de *rorf3*. La fusión **pEPr3-4** abarca la región intergénica completa entre *grlR* y *rorf3*, así como la mayor parte de los genes

estructurales, y alcanza como máximo un promedio de 250 veces, aproximadamente. Tomando la fusión **pEPr3-4** como referencia, cuando se le elimina la región de *rorf3* que comprende de la región +123 a +405 (**pEPr3-3**) la actividad disminuye drásticamente, revelando la existencia de una importante región de regulación positiva localizada entre dichas posiciones. Por el contrario, cuando se elimina la región -198 a -408 (**pEPr3-2**) los niveles de expresión alcanzan más de 2,500 unidades, indicando la presencia de un sitio de regulación negativa entre estas posiciones.



**Fig.8.** Actividad de distintas fusiones *rorf3-cat* en la cepa de EPEC E2348/69. Las muestras fueron cultivadas en medio DMEM en agitación a 37°C y se tomaron muestras de cultivo a diferentes densidades ópticas. La gráfica muestra las actividades correspondientes a densidades de 0.4, 0.8 y 1.2. Los resultados mostrados son el promedio de al menos tres experimentos.

Por último, la fusión **pEPr3-1** tiene niveles similares a los mostrados en la fusión **pEPr3-4**, los cuales podrían reflejar la actividad del promotor en ausencia de

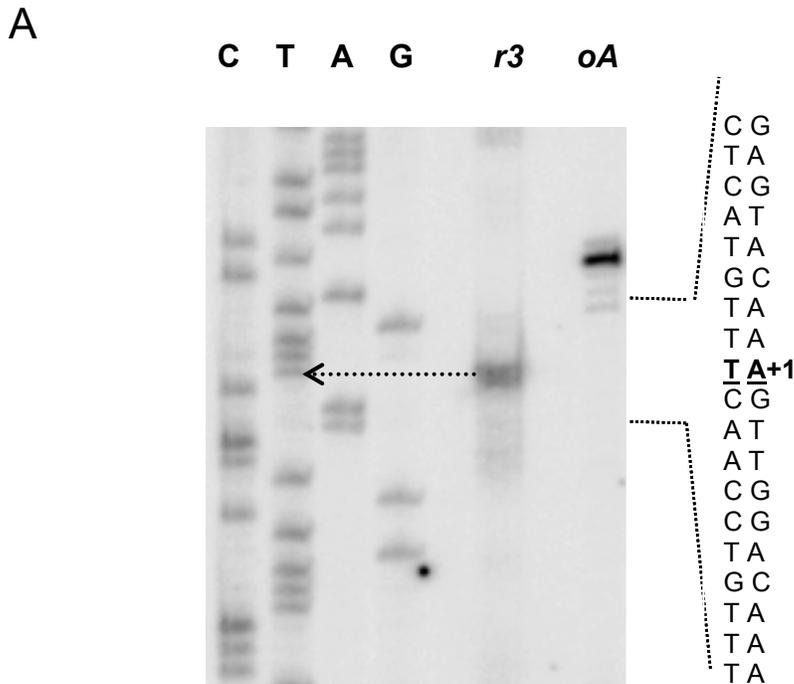
elementos que permiten su expresión como para el caso de la fusión **pEPr3-2**, mientras que para la **pEPr3-4** estarían reflejando la actividad promedio en condiciones donde están presentes los elementos tanto de regulación positiva, como negativa, pero que favorecen la regulación negativa.

### **Identificación del promotor de *rorf3*.**

Con el propósito de definir si las fusiones *rorf3-cat* se expresan a partir del mismo promotor que el gen cromosomal, identificamos su inicio de transcripción por medio de la técnica de “primer extension”. Para este fin utilizamos RNA total de la cepa E2348/69 de EPEC conteniendo la fusión **pEPr3-1**, (se describe más abajo) el cual fue purificado de muestras obtenidas a una D.O. de 0.8 a 600nm a partir de cultivos realizados en medio DME con agitación a 37°C (**Fig.9A**). La determinación del inicio de la transcripción a partir del transcrito que genera la fusión transcripcional de *rorf3* se llevó a cabo porque éste no se logró definir utilizando RNA total de la cepa silvestre (datos no mostrados). Es probable que la expresión del promotor cromosomal sea muy baja y la técnica utilizada no haya sido lo suficientemente sensible para detectarlo. Alternativamente, pudo deberse a un problema técnico que no pudimos resolver en este trabajo.

Los resultados nos indican que el inicio de la transcripción corresponde a un residuo **T**, 70 pb río arriba del inicio de la traducción del producto de *rorf3*. La caja **-10** del promotor es **TATACT**, coincidiendo en 5 de 6 bases del consenso TATATT de promotores de *E. coli* y conservando tres bases de las más importantes para esta región (subrayadas). La región **-35** es **TTGCAA** que coincide en 4 de 6 bases del consenso TTGACA, teniendo las primeras tres más conservadas (subrayadas).

La separación entre las regiones -10 y -35 es de 17 pb (**Fig. 9B**). En este experimento se utilizó *ompA* como control para verificar que la técnica había sido aplicada correctamente y como control de carga ya que se trata de un gen cuya expresión es constitutiva en las cepas y condiciones de crecimiento utilizadas en este estudio. Las características del promotor identificado para *rorf3* sugieren que su activación es dependiente del factor  $\sigma^{70}$ .



**Fig.9.** Análisis de la secuencia intergénica de *rorf3* y *orf10* y ubicación del promotor

(A) “Primer extension” de *rorf3*. RNA total de la cepa E2348/69/pEPr3-1 cultivada en medio DME a 37 °C en agitación, se utilizó para determinar el inicio de transcripción de *rorf3* (*r3*) (20 µg) o de *ompA* (*oA*) (1 µg).

