

“Identificación y caracterización de NleH, una nueva proteína efectora
codificada fuera del LEE en *Citrobacter rodentium*”

TESIS DE DOCTORADO

M.C. Víctor Antonio García Angulo

Tutor: Dr. José Luis Puente García

Departamento de Microbiología Molecular

Instituto de Biotecnología



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.

A Brenda y René

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, y en particular a mi mamá.

A José Luis. Por ser un gran tutor, no solamente en la academia.

A mi comité tutorial, Dra. Susana López y Dr. Joaquín Sánchez. Gran parte de este trabajo se debe a sus contribuciones.

Al jurado de tesis, que revisó y enriqueció la versión final de este trabajo. Dr. Mario Soberón, Dra. Katy Juárez, Dra. Bertha González Pedrajo y Dr. Miguel Ángel Cevallos.

A Rocío Baños y Alejandro Huerta, quienes me brindaron apoyo técnico esencial para el desarrollo de este proyecto.

A todos los miembros del laboratorio Calva-Puente. De manera especial a las personas con quienes compartí más tiempo y experiencias: Ale, Amapola, Víctor, Elvira, Vero, Miguel, Luary, El pelón, Rafael, Rosalva, Ricardo, Ana, Elisa, Carmen, Magdalena, Pancho, Edú, Paty, Ismael y Omar.

A los compañeros de ruta: Viviana, Andrés, Ángeles, Sergio, Mariana Gutiérrez, Alejandro, Gina, Josué, Daniela y Luis Lozapo.

El presente proyecto se realizó en el departamento de Microbiología del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. José Luis Puente García.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dr. Joaquín Sánchez Castillo

Dra. Susana López Charretón

Dr. José Luis Puente García

El jurado de tesis estuvo integrado por:

Dra. Katy Juárez López

Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos

Dra. Bertha González Pedrajo

Dr. Mario Soberón Chávez

Dr. José Luis Puente García

Durante el desarrollo de este trabajo recibí una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 157392), y la beca “Hugo Aréchiga Urtuzuástegui” de disertación doctoral, otorgada por El Colegio de Sinaloa.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	6
2.1. Organización y regulación transcripcional de los genes del LEE	6
2.2. Proteínas efectoras de los patógenos A/E	8
2.2.1. Proteínas efectoras codificadas en el LEE	8
2.2.2. Proteínas efectoras codificadas fuera del LEE	11
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVOS	19
4.1. Objetivo general	19
4.2. Objetivo particular	19
4.3. Objetivos específicos	19
5. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6. RESULTADOS	29
6.1. Análisis de la secreción de NleH	29
6.2. Análisis de la translocación de NleH	32
6.3. Análisis de la regulación de NleH	34
6.4. Regulación post-traducciona l de NleH por la proteasa Lon	40
6.5. Análisis del papel <i>in vivo</i> de NleH en <i>C. rodentium</i>	42
7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	44
8. PERSPECTIVAS	52
9. BIBLIOGRAFÍA	53

LISTA DE ABREVIATURAS

SST3	Sistema de secreción tipo III
A/E	Adherencia y esfacelamiento (“ <i>Attaching and effacing</i> ”)
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
LEE	Locus de esfacelamiento del enterocito
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
LB	Luria-Bertani
SFB	Suero fetal bovino
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-Dodecil sulfato de sodio
CAT	Cloranfenicol acetil transferasa
ANDEVA	Análisis de varianza
Nle	Efactor codificado fuera del LEE (“ <i>Non-LEE-encoded effector</i> ”)
MDI	Multiplicidad de infección
HA	Hemaglutinina

RESUMEN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y *Citrobacter rodentium* son miembros de la familia de patógenos “attaching and effacing”, o adherencia y esfacelamiento (A/E). Estos patógenos utilizan un sistema de secreción tipo 3 (SST3) para translocar una serie de proteínas llamadas efectores, codificados dentro y fuera de la isla de patogenicidad LEE, hacia la célula epitelial colonizada, produciendo la formación de lesiones A/E, y el establecimiento de la enfermedad. En este trabajo se identificó y se caracterizó a NleH, un nuevo efector codificado fuera del LEE en *C. rodentium*. NleH está conservado en todos los patógenos A/E, y comparte identidad con OspG, un efector secretado por el SST3 en *Shigella flexneri*. El gen *nleH* está codificado corriente arriba de *espJ* y *nleI/nleG*, los cuales codifican para proteínas efectoras. La translocación de NleH hacia células epiteliales Caco-2 en cultivo requiere un SST3 funcional y señales localizadas en el extremo amino terminal de la proteína. NleH se regula por una vía post-traducciona que involucra la degradación específica por la proteasa Lon, dependiente de los reguladores codificados en el LEE, la cual acopla la estabilidad de NleH con el estado funcional del SST3. Una mutante en *nleH* en *C. rodentium* presenta una deficiencia moderada para colonizar el colon de ratones en etapas tempranas. Sin embargo, es capaz de colonizar a niveles silvestres en etapas posteriores.

ABSTRACT

Together with enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), *Citrobacter rodentium* is a member of the “attaching and effacing” (A/E) family of bacterial pathogens. A/E pathogens use a type III secretion system (T3SS) to translocate an assortment of effector proteins, encoded both within and outside the locus of enterocyte effacement (LEE), into the colonized host cell leading to the formation of A/E lesions and disease. Here we report the identification and characterization of a new non-LEE encoded effector NleH in *C. rodentium*. NleH is conserved among A/E pathogens and shares identity with OspG, a type III secreted effector protein in *Shigella flexneri*. Downstream of *nleH*, genes encoding homologues of the non-LEE-encoded effectors EspJ and NleG/NleI are found. NleH secretion and translocation into Caco-2 cells requires a functional T3SS and signals located at its amino terminal domain. Transcription of *nleH* is not significantly reduced in mutants lacking the LEE-encoded regulators Ler and GrlA; however, NleH protein levels are highly reduced in these strains, as well as in *escN* and *cesT* mutants. Inactivation of Lon, but not ClpP, protease restores NleH levels even in the absence of CesT. Our results indicate that the efficient engagement of NleH to active secretion is needed for its stability, thus establishing a post-translational regulatory mechanism that co-regulates NleH levels with the expression of LEE-encoded proteins. A *C. rodentium nleH* mutant shows a moderate defect during the colonization of C57BL/6 mice at early stages of infection.

1. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es la bacteria anaerobia facultativa Gram-negativa más común en la microbiota intestinal humana. En condiciones normales, esta bacteria como comensal coloniza la capa mucosa del colon. Esta interacción produce beneficios tanto para la bacteria como para el hospedero, como son la producción de nutrientes esenciales y la modulación adecuada de la respuesta inmune. Sin embargo, durante la evolución de esta bacteria se han generado cepas que poseen características distintivas que las hacen patógenas para el hospedero, principalmente mediante la adquisición de nuevo material genético por eventos de transferencia horizontal, a través de plásmidos, fagos, o islas de patogenicidad, que también pueden acompañarse de la pérdida de función de genes con características de “antivirulencia” (revisado en (54, 62)). Estos nuevos atributos le pueden conferir a la bacteria un incremento en su habilidad para adaptarse a nuevos nichos, permitiéndole colonizar tejidos específicos, y causar un amplio espectro de enfermedades. Existen tres síndromes clínicos generales que pueden resultar de la infección de patotipos de *E. coli*: enfermedad entérica/diarrea, infecciones del tracto urinario y sepsis/meningitis. Dentro de las cepas patógenas intestinales existen seis categorías o patotipos definidos por sus factores de virulencia, histopatología y patrones de adherencia a las células hospederas: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* difusoadherente (DAEC) (revisado en (10, 38)).

Las cepas de EPEC y EHEC causan comúnmente diarrea infecciosa en humanos (10, 73). EPEC es la principal causa de diarrea acuosa bacteriana en niños menores de seis meses en países en vías de desarrollo, y se estima que en México uno de cada cinco niños con diarrea está infectado por EPEC (80), mientras que EHEC es responsable de brotes de diarrea y colitis

hemorrágica en países del primer mundo. En casos graves, la infección por EHEC puede causar el síndrome urémico hemolítico, a veces fatal, debido a la actividad de una o más toxinas tipo Shiga. EPEC y EHEC pertenecen a un grupo de patógenos con características específicas, llamado familia de patógenos A/E. Los patógenos A/E se caracterizan por colonizar el tracto intestinal de sus hospederos de manera extracelular, y por la formación de una histopatología denominada lesión A/E (“attaching and effacing” o adherencia y esfascelamiento) (revisado en (8)). La lesión A/E consiste en la eliminación localizada de las microvellosidades del enterocito, y la acumulación de proteínas del citoesqueleto hospedero, principalmente actina, bajo el sitio de adhesión de la bacteria, formando una estructura de pedestal (8). El estudio *in vivo* de los mecanismos de la enfermedad causada por EPEC y EHEC en humanos ha sido difícil de realizar, debido a la incapacidad de estos patógenos para colonizar con eficiencia animales de laboratorio. Debido a esto, se ha utilizado a *Citrobacter rodentium*, un patógeno que de manera natural coloniza ratones y es capaz de causar la lesión A/E, como un modelo adecuado para estudiar las interacciones patógeno-hospedero que se establecen durante la infección por EPEC y EHEC en humanos, y conllevan al establecimiento de la enfermedad (19, 57).

C. rodentium se identificó inicialmente como la causa de epidemias de diarrea con alta mortalidad en colonias de ratones de laboratorio. En este hospedero, no todos los aislados de *C. rodentium* son capaces de producir diarrea, sin embargo, causan una enfermedad conocida como hiperplasia de colon transmisible, la cual se caracteriza por la hiperproliferación reversible de las células de colon y prolapso rectal (57).

Una característica de importancia fundamental en la virulencia de los patógenos A/E es la expresión de un sistema de secreción tipo 3 (SST3) (18, 19). El SST3 es un organelo utilizado por una variedad de bacterias Gram-negativas, tanto patógenas como simbioses de animales y

plantas, que funciona durante la interacción bacteriana con la célula eucariote como una jeringa molecular para inyectar una serie de proteínas, llamadas proteínas efectoras, directamente en el citosol de la célula eucariota (revisado en (29)). Las proteínas efectoras son responsables de alterar vías de transducción de señales en el hospedero, promoviendo la sobrevivencia de la bacteria y el establecimiento de la enfermedad (15). El SST3 está conservado y es esencial para la virulencia en patógenos de humano como *Salmonella enterica*, *Shigella* spp, *Yersinia* spp, *Bordetella* spp y *Vibrio parahemolyticus*, entre otros, así como en los patógenos de plantas *Pseudomonas solanacearum*, *P. syringae*, *Erwinia* spp y *Xantomonas* spp. Sin embargo, el SST3 también tiene una función en interacciones no patógenas, ya que está conservado en los simbiontes de plantas *Rhizobium* spp NGR234, *Mesorhizobium loti*, *Bradyrhizobium japonicum* y el simbionte de la mosca Tsetse, *Sodalis glossinidius* (revisado en (29, 61)).

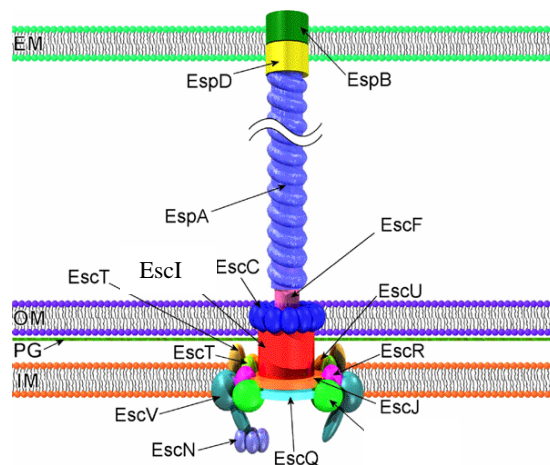


Fig. 1. Representación esquemática del SST3 de los patógenos A/E (Modificada de (Pallen y col. 2005)).

En los patógenos A/E EPEC, EHEC y *C. rodentium*, el SST3 consta esencialmente de una estructura basal compuesta de dos anillos que atraviesan las membranas interna y externa de la

bacteria, un puente cilíndrico que comunica ambos anillos a través del periplasma, una proteína que forma una aguja en la parte distal del secretoma, y un filamento característico del SST3 de los patógenos A/E (Fig. 1). El anillo de membrana interna está compuesto principalmente por la proteína EscJ, la se propone forma un parche de membrana requerido para el reclutamiento del resto de las proteínas transmembranales que forman el anillo de membrana interno, EscR, EscS, EscT, EscU y EscV (84). La proteína EscC forma parte de la familia de secretinas, involucradas en el transporte de moléculas a través de la membrana externa mediante la formación de un complejo multimérico en forma de anillo (revisado en (25)). El bastón cilíndrico interior que conecta los anillos de membrana interna y externa pudiera estar formado por la proteína EscI (61). La proteína EscN es una ATPasa que interactúa con la parte basal del SST3, y es capaz de proveer la energía necesaria para la secreción mediante la hidrólisis de ATP. En el extremo distal del complejo basal del SST3, se encuentra una estructura extracelular que semeja una aguja, compuesta por la proteína EscF, que proyecta un canal requerido para la secreción tipo 3. La característica específica del SST3 de los patógenos A/E es la presencia de un filamento hueco que funciona como una extensión de la aguja, constituido por la proteína EspA, secretada a través del complejo de aguja. Las proteínas EspB y EspD se secretan a través del SST3, se localizan en la membrana de la célula hospedera, y se ha propuesto que forman una estructura de poro, denominada *translocón*, conservada en todos los SST3. Este poro asegura la continuidad del sistema a través de la membrana eucariota (revisado en (15, 25)). SepD y SepL se asocian a la parte basal del secretoma, y participan en la formación de un sistema que regula la especificidad de la secreción tipo 3. Mutaciones en *sepD* o *sepL* eliminan la secreción de proteínas translocadoras, y aumentan la secreción de proteínas efectoras (17, 19). Un estudio demostró que las proteínas SepD y SepL interactúan entre sí, y se localizan principalmente en la membrana interna. Además, el efecto en los niveles de

secreción de las proteínas efectoras y translocadoras en las mutantes se lleva a cabo sin afectar la transcripción de sus respectivos genes (17).

Los genes requeridos para la formación de la lesión A/E están codificados en una isla de patogenicidad llamada *LEE* (“Locus of enterocyte effacement”), conservada en los genomas de EPEC, EHEC y *C. rodentium*. En esta isla se encuentran los genes estructurales que codifican para las proteínas requeridas para el ensamblaje del SST3. En el LEE, además, están codificadas algunas de las proteínas secretadas por el SST3, reguladores transcripcionales, reguladores de la secreción tipo 3 y chaperonas (18, 19).

2. ANTECEDENTES

2.1. Organización y regulación transcripcional de los genes del LEE.

Se ha reportado que los genes del LEE se encuentran organizados en al menos seis operones (10): *LEE1*, *LEE2* y *LEE3* contienen los genes que codifican los componentes estructurales del SST3. En el operón *LEE4* están codificadas las proteínas translocadoras. El operón *LEE5* codifica para los genes que participan en la adherencia íntima, *tir*, *eae* (intimina), y la chaperona de efectores *cesT* (10, 56). Además, el operón *grlRA* codifica para las proteínas reguladoras GrlR y GrlA, las cuales funcionan como represor y activador de la transcripción de los genes del LEE, respectivamente (3, 19)(Fig. 2).

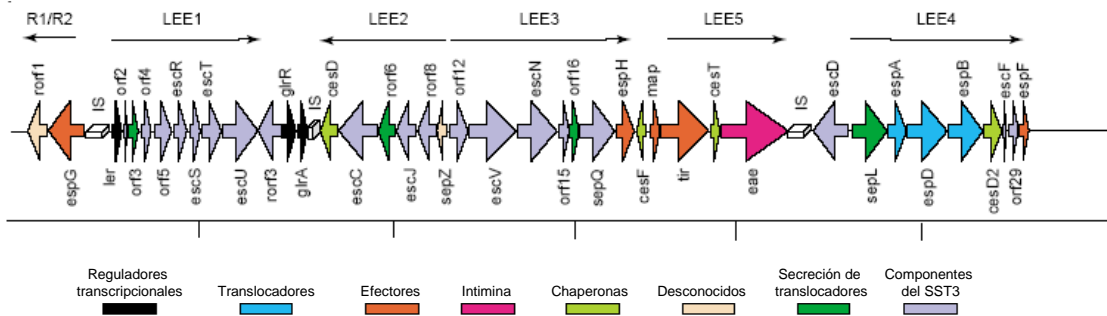


Figura 2. Organización de los genes de la isla de patogenicidad LEE en EPEC. (Modificado de (15)).