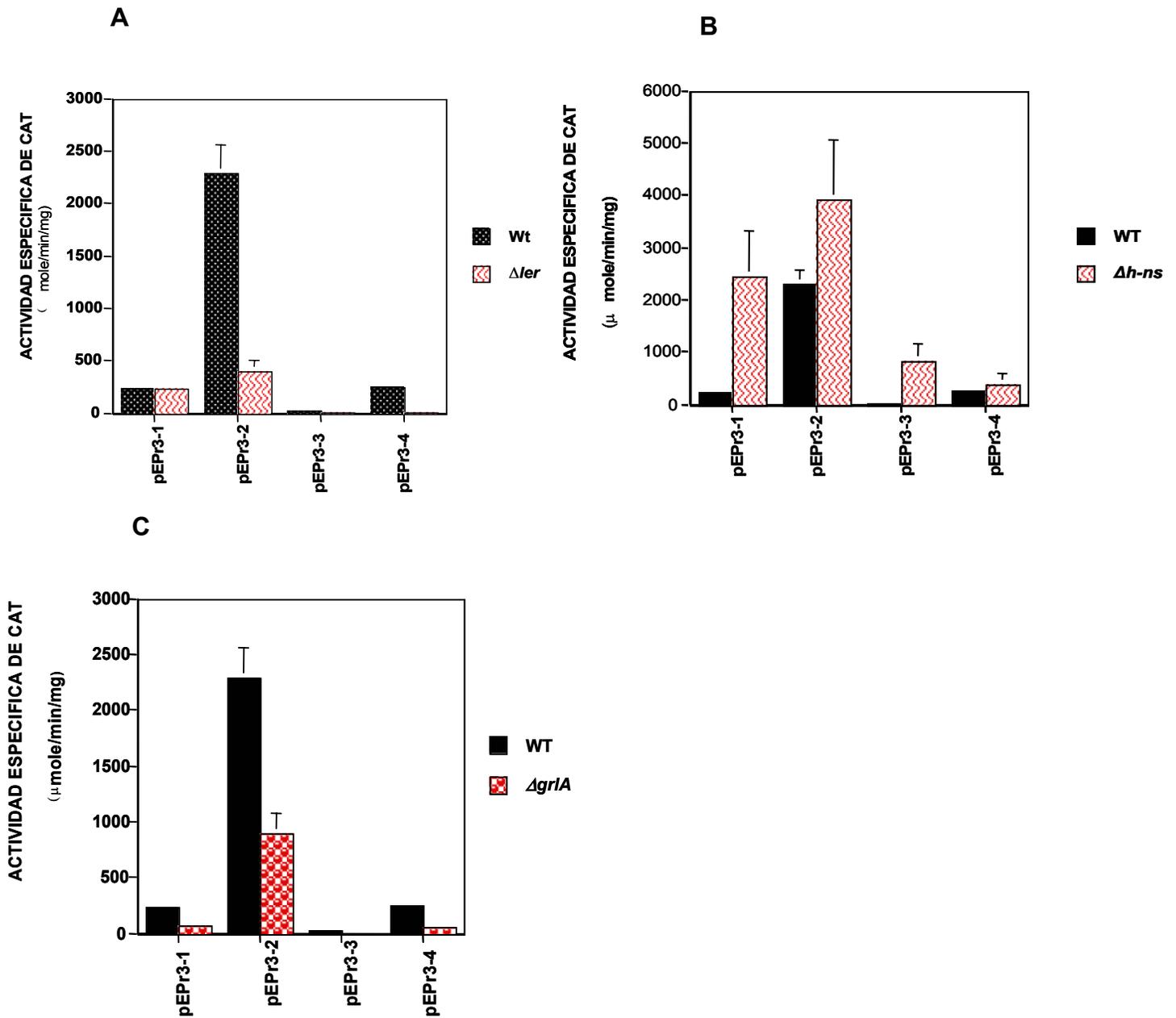
(B) Organización de la región reguladora de *rorf3*. La secuencia de nucleótidos que se muestra va de -130 a +71 con respecto al inicio de transcripción identificado. El inicio de transcripción de *rorf3* está marcado con +1 y una flecha con dirección a la transcripción, las regiones -10 y -35 están subrayadas en el sentido de *rorf3* en color rojo, y en sentido contrario el posible inicio de transcripción y promotor de *grlR* en gris. El sitio de unión a ribosoma se muestra dentro de una caja.

### **Evaluación de la expresión de *rorf3* en la cepa E2348/69 mutante en *ler***

Se ha reportado previamente que Ler induce la expresión de los genes del LEE, al contrarrestar la represión que ejerce compitiendo con H-NS, sobre sus promotores (Bustamante *et al.* 2001).

Con el fin de caracterizar el papel de Ler en la expresión de *rorf3*, las fusiones *rorf3-cat* se transformaron en la cepa E2348/69  $\Delta ler$  y la actividad de CAT se midió bajo condiciones de inducción las cuales fueron descritas previamente en materiales y métodos.

Como se puede observar en la **Fig.9A**, los resultados obtenidos para las fusiones **pEPr3-2** y **pEPr3-4** indican que su regulación es dependiente de Ler, como se ha mostrado para otros genes de LEE. Sin embargo, la fusión **pEPr3-1**, la cual sólo abarca la región intergénica muestra niveles de actividad similares en ausencia o presencia de Ler, apoyando la propuesta de que esta fusión refleja la actividad basal constitutiva del promotor y que carece de los elementos necesarios tanto para regulación positiva como negativa. Las dos fusiones cuya expresión mostró dependencia de Ler, tienen en común, además de la región intergénica, la región estructural de *rorf3*.