Como sucede en muchos sistemas de virulencia en bacterias patógenas Gram-negativas, H-NS posee un papel crucial en la regulación negativa de los genes del LEE (4, 79). En EPEC se ha demostrado que H-NS se une directamente a las regiones reguladoras de *LEE1*, *LEE2*, *LEE3* y *LEE5*, reprimiendo su transcripción (4, 68, 79). Ler, la proteína de 15.1 kDa codificada en el primer gen del operón *LEE1*, posee identidad con H-NS, y es el regulador transcripcional positivo maestro para la expresión de los genes de la isla (revisado en (56)). Ler promueve la

transcripción de los operones *LEE2*, *LEE3*, *LEE4* y *LEE5*, así como la de los genes *espG*, *escD* y *map* en la isla LEE (56). Se ha propuesto que Ler actúa revirtiendo el efecto de represión ejercido por H-NS. En EPEC, Ler se une a las mismas regiones corriente arriba de *LEE2* y *LEE5* a las que se une H-NS, lo que sugiere que Ler desplaza a H-NS para deshacer los complejos núcleo-proteicos de H-NS que mantienen apagada la transcripción (4, 32, 79). En EPEC, una cepa deficiente en Ler y H-NS es capaz de expresar los genes del LEE, lo que indica que Ler no actúa como un activador transcripcional clásico, sino como un desrepressor (4).

La proteína GrlA, codificada en el operón bicistrónico *grlRA*, es necesaria para la transcripción de *ler* (19). Un estudio realizado en nuestro grupo confirmó el papel de regulador positivo de GrlA para la expresión de *ler* en *C. rodentium*, y también demostró que Ler a su vez, se requiere para la expresión de *grlA*, lo que reveló la existencia de un circuito regulador que controla la expresión óptima de *ler*, y asegura la correcta expresión espacio-temporal de los genes del LEE (3). GrlR, la otra proteína codificada en el operón *grlRA*, posee un papel negativo en la regulación del LEE, pues cuando el gen está presente en multicopia, es capaz de reprimir la transcripción de los genes de la isla (19), y en una mutante en *grlR* de EHEC aumenta la expresión de los genes del LEE en condiciones de crecimiento que normalmente la reprimen (48).

Además de GrlA, otros factores reguladores tanto globales como específicos de patógenos A/E son capaces de regular a *ler*. Fis, IHF, BipA, y QseA tienen un papel positivo en la regulación de *ler*, el cual es inducido también por ppGpp, mientras que H-NS, Hha y GadX reprimen su transcripción (revisado en (56)). PerC, una proteína codificada en el plásmido de alto peso molecular EAF, de EPEC, es capaz de activar la expresión de Ler (4, 30, 63). EHEC no es portadora del plásmido EAF, sin embargo se han localizado cuatro homólogos de PerC

codificados en el cromosoma, algunos de los cuales son capaces de regular positivamente a *ler* (35).

Ler también regula la expresión de factores relacionados a la patogénesis codificados fuera de la isla LEE. En EPEC, Ler activa la expresión de la enterotoxina EspC, la cual es un autotransportador que se secreta por la vía de secreción tipo V, y se transloca hacia la célula epitelial (24). En EHEC, se ha demostrado que Ler regula la expresión de la fimbria polar larga, la cual es necesaria para la colonización eficiente de corderos (36, 77).

Los datos obtenidos con la regulación de los factores de virulencia de los patógenos A/E indican que la regulación de la isla de patogenicidad LEE es muy compleja, y que involucra múltiples señales y proteínas reguladoras, que convergen en la regulación de la expresión de Ler, la cual actúa como regulador maestro de la expresión del SST3 y el fenotipo A/E.

2.2 Proteínas efectoras de los patógenos A/E.

2.2.1 Proteínas efectoras codificadas en el LEE.

Además del SST3 y las proteínas reguladoras, seis proteínas efectoras, **Tir**, **Map**, **EspF**, **EspH**, **EspG** y **EspZ**, están codificadas en la isla LEE (revisado en (15)). Hasta la fecha, la proteína efectora de los patógenos A/E más estudiada es el receptor translocado de intimina, Tir (*translocated intimin receptor*). Esta proteína se integra en la membrana plasmática del enterocito después de su translocación, mediante dos dominios transmembranales, quedando sus extremos amino y carboxilo terminal localizados en el citosol (revisado en (7)). Una vez insertada en la membrana eucariota, Tir funciona como receptor de la intimina, una proteína de membrana externa bacteriana, a través de su dominio central expuesto (40). Este modelo es el único descrito hasta la fecha en donde una bacteria transloca una proteína que funciona como su receptor. La interacción Tir-intimina activa las vías de señalización que generan la

acumulación de actina en pedestales, y el fenotipo de adherencia íntima entre la bacteria y la célula epitelial. En EPEC, Tir es fosforilada en un residuo de tirosina por tirosin-quinasas del hospedero, lo cual genera un sitio de interacción para el dominio SH2 de la proteína adaptadora eucariota Nck. Nck recluta a la proteína N-WASP, que a su vez estimula la polimerización de actina mediada por el complejo Arp2/3 (revisado en (7, 15)). Tir desempeña un papel esencial para la colonización de ratones por *C. rodentium* y en EPEC es la única proteína efectora indispensable para la formación de los pedestales de actina (19, 20).

Map es un efector que se localiza en la mitocondria del hospedero mediante una señal de localización y procesamiento mitocondrial que yace hacia el extremo amino terminal de la proteína, donde afecta el potencial de membrana y altera la morfología y la función de respiración mitocondrial (15). Map también se ha involucrado en la alteración del funcionamiento de la barrera intestinal, mediante una función independiente de su localización mitocondrial (14). La proteína Map, además, promueve la formación de filopodios transitorios dependientes de Cdc42 en la membrana del hospedero, una actividad que antagoniza Tir (41, 71); asimismo interactúa con la proteína EBP50/NHERF1, la cual regula la actividad de NH3, un intercambiador intestinal de Na^+/H^+ (71). Una mutación en *map* de *C. rodentium* produce una ligera atenuación en la colonización de ratones, y una disminución en la severidad de la diarrea medida por la cantidad de agua en heces fecales (19, 65, 71). En EHEC, una mutación en *map* no afecta significativamente su capacidad de colonizar el tracto intestinal de conejos infantiles ni la severidad de la enfermedad (65).

EspF se transloca al citoplasma del enterocito y también se localiza en la mitocondria mediante una señal en el extremo amino terminal (59). EspF participa en la pérdida de la resistencia *trans*-epitelial, y produce una redistribución de la proteína ocludina, la cual en condiciones normales se encuentra asociada a las uniones estrechas (15). En la mitocondria EspF induce la

liberación de citocromo *c* y el procesamiento de las caspasas 9 y 3, lo que indica que tiene un papel en la inducción de la vía de muerte mitocondrial (60). Una mutante en *espF* produce una reducción moderada en la colonización de ratones en *C. rodentium* en etapas tempranas de la infección y en el grado de hiperplasia (19). En el modelo de infección de conejos infantiles por EHEC, una mutación en *espF* también produce una reducción moderada en los niveles de colonización del tracto intestinal, y una respuesta inflamatoria ligeramente mayor en el colon, evidenciada por una mayor infiltración de células polimorfonucleares (65). Un estudio reciente reportó un efecto cooperativo de Tir, Map y EspF en la producción de un mecanismo diarreogénico, en donde participan inhibiendo la actividad del cotransportador de sodio-D-glucosa (SGLT-1) (16).

EspG comparte 21% de identidad con el efector VirA de *Shigella flexneri*, y al igual que VirA, participa en la desestabilización de la red de microtúbulos, debajo del sitio de adhesión de la bacteria (15). Un trabajo reciente demostró que EPEC es capaz de inhibir la actividad de intercambio de Cl⁻/OH⁻ en la membrana *in vitro* e *in vivo* reduciendo la expresión del intercambiador de aniones mayoritario DRA (64). El decremento en la absorción de Cl⁻ en células epiteliales en cultivo es dependiente de EspG y de su homólogo codificado fuera del LEE, EspG2 (64). La mutación en *espG* produce reducciones leves en la colonización en el modelo de infección por EPEC en conejos, y de *C. rodentium* en ratones (19, 25), y un ligero decremento en los niveles de colonización del ileum por EHEC en conejos infantiles, sin afectar la severidad de la enfermedad (65).

EspH se localiza en la membrana celular del hospedero, y tiene un papel en la regulación negativa de la formación de filopodios transitorios inducidos por EPEC, y en la elongación de los pedestales de actina (78). La expresión de EspH en levaduras produce un aumento en los niveles de fosforilación de la MAP cinasa Slk2, que opera en la vía de integridad celular (66),

pero la relevancia biológica de esta actividad no se conoce. Una mutante en *espH* de *C. rodentium* muestra una ligera atenuación en la colonización de ratones, sin embargo, en el modelo de infección de conejos infantiles por EHEC, la mutación en *espH* produce una disminución en la colonización a lo largo del tracto intestinal, y afecta moderadamente la producción de diarrea (19, 65).

EspZ se transloca hacia la célula epitelial, en donde colocaliza con algunos de los pedestales de actina formados por EPEC, en etapas tardías de la infección (37). No se ha documentado ningún efecto de EspZ dentro de la célula epitelial; sin embargo, una cepa de *C. rodentium* deficiente en EspZ muestra una atenuación severa en la colonización de ratones y en la producción de hiperplasia (19).

2.2.2. Proteínas efectoras codificadas fuera del LEE.

Debido a su asociación física con los genes del SST3, los efectores codificados dentro del LEE fueron los primeros en ser caracterizados, y posteriormente lo fueron una serie de proteínas efectoras cuyos genes están distribuidos en el cromosoma de los patógenos A/E. En un trabajo previo, en nuestro grupo y en colaboración con el grupo del Dr. Brett Finlay (University of British Columbia), se generaron mutantes en cada uno de los 41 marcos de lectura abiertos de la isla LEE en la cepa de *C. rodentium* DBS-100 (19). Una evaluación de fenotipos por secreción de proteínas mostró que las mutantes en los marcos de lectura abiertos *rorf6* y *sepL* presentaban un fenotipo de hipersecreción de la proteína efectora Tir, así como una marcada reducción en la secreción de las proteínas translocadoras EspA, EspB y EspD (Fig. 3). El análisis proteómico del sobrenadante de la cepa mutante en *rorf6*, a partir de entonces renombrado *sepD*, permitió identificar siete nuevas proteínas secretadas a través del SST3, cuyo perfil de secreción coincidía con el de las proteínas efectoras codificadas en el