**Fig. 10.** Análisis de las fusiones en cepas mutantes en Ler, HN-S y GrIA. Los resultados son el promedio de al menos tres ensayos independientes realizados en DME, en agitación a 37°C y una D.O=1.2.

- A)** Ler requiere la expresión de *rorf3*. La actividad transcripcional fue monitoreada para las cuatro distintas fusiones (**pEPr3-1**, **pEPr3-2**, **pEPr3-3** y **pEPr3-4**) de *rorf3* en la cepa EPEC E2348/69 (WT) y su mutante en *ler*.
- B)** H-NS reprime la expresión de *rorf3*. La actividad transcripcional fue monitoreada para las cuatro distintas fusiones de *rorf3* en la cepa EPEC E2348/69 (WT) y en su mutante en *hns*.
- C)** GrIA regula positivamente *rorf3*. La actividad transcripcional fue monitoreada para las cuatro distintas fusiones de *rorf3* en la cepa EPEC E2348/69 (WT) y su mutante

### **Análisis de las fusiones en la cepa EPEC $\Delta hns$**

Se ha demostrado en distintos estudios que H-NS regula negativamente distintos genes de virulencia de EPEC. Dado que el resultado previo indica que la expresión de *rorf3* es regulada por Ler y, a su vez, por un mecanismo de regulación negativa, es probable que H-NS esté involucrada. Para determinar si este es el caso, las fusiones se transformaron en la cepa EPEC  $\Delta hns$ . En la gráfica de la **Fig.10B**, podemos observar que ocurre un incremento en la actividad de todas las fusiones en ausencia de H-NS, aunque en algunas el cambio es más dramático que en otras.

Para la fusión **pEPr3-1**, se observó un incremento de 10 veces con respecto a la cepa silvestre. Esto sugiere que H-NS es responsable de mantener reprimida esta fusión y que la región intergénica contiene sitios de unión para esta proteína. Esta observación se ve reforzada por los resultados obtenidos por Barba *et al.* (2005), los cuales demuestran que H-NS de *C. rodentium* tiene mayor afinidad hacia la región intergénica de *rorf3* *grlRA*, aunque es necesario realizar los experimentos pertinentes para poder asegurar esto.

### **Análisis de las fusiones en la cepa $\Delta grlA$ .**

Como ya se mencionó, recientemente se reportó que el gen *orf11*, ahora llamado *grlA* (“Global Regulator of LEE Activator”), codifica para un regulador positivo de la expresión de *ler* (Deng *et al.*, 2004). Este gen está altamente conservado entre los organismos patógenos que producen la lesión A/E.

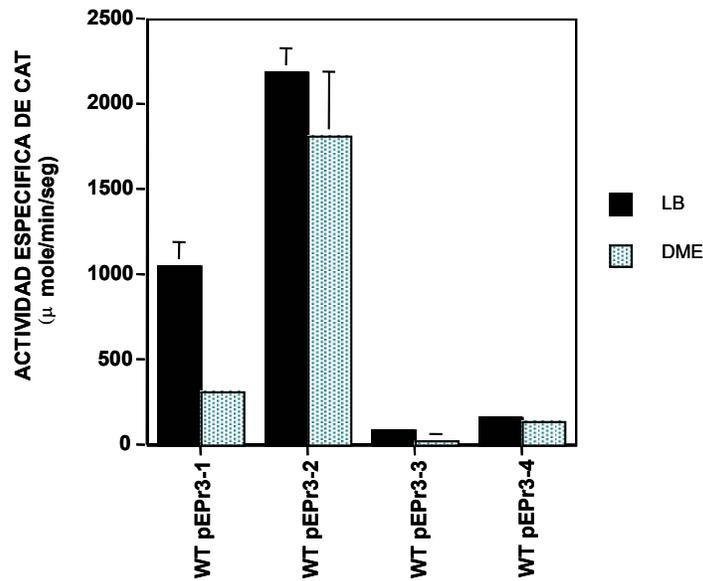
GrlA tiene homología con la proteína CaiF, con un 23 % de identidad, y un 37% de identidad de una proteína hipotética en *Salmonella*.

Con el fin de evaluar si GrlA tiene algún papel en la regulación de *rorf3*, las fusiones fueron evaluadas en una cepa mutante en este gen.

Por datos obtenidos en el laboratorio con otros genes de LEE (Barba *et al.*, 2005), es posible que GrlA actúe río arriba de *ler* para así iniciar la cascada de regulación positiva de los genes dentro de la isla LEE. Los datos obtenidos en este estudio (**Fig. 10C**), son consistentes con este planteamiento, ya que en los ensayos de actividad se ve claramente que la expresión de todas las fusiones se reduce en ausencia de GrlA de manera similar a lo observado en la mutante en Ler (**Fig. 10**). Por los ensayos realizados podemos observar que la actividad del promotor de *rorf3* se afecta en forma similar en ausencia tanto de Ler como de GrlA.

### **Evaluación de las fusiones en medios de cultivo DMEM y LB**

Con el fin de determinar el papel del medio de cultivo en la expresión de *rorf3*, la actividad de las fusiones contenidas en la cepa silvestre se evaluaron en dos medios de cultivo: LB (medio rico) a 37°C, en el que se ha demostrado que reprime la expresión de distintos genes de virulencia, y en contraparte, el medio para células eucariontes DMEM a 37°C, que se sabe es el medio óptimo para la expresión de distintos genes de virulencia de EPEC (Puente *et al* 1996, Bustamante *et al.*, 1998; Martínez-Laguna *et al.*, 1999) (**Fig.11**).