LEE. Estas proteínas se llamaron en conjunto proteínas Nle (“*Non Lee-encoded effector*”). Las primeras proteínas Nle identificadas fueron NleA, NleB, NleC, NleD, NleE, NleF y NleG. Un análisis genómico mostró que todos los genes que codifican para estas proteínas estaban conservados en los genomas de EHEC y EPEC, en algunos casos en más de una copia. Trabajos posteriores han mostrado que la proteína NleA (también llamada EspI), se transloca a la célula epitelial de manera dependiente del SST3, colocaliza con el aparato de Golgi, y es esencial para la colonización por *C. rodentium* en el modelo murino (31, 58). También se ha demostrado que NleA es capaz de interactuar con varias proteínas eucariotas que poseen el dominio PSD-95/Disk-large/ZO-1 (PDZ) a través de una secuencia localizada en el extremo carboxilo terminal, la cual es necesaria para la localización temprana de NleA en el aparato de Golgi (45). NleB se transloca hacia la célula epitelial, y es necesaria para la colonización y la producción de hiperplasia y mortalidad en ratones (39, 82). NleC se transloca por el SST3 de EHEC hacia la célula epitelial, pero no se requiere para la colonización en un modelo de infección por EHEC en becerros o en ovejas (51), o en la colonización de ratones por *C. rodentium* (39). NleD se identificó inicialmente en la cepa EDL933 de EHEC, mediante el procedimiento de “signature-tagged mutagenesis” como un gen necesario para la colonización de becerros (21), pero un reporte posterior, usando mutantes sitio-dirigidas, no mostró atenuación de la colonización en las cepas EDL933 y 85-170 de EHEC en el mismo hospedero (51). La proteína NleE se transloca por el SST3 de EPEC, y se localiza en el núcleo (86). Recientemente se demostró que una mutante *de nleE* en *C. rodentium* presenta una atenuación en la colonización, además de producir un retraso en la mortalidad de ratones (83), y una disminución en la migración transepitelial de células polimorfonucleares inducida por EPEC (86). Un trabajo reciente demostró que un homólogo de NleG en EPEC, llamado NleI,

se transloca hacia la célula epitelial (47); sin embargo, su papel *in vivo* no ha sido descrito. La caracterización de la proteína NleF como efector A/E no se ha abordado.

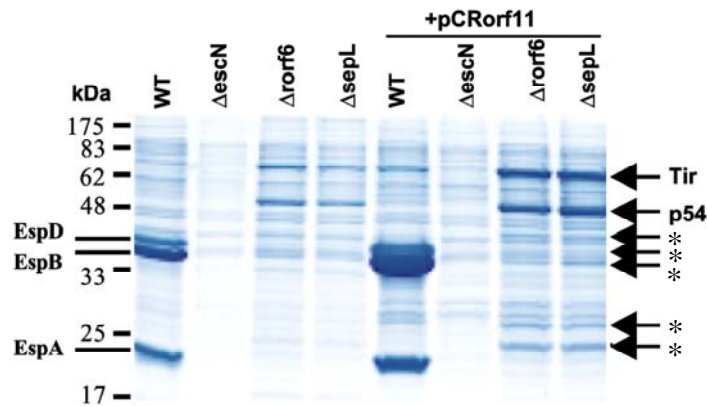


Figura 3. Perfil de proteínas secretadas por *C. rodentium**. Las cepas de *C. rodentium* WT, $\Delta escN$ (deficiente en el SST3), $\Delta rorf6$ y $\Delta sepL$, portando o no el pCRorf11 que expresa el regulador positivo del LEE GrlA, se cultivaron en DMEM y las proteínas secretadas al medio se precipitaron a partir de los sobrenadantes con TCA. En las mutantes $\Delta rorf6$ y $\Delta sepL$, la secreción de las proteínas translocadoras EspD, EspB y EspA se abate, pero se aumenta considerablemente la de proteínas efectoras como Tir, p54 (NleA) y otras que posteriormente fueron identificadas como Nles (marcadas con asteriscos).

*Modificada de (19).

Además de las proteínas Nle se han descrito varias otras proteínas efectoras no codificadas en el LEE en los patógenos A/E con diferentes actividades: EspG2, una proteína homóloga del efector EspG codificado en el LEE, se identificó en EPEC, y después de su translocación se localiza bajo el sitio de adhesión de la bacteria, y al igual que EspG, participa en el rompimiento de la red de los microtúbulos, así como en el incremento de la permeabilidad paracelular en células en cultivo (23, 53, 70). Cif, descrita en una cepa de EPEC de conejos, fue

la primera proteína efectora codificada fuera del LEE descrita, y es una ciclomodulina bacteriana capaz de bloquear la división celular arrojando al enterocito en la transición G2/M del ciclo celular (50). TccP/EspF_u es una proteína homóloga del efector del LEE EspF, y en EHEC es necesaria para la formación de los pedestales de actina, en donde funciona permitiendo a Tir nuclear actina por una vía independiente de Nck (6, 26). La proteína EspJ es un efector que en *C. rodentium* parece modular la persistencia de la bacteria en el ratón, ya que la mutante permanece más tiempo en el colon, por lo que se sugiere podría ser importante para asegurar la transmisión de la bacteria de un hospedero a otro (12). Recientemente, se reportó que la proteína efectora EspK, la cual se localiza en el citoplasma del enterocito, posee un papel en la persistencia de EHEC en el intestino de becerros; sin embargo, mutantes en *espK* no alteran la capacidad de *C. rodentium* para colonizar ratones (81).

Durante el análisis genético para localizar los genes que codifican para las proteínas Nle en el genoma parcialmente secuenciado de *C. rodentium* DBS-100 (www.sanger.ac.uk) encontramos que los genes que codifican para NleF y un homólogo de NleG se localizan en un locus de 12.6 kb insertado entre los genes *yjiG* y *prfC*, los cuales se encuentran contiguos en los cromosomas de EHEC EDL933 y la cepa de *E. coli* no patógena K-12 (Fig. 4A). Este locus contiene también al efector EspJ, translocado por el SST3, conservado en diferentes sitios en los genomas de EPEC y EHEC (12). Además de los efectores descritos, en este locus encontramos un marco de lectura abierto de 293 codones, localizado inmediatamente corriente arriba de *nleF*, y cuyo producto comparte 15% de identidad con la proteína OspG de *S. flexneri* (Fig. 4A), el cual es un efector sustrato del SST3 en ese patógeno, involucrado en la modulación de la respuesta inmune, evitando la activación de NFκB (42). La identidad de NleH con OspG se localiza en el extremo carboxilo terminal (Fig. 4B), y NleH no posee identidad con otras proteínas en las bases de datos. Debido a su localización en el genoma de