**Fig. 11.** Efecto de dos distintos medios de cultivo, LB y DMEM, en la expresión de las 4 diferentes fusiones de *rorf3* en la cepa silvestre a una  $D.O_{600}=1.4$ . Los resultados mostrados son el promedio de al menos tres experimentos realizados por duplicado.

Interesantemente, la fusión **pEPr3-1** generó una actividad en LB alrededor de 4 veces mayor que la obtenida para la misma fusión en DMEM. Estos datos plantean la posibilidad de que el promotor de *rorf3*, en ausencia de las secuencias reguladoras que lo flanquean corriente arriba y abajo, sea capaz de responder al medio de cultivo en forma opuesta a como lo hace el resto de los promotores del LEE, los cuales son claramente reprimidos en cultivos en LB. (Puente *et al.*, 1996, Bustamante *et al.*, 1998; Martínez-Laguna *et al.*, 1999).

Por último y con el fin de tener una aproximación computacional y poder predecir alguna relación con otros organismos y su posible regulación, se procedió a realizar un alineamiento de la región reguladora de *rorf3* con tres organismos que tienen la isla de patogenicidad LEE (**Fig.12**). Esto con el fin de localizar el posible promotor y el inicio de la transcripción de *rorf3* en EHEC y *C. rodentium*. Tanto en

EPEC como en EHEC las regiones son idénticas, lo que sugiere que el inicio de transcripción podría ser el mismo. Por el contrario, *C. rodentium* tiene un par de cambios en la región -35, alejándolo del consenso. En ambos casos se tendría que demostrar experimentalmente que las predicciones son correctas.

EPEC	1	- - - - -	A A C T C A C T C A G T T T C A T A C T A A C C T	25
EHEC	1	- - - - -	A A C T C A C T C A G T T T C A T A C T A A C C T	25
CITROBA..	1	A A T T A T A A C T	C T C A T T C G A T T T C A T G C T A A C C T	33
EPEC	26		C A C T C C T T T C A A T T T G T T C T A T C C A T A A G C A A T	58
EHEC	26		C A C T C C T T T C A A T T T G T T C T A T C C A T A A G C A A T	58
CITROBA..	34		C A C T C C A T T C C A T T T G T T C T A T C C A T A A C C G C	66
EPEC	59		A T C A A G A A - T A A T G G A G A C C T T T C T T T T T C T C C	90
EHEC	59		A T C A A G A A - T A A T G G A G A C C T T T C T T T T T C T C C	90
CITROBA..	67		A T A A A G A A A T A A C G G A G A T G C T T C A T T T T C T C C	99
EPEC	91		A G A T T G C A A T G T A A T A T A T C A T T A A A T A T A C T C	123
EHEC	91		A G A T T G C A A T G T A A T A T A T C A T T A A A T A T A C T C	123
CITROBA..	100		A A A T T A C A C T G T A A T A T A T C A T T A A A T A T A C T C	132
EPEC	124		A T G T T T C A A C C T G C T G T T T C C C T G G T T A - C A T A	155
EHEC	124		A T G T T T C A A C C T G C T G T T T C C C T G G T T A A C A T A	156
CITROBA..	133		A T A T T - - - - C C A A G T T T T T C T G T G G T T G C C A T C	161
EPEC	156		T G T A A T T T C T G A T T A - T A A T A T T G A G T A A C A A C	187
EHEC	157		T G T A A T T T C T G A T T A A T A A T A T T G A G T A A C A A C	189
CITROBA..	162		T T T A A A T C T A A C G C A T C A C A T T G A A G A T A A A -	193
EPEC	188		G T A A A A	193
EHEC	190		G T A A A A	195
CITROBA..	0		- - - - -	193

**Fig. 12.** Alineamiento de la región reguladora de *rorf3* de diferentes organismos que contienen la isla LEE. Las regiones -10, -35 e inicios de transcripción se muestran en azul.

## DISCUSIÓN

*rorf3* es uno de los genes de la región LEE de los cuales se desconoce aún su función así como su regulación transcripcional. Recientemente, un estudio mostró que una mutante de *C. rodentium* que carece de este gen se encuentra afectada en la secreción de proteínas mediada por el sistema de secreción tipo III. Así, dada su importancia en la secreción de proteínas, podría esperarse que la expresión de *rorf3* estuviera acoplada al resto de los genes del LEE.

El objetivo de este estudio fue el determinar si la expresión de *rorf3* se regula por los mismos mecanismos que controlan la expresión de los demás genes del LEE. Para esto, nuestro análisis sobre la regulación genética de *rorf3* por medio de fusiones transcripcionales, reveló la existencia de regiones reguladoras dentro y fuera de la región intergénica entre *rorf3* y *grlR*. Por los datos obtenidos podemos concluir que en la fusión **pEPr3-4** existen elementos reguladores necesarios para la expresión de *rorf3* y estos se encuentran comprendidos entre las posiciones -498 a +435, con respecto al inicio de la transcripción de *rorf3*, esto se puede inferir ya que en cada una de las cuatro fusiones se obtuvieron distintos niveles de actividad de CAT sugiriendo así que entre esas coordenadas existen elementos reguladores tanto positivos como negativos que dirigen la expresión de *rorf3*.

La baja expresión de la fusión **pEPr3-4**, que contiene esta región reguladora, y en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, sugiere que el promotor de *rorf3* es un promotor débil. Además, la región comprendida entre las posiciones +123 a +435 y la comprendida entre las posiciones +123 a -498, con respecto al inicio de la transcripción de *rorf3*,

contiene elementos que contribuyen a la regulación positiva y negativa, respectivamente, de la expresión de *rorf3*, ya que con la remoción de algunas regiones se ve afectada la actividad de CAT; algunos estudios anteriores a este como el realizado por Bustamante *et al.*, 2001, y el realizado por Barba *et al.*, 2005 muestran ejemplos similares en los que existen elementos reguladores tanto en la región reguladora como en el gen estructural parecidos al mostrado en este estudio.

Distintos estudios han demostrado que Ler es un regulador positivo en la expresión de genes de virulencia de bacterias patógenas que ocasionan la lesión A/E (Elliot *et al.*, 2000, Bustamante *et al.*, 2001, Deng *et al.*, 2004, Barba *et al.*, 2005). La expresión de Ler es a su vez regulada por varias proteínas, como Ler y GrIA que se regulan de manera recíproca, formando un circuito de regulación positiva entre estas dos proteínas (Barba *et al.*, 2005). Nuestro análisis de la expresión de las fusiones *rorf3-cat* construídas, reveló que Ler y GrIA están involucradas en la regulación positiva de *rorf3*.

Sin embargo, en el análisis de las fusiones de la cepa  $\Delta ler$ , hay dos aspectos que resaltan el comportamiento de las fusiones; **pEPr3-2** y **pEPr3-4**, y es que en la región del gen estructural de *rorf3*, éste podría contener elementos involucrados en la regulación dependiente de Ler probablemente un sitio de pegado para esta proteína, y que la región estructural de *grlR* ejerce una represión importante sobre el promotor de *rorf3*, ya sea porque contiene motivos de unión para un represor o porque la porción de GrIR que se expresa es funcional y actúa como represor para el promotor de *grlA* tal como lo señala Deng *et al.*, 2004, Barba *et al.*, 2005.

En un estudio realizado en nuestro laboratorio por Bustamante *et al.* (2001), se caracterizó la región reguladora de los operones divergentes *LEE2* y *LEE3*, encontrando regiones silenciadoras que flanquean ambos promotores. Con la remoción de dichas regiones, la expresión de estos promotores se hace Ler independiente. lo que significa que las regiones aledañas al promotor juegan un papel importante en la regulación del gen en cuestión tanto positivamente como negativamente. Sin embargo para el caso de *rorf3*, llama la atención que a diferencia de la región *LEE2-LEE3*, la ausencia de las regiones que flanquean al promotor no lo hace Ler-independiente, ni aumentan sus niveles de expresión o por lo menos es lo que refleja la fusión mas corta utilizada en este estudio (**pEPr3-1**) y que, por el contrario, la presencia de la secuencia estructural de *rorf3* en la fusión **pEPr3-2**, que a su vez carece de secuencias corriente arriba , permite mayores niveles de activación que son dependientes de Ler (**Fig. 12A**). Esto sugiere que la fusión **pEPr3-1**, además de carecer de los elementos necesarios para la unión de Ler, podría contener los de un posible represor. Interesantemente, la actividad de la fusión **pEPr3-4**, que también contiene la región estructural de *rorf3*, requiere de Ler, pero su actividad es mucho menor, lo cual sugiere que existen secuencias corriente arriba del promotor que modulan negativamente su actividad. Recientemente, Barba *et al.* (2005), demostraron, por medio de ensayos de movilidad electroforética, que en *C. rodentium*, Ler se une a la región codificante de *rorf3*, lo que concuerda con los resultados mostrados en este estudio, ya que de acuerdo con los datos obtenidos para las fusiones **pEPr3-2** y **pEPr3-4**, es probable que el sitio de unión de Ler esté en la región codificante de *rorf3* en EPEC. Para confirmar lo anterior, sería importante identificar por medio de

ensayos de retardo de movilidad electroforética de DNA y de protección a DNasa I (“Footprinting”), los sitios de unión para Ler alrededor del gen *rorf3* en EPEC.

Algunos estudios señalan que distintos genes están controlados por señales ambientales como las presentes en los diferentes medios de cultivo (Martínez Laguna *et al.*, 1996, Puente *et al.*, 1996, Bustamante *et al.*, 2001).

Por los resultados obtenidos en el presente trabajo, podemos concluir que a diferencia de los demás genes de virulencia de EPEC, *rorf3* no es regulado negativamente en LB. Esta observación nos permite especular que el mecanismo de regulación de *rorf3* podría tener variantes sobre el resto de los genes porque su función es importante durante las etapas tempranas de la infección o tener una función adicional para la bacteria. Con base en lo anterior, y partir de nuestros resultados, proponemos averiguar por medio de fusiones más cortas a partir de la fusión **pEPr3-1** cuál es la secuencia mínima necesaria para que *rorf3* se transcriba más activamente en bacterias crecidas en medio rico LB.

Por otra parte los resultados reportados aquí, muestran que en la cepa mutante en H-NS se libera la expresión de *rorf3*, aunque en la fusión **pEPr3-4** es menor el efecto, indicando que H-NS regula negativamente a *rorf3*. Por los resultados mostrados pareciera ser que hacia el lado de *rorf3* existen elementos activadores o desrepresores y hacia el lado de *grlR* existen elementos represores, equilibrando el nivel de expresión lo cual se refleja en la actividad generada por la fusión **pEPr3-4 (Fig. 12B)**.