C. rodentium, y al hecho de que su secuencia predicha de aminoácidos comparte identidad con un efector secretado por el SST3 en *S. flexneri*, se especuló que el marco de lectura localizado corriente arriba de *nleF* codifica para una proteína efectora, y se le llamó posteriormente *nleH*. NleH comparte un alto nivel de identidad (83%) con el producto de dos marcos de lectura abiertos de función desconocida en el genoma de EHEC EDL933, designados como Z6021 y Z0989, a los que nosotros llamamos NleH1 y NleH2, respectivamente (Fig. 4B). En el genoma parcialmente secuenciado de la cepa E2348/69 de EPEC (<http://www.sanger.ac.uk>), también se localizan dos homólogos de NleH que comparten 83% de identidad con NleH de *C. rodentium* (Fig. 4A). Los loci en donde se encuentran codificados los homólogos de NleH en EPEC y EHEC no comparten el sitio de inserción cromosomal con *nleH* de *C. rodentium*. El gen *nleH1* en EHEC forma parte de un locus cromosomal de 58.6 kb, el cual contiene genes estructurales de un profago, y los genes de los efectores NleA y NleF, así como un homólogo de NleG. Este locus interrumpe la fase del gen *yjiD*, entre los genes *yjiE* y *ynaF* del esqueleto genómico de *E. coli*. En EPEC, el locus de 55.5 kb que contiene *nleH1* está insertado entre *yjiD* y *trpA*, y también contiene los genes que codifican para NleA y NleF, pero no el homólogo de NleG (Fig. 4A). También los genes *nleH2* en EPEC y EHEC se localizan en regiones que contienen genes estructurales de profagos. En ambos casos el locus de *nleH2* se encuentra insertado entre los genes *ybbC* y *ybbB*, conservados en *E. coli* K12, pero el tamaño de la inserción es diferente en cada caso. En EPEC el locus abarca 52.3 kb, y en EHEC la inserción es de 38.1 kb. En EPEC el locus de *nleH2* contiene un gen que codifica para un homólogo de Cif, mientras que en EHEC el locus de *nleH2* codifica para homólogos de tres proteínas Nle: NleD, NleC y un homólogo de la proteína NleB, llamado NleB2. La organización genética del locus de *nleH* en *C. rodentium* es similar a la del locus *nleH1* tanto en EPEC como en EHEC, sin embargo, la secuencia predicha de la proteína comparte una mayor identidad con NleH2,

incluyendo la ausencia de un fragmento de 10 aminoácidos entre los residuos 29 y 30 (Fig. 4B). En este trabajo se caracterizó el efector NleH de *C. rodentium*, conservado en los genomas de los patógenos A/E.