Cabe mencionar que en el año (2004) Deng *et al* describieron que *grlR*, el gen divergente a *rorf3*, codifica para un posible represor. Considerando que las

fusiones **pEPr3-3** y **pEPr3-4** contienen la mayor parte del gen estructural de *grlR*, podría dar lugar a una proteína activa, por lo que no podemos descartar la posibilidad de que la actividad de estas fusiones esté siendo en parte reprimida por GrIR directa o indirectamente. Esta posibilidad sería consistente con la menor actividad observada para estas fusiones, con respecto a la de **pEPr3-1** y **pEPr3-2**, aún en ausencia de H-NS. Sin embargo, se necesitan más estudios para definir si GrIR tiene un efecto a través de la represión que ejerce sobre la actividad del gen que codifica para Ler o en forma directa sobre el promotor de *rorf3*, así pues con el fin de entender mejor y delimitar bien esta zona de represión son necesarias fusiones más pequeñas a partir de la fusión más corta, **pEPr3-1**.

Otro aspecto que resultaría interesante analizar, sería la introducción de un codón de paro en *grlR* para verificar si GrIR está interfiriendo la expresión de *rorf3* ya que la fusión **pEPr3-4** no se libera completamente en ausencia de H-NS.

Como dato adicional se sabe que *rorf3* comparte la región intergénica divergente con el operón *grlRA*, que es de suma importancia para la regulación de la expresión de genes de virulencia de los organismos que generan la lesión de adherencia y destrucción (Deng *et al.*, 2004). Por lo que resultaría interesante analizar la regulación de estos genes en diferentes medios de cultivo como medio LB.

Con el fin de, eliminar la posibilidad que promotores alternativos pudieran estar alterando los resultados que se obtuvieron en este análisis , se realizó el primer extensión de la fusión **pEPr-1** y se comparó y con el promotor reportado anteriormente por Mellies *et al.*, (1999). El grupo de Mellies realizó un estudio

en el que identificaron los inicios de transcripción de distintos genes en la isla LEE. Dentro de estos se encontraba *rorf3*, para el cual determinaron que el inicio de transcripción del gen nativo en un residuo de **T**, una base corriente abajo del identificado en este estudio, que también es una **T**. Sin embargo, las cajas -10 y -35 de la secuencia promotora es, en ambos casos, la misma, por lo que el análisis por medio del "primer extensión" sirvió para comparar que tanto el promotor del gen cromosomal mostrado por Mellies et al., (1999) y el promotor encontrado en este estudio a partir del transcrito de una fusión, son los mismos sugiriendo que este promotor es dependiente del factor sigma 70.

Para finalizar cabe mencionar que Pallen *et al.* (2004), por medio de Bioinformática, proponen que el producto de *rorf3* es una transglicosilasa lítica y, por tanto, sugieren que se renombre como *etgA*. También señala que *EtgA* es necesario para abrir "huecos" en el péptidoglicano y así iniciar el proceso de ensamblaje y anclaje del SST3. La presencia de esta transglicosilasa dentro del sistema de secreción nos habla de un blanco potencial para el desarrollo de agentes antimicrobianos que inhiban específicamente el ensamblaje del sistema de secreción mediante la inactivación de dicha enzima. En su conjunto, los datos anteriormente mostrados se suman a la creciente información acerca de los procesos moleculares involucrados en la regulación de distintos genes de virulencia de EPEC y apoyan la noción de que la regulación del LEE requiere procesos de regulación complejos y coordinados en espacio y tiempo, donde señales ambientales específicas juegan un papel crucial para que el desarrollo de la lesión A/E se lleve a cabo mostrando así que la isla LEE posee particularidades que la hacen un modelo muy interesante de estudio.



## CONCLUSIONES

En este trabajo se logró la identificación del inicio de transcripción de de la fusión *rorf3-cat*, la cual corresponde a una **T**, 70 pares de bases corriente arriba del ATG y sus respectivas regiones -10 (TATACT) y -35 (TTGCAA).

El análisis de la secuencia reguladora de tres especies de patógenos altamente relacionados nos muestra que la región reguladora está muy conservada.

El análisis del nivel de expresión a partir de la región reguladora de *rorf3* indicó que su regulación involucraba elementos en *trans* como Ler, H-NS y GrIA.

El análisis reveló que H-NS y GrIA tienen efecto negativo y positivo respectivamente además Ler y GrIA son necesarios para una expresión óptima de *rorf3*.

El medio de cultivo rico no reprime la expresión *rorf3* a diferencia de otros genes relacionados con la virulencia en EPEC.

## PERSPECTIVAS

Dados los resultados del presente trabajo, surgen algunas interrogantes cuyas respuestas ayudarían en gran medida a entender mejor la regulación de *rorf3*, y estas son:

- Generar una cepa E2348/69 mutante en *rorf3* y analizarla mediante experimentos de secreción de proteínas.
- Realizar geles de retardo (EMSA) de la región reguladora de *rorf3* con las proteínas involucradas en la regulación de *rorf3* (Ler, Gr1A y H-NS)
- Ensayos de protección a la acción de la DNasa I con H-NS, Ler y Gr1A, para delimitar los sitios de pegado de cada proteína en el promotor de *rorf3*.
- Generar más fusiones transcripcionales de la región reguladora de *rorf3*.
- Realizar experimentos de actividad con la fusión *rorf3-cat* en mutantes sencillas y dobles como:  $\Delta grlR, \Delta ler \Delta hns$ ,  $\Delta ler \Delta grlA$ ,  $\Delta grlR \Delta grlA$

## BIBLIOGRAFIA

- Allaoui, A., R. Menard., P.J. Sansonetti, and C. Parsot.** (1993). Characterization of the *Shigella flexneri* *ipgD* and *ipgF* genes, which are located in the proximal part of the *mxi* locus. *Infect. Immun.* **61**:1707-14.
- Altschul, S.F et al.** (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**:403-410.
- Barba, J., V.H., Bustamante, M.A., Flores-Valdez, W., Deng, B.B. Finlay, J.L., Puente.** (2005). A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *J. Bacteriol.* **187**:7918-30.
- Barnett-Foster, D., D. Philpott, M. Abul-Milh, M. Huesca, and C.A., Lingwood.** (1999). Phosphatidylethanolamine recognition promotes enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* host cell attachment. *Microbiol. Pathog.* **5**:289-301.
- Blattner, F.R., G.I. Plunkett., C.A. Bloch., N.T. Perna., V. Burland, and M. Riley., et al.** (1997). The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **28**: 1453-1474.
- Brosius, J.,** (1984). Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene.* **27**:151-60.
- Browning, D.F., and Busby, S.J.** (2004).The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:57-65.
- Bustamante, V.H., E. Calva, and J.L. Puente.** (1998). Analysis of the promoter and *cis*-acting elements involved in the BfpT-dependent expression of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**: 3013-3016.
- Bustamante, V.H., F.J., Santana, E. Calva, and J.L. Puente.,** (2001).Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol. Microbiol.* **39**:664.
- Buttner, D., and U. Bonas.** (2002). Port of entry--the type III secretion translocon. *Trends Microbiol.* **4**:186-92.
- Campellone, K.G., A. Giese., D.J. Tipper, and J.M Leong.** (2002). A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. *Mol. Microbiol.* **5**:1227-41.
- Celli, J., W. Deng, and B.B. Finlay.** (2000). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cell Microbiol.* **32**:1.

-Chen, CH., L.C. Lin., C.E. Liu, and T.G. Young. (2003 ). *Chromobacterium violaceum* bacteremia: a case report. J. Microbiol. Immunol. Infect. **36**:141-4.

-Clarke, S.C., R.D. Haigh., P.P. Freestone, and P.H. Williams. (2002). Enteropathogenic *Escherichia coli* infection: history and clinical aspects. Br. J. Biomed. Sci. **59**:123-7.

-Clarke, S.C., R.D. Haigh., P.P. Freestone, and P.H. Williams. (2003). Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. Clin. Microbiol. **3**:365-78.

-Cravioto, A., A. Tello., A. Navarro., J. Ruiz., H. Villafan., Uribe, F, and C. Eslava. (1991). Association of *Escherichia coli* HEP-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. Lancet. **337**:262-4.

-Daniell, S. J., E. Kocsis., E. Morris., S. Knutton., F. P. Booy, and G. Frankel. (2003). 3D structure of EspA filaments from enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. **49**:301.

-Deng, W., J.L., Puente, and S. Gruenheid.,(2004). Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **101**:3597-602.

-Deng, W., Y. Li., B.A. Vallance, and B.B. Finlay. (2001). Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. Infect. Immun. **69**:6323-35.

-Dersch, P., K. Schmidt, and E. Bremer (1993). Synthesis of the *Escherichia coli* K-12 nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is subjected to growth-phase control and autoregulation. Mol. Microbiol. **5**:875-89.

-Donnenberg, M.S, and J.B. Kaper. (1992). Enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **60**:3953-61.

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

-Dorman, C.J. (2004). H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. Nat. Microbiol. **2**:391-400.

-Dorman, J.C., J.S. Smith. -Donnenberg, M.S., J.B. Kaper, and B.B. Finlay. (2001) Regulation of virulence gene expression in bacterial pathogens. Principles of bacterial pathogens. **75**:117.

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

**-Edwards, R.A., and J.L. Puente.** (1998). Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *Trends Microbiol.* **7**:282-7.

**-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.

**-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.* **1**:1-4.

**-Elliott, S.J., V. Sperandio, and J.A. Giron., et al.** (2000). The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **68**:6115-26.

**-Elliott, S.J., L.A. Wainwright, and T.K. McDaniel., et al.** (1998). The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69 *Mol. Microbiol.* **28**:1.

**-Falconi, M., B. Colonna., G. Prosseda., G. Micheli., 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.* **23**:7033-43.

**-Farmer III, J.J., and M.T. Kelly.** Enterobacteriaceae. En: *Manual of Clinical Microbiology* 5<sup>th</sup> edition. 1991. Editores: Ballows, A., W.J. Hausler Jr. K.L. Hermann, H.D. Isenberg, and H.J. Shadomy. American Society for Microbiology, Washington DC: 360-383.

**-Finlay, B.B., and S. Falkow.** (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol.* **61**:136–169.

**-Finlay, B.B., R.E., Hancock.** (2004). Can innate immunity be enhanced to treat microbial infections? *Nat. Rev. Microbiol.* **6**:497-504.

**-Frankel,G., O. Lider, R. Hershkoviz., et al.** (1996).The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *escherichia coli* binds  $\beta_1$  integrins. *J. Biol. Chem.* **34**:20359-64.

**-Friedberg, D., T. Umanski., Y. Fang, and I. Rosenshine.** (1999). Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **34**:941-52.

**-Girón, J.A., A.S. Ho, and G.K. Schoolnik.** (1991). An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**:710-13.

**-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**:549–55.

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

**-Goyard, S., P. Bertin.** (1997). Characterization of BpH3, an H-NS-like protein in *Bordetella pertussis*. *Mol Microbiol.* **4**:815-23.

**-Gruenheid, S., R. DeVinney., F. Bladt., D. Goosney., S. Gelkop., G.D. Gish., T. Pawson, and B.B. Finlay.** (2001) Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nat. Cell. Biol.* **3**:856-9.  
**-Hinton, J.C.** (1997).The *Escherichia coli* genome sequence: the end of an era or the start of the FUN? *Mol. Microbiol.* **26**:417-22.

**-Jerse, A.E., W.C., Martin, J.E. Galen, J.B Kaper.** (1990). Oligonucleotide probe for detection of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor of localized adherent EPEC. *J. Clin. Microbiol.* **28**:2842-4.

**-Jerse, A. E., and J. B. Kaper.** (1991). The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect. Immun.* **59**: 4302–4309.

**-Sekiya Kachiko, Minako Ohishi, Tomoaki Ogino, Koichi Tamano, Chihiro Sasakawa, and Akio Abe.** (2001). Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc. Natl. Acad Sci USA* **98**: 11638-11643.

**Kalman, D., O.D, Weiner., Goosney, D. L., Sedat, J. W., Finlay, B. B., Abo, A. and Bishop, J. M.** (1999). Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. *Nat. Cell Biol.* **1**: 389 – 391.

**-Kaper, J.B.** (1998). EPEC delivers the goods. *Trends Microbiol.* ;**6**:169-72;

**Kenny, B., and B. B. Finlay.** (1997). Intimin-dependent binding of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase. *Infect. Immun.* **65**:2528-2536.

**-Khursigara C, Abul-Milh ., B. Lau., J.A. Giron., C.A. Lingwood, and D.E. -Foster.** (2001). Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence factor bundle-forming pilus has a binding specificity for phosphatidylethanolamine. *Infect Immun.* **69**:6573-9.

**-Knutton, S., R.K. Shaw, R.P. Anantha, M.S. Donnenberg, and A.A. Zorgani.** (1999). The type IV bundle- forming pilus of enteropathogenic *E. coli*.

undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. *Mol. Microbiol.* **33**:499-509.

**-Lawrence, J.G and, H. Ochman.** (1998). Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:9413-7.

**-Levine, M.M.** (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**:337-389

**-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.

**-McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper.** (1995). A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:1664-1668.

**-McDaniel, T. K., and J. B. Kaper.** (1997). A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **23**:399-407.

**-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.

**-Miller, V. L., and S. Falkow.** (1988). Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.* **56**: 12421248.

**-Miras, I., D. Hermant., N. Arricau, and M.Y. Popoff.** (1995). Nucleotide sequence of *iagA* and *iagB* genes involved in invasion of HeLa cells by *Salmonella enterica* ssp. *enterica* ser. Typhi. *Res. Microbiol.* **28**: 17-20.

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

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

**-Plano, G. V., J.B. Day, and F. Ferracci.** (2001). Type III export: new uses for an old pathway – *Mol. Microbiol.* **40**,:284-293.

**-Puente, J. L., D. Bieber., S. W. Ramer., W. Murray, and G. K. Schoolnik.** (1996). The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol. Microbiol.* **20**:87-10.

- Puente, J.L., and B.B. Finlay.** (2001). Pathogenic *Escherichia coli*. Principles of bacterial pathogenesis. 387-428.
- Reyrat, J.M., and J.L. Telford.** (1999). When microbes and cells meet. Trends Microbiol. **7**:187-8.
- Ribeiro, A.T., Brazilian National Genome Project Consortium.** (2003). The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **30**:11660-5.
- Rimsky, S., F. Zuber., M. Buckle, and H. Buc.** (2001). A molecular mechanism for the repression of transcription by the H-NS protein. Mol. Microbiol. **42**: 1311.
- Sanchez-SanMartin, C., Bustamante, V.H., Calva, E., Puente, J.L.** (2001). Transcriptional regulation of the *orf19* gene and the *tir-cesT-eae* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. J.Bacteriol. **183**:2823-2833.
- Shaw, R.K., S. Daniell., F. Ebel., F Gad., and S. Knutton.** (2001). EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells. Cell. Microbiol.**3**:213-222.
- 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.
- Skerker, J.M., and H.C. Berg.** (2001). Direct observation of extension and retraction of type IV pili. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **98**: 69016904.
- Sperandio, V., Mellies, J.L., Nguyen, W., Shin, S., and James B. Kaper.** (1999). Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. **26**: 15196–15201.
- Sperandio, V., C.C. Li, and J.B. Kaper.** (2002). Quorum-sensing *Escherichia coli* regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic *E. coli*. Infect Immun. **70**:3085-93.
- Spitz, J., R. Yuhan, A. Koutsouris, C. Blatt, J. Alverdy, and G. Hecht.** 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial monolayers diminishes barrier function. Am. J. Physiol. **268**:G374-G379.
- Stein, M. A., D. A. Mathers, H. Yan, K. G. Baimbridge, and B. B. Finlay.** - (1996). Enteropathogenic *Escherichia coli* markedly decreases the resting membrane potential of Caco-2 and HeLa human epithelial cells. Infect. Immun. **64**:4820-4825.
- Tendeng, C., and P.N. Bertin.** (2003). H-NS in gram negative bacteria: a family of multifaceted proteins. Trends Microbiol.**11**:511-518.

**-Tobe, T., G.K., Schoolnik, I., Sohel, V.H., Bustamante and J.L. Puente.** (1996). Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**:963-75.

**-Vallance, B.A, and B.B. Finlay.** (2000). Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1**:8799-806.