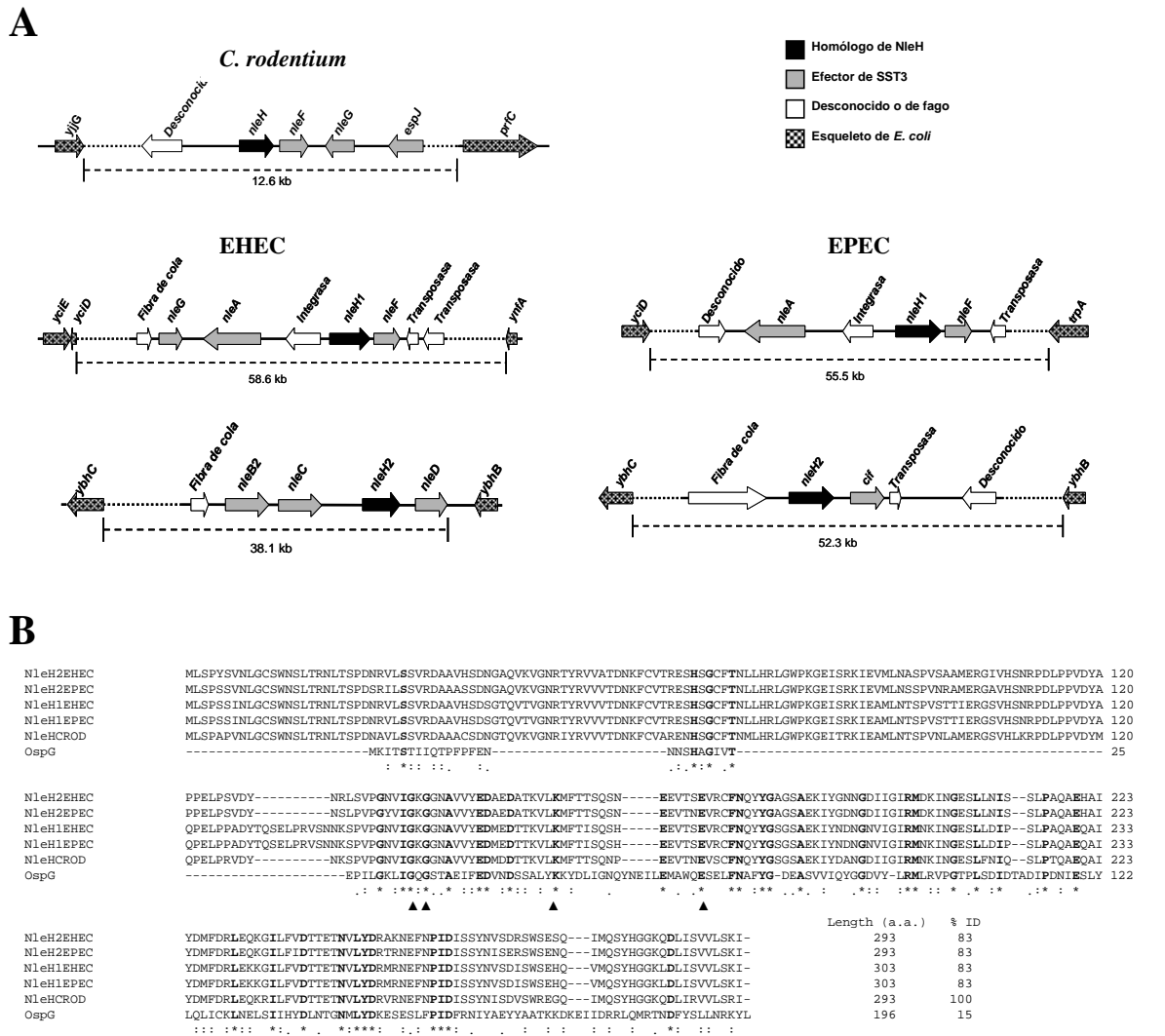


Fig. 4. Identificación de un marco de lectura abierto conservado en patógenos A/E con identidad a OspG de *S. flexneri*. (A) Representación esquemática del loci que codifica *nleH* en *C. rodentium* DBS100 y sus dos homólogos en EPEC E2348/69 y EHEC EDL933. NleH1 y NleH2 corresponden a Z6021 y Z0989 en la secuencia genómica de EHEC EDL933, y a ECs1814 y ECs0848 en la secuencia genómica de la cepa Sakai de EHEC, respectivamente. Los genes flanqueantes corresponden a los conservados en *E. coli* K12, y se consideran las fronteras de los sitios de inserción de este grupo de genes probablemente adquiridos por transferencia horizontal. (B) Alineamiento múltiple de los homólogos de NleH de *C. rodentium* DBS100, EPEC E2348/69, EHEC EDL933 y OspG de *S. flexneri* M90T. Las secuencias de *C. rodentium* y EPEC se obtuvieron del proyecto de secuenciación genómica en el Instituto Sanger (www.sanger.ac.uk). Las cabezas de flecha indican los aminoácidos conservados involucrados en la autofosforilación descrita para OspG.

3. HIPÓTESIS

Debido a que se encuentra en un locus cromosomal que contiene efectores, y su identidad con OspG de *S. flexneri*, el gen codificado corriente arriba de *nleF* en *C. rodentium*, *nleH*, codifica para un efector que se secreta y se transloca por el SST3 codificado en la isla de patogenicidad LEE.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Describir los mecanismos y factores de virulencia de la familia de patógenos A/E.

4.2 Objetivo particular.

Caracterizar la función de la proteína NleH como probable efector del SST3.

4.3 Objetivos específicos.

- Determinar si la proteína NleH se secretada y se transloca hacia la célula epitelial mediante el SST3 codificado en el LEE.
- Determinar si la expresión de *nleH* está corregulada con el SST3 codificado en el LEE.
- Evaluar el papel *in vivo* de la proteína NleH.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, plásmidos, líneas celulares y condiciones de cultivo. Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este estudio se describen en la Tabla 1. Las bacterias se cultivaron a 37 °C en caldo o agar Luria-Bertani (LB), medio mínimo M9 modificado (Na_2HPO_4 6 g/L, KH_2PO_4 3 g/L, NaCl 0.5 g/L, NH_4Cl 1 g/L, NaHCO_2 4 mM, MgSO_4 8 mM, Glucosa 0.4%, Cas-aminoácidos 0.1%), o en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). En las condiciones en que se requirió, el medio se suplementó con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y kanamicina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Los cultivos de *C. rodentium* en DMEM o medio mínimo M9 modificado se incubaron a 37 °C, en atmósfera al 5% CO_2 (v/v), sin agitación. Para los cultivos de EPEC en DMEM, el medio se suplementó con 1% de LB, y se incubaron a 37°C con agitación (220 rpm). Las células Caco-2 (ATCC HTB-37) se cultivaron en medio mínimo esencial (MEM), amortiguado con 2.4 g/L de HEPES y suplementado con 15% (v/v) de suero fetal bovino (FBS) y 200 mM de L -glutamina en una atmósfera húmeda con 5% (v/v) de CO_2 .

Construcción de mutantes nulas y plásmidos. La eliminación del gen *nleH* en la cepa DBS100 de *C. rodentium* se realizó mediante el procedimiento de mutagénesis en un solo paso por fragmentos de PCR desarrollado por Datsenko y Wanner (13). La mutación eliminó la región estructural de *nleH* y la reemplazó con el gen de resistencia a kanamicina. Para la construcción del plásmido pTnleH-HA, el cual expresa NleH etiquetada con dos epítopes de hemaglutinina (HA), se amplificó por PCR la secuencia de DNA del genoma de *C. rodentium* DBS100 conteniendo el sitio de unión a ribosoma putativo y la región estructural de *nleH* sin el codón de paro utilizando los oligonucleótidos NleHCF (5'-GCAAAAAGCTTCCGGTTTTTGTGTGTCATGTCAGGG-3') y NleHCR (5'-GCCACTCGAGAATTCTACTTAATACCACTCTGATAAG-3'), los cuales contienen sitios

de restricción *HindIII* y *XhoI*, respectivamente. El producto se digirió simultáneamente con *HindIII* y *XhoI*, y se ligó en el pTOPO-2HA digerido con las mismas enzimas de restricción.

Para generar el plásmido pTnleH20-293H, el cual expresa una versión de NleH-2HA truncada en el extremo amino terminal, se utilizó el plásmido pTnleH-HA como molde para una reacción de PCR inverso (IPCR) con los oligonucleótidos RecHA (5'-AGCTCCGGTACCCATACATTTCAACCTTCAAAATAAGAC-3') y RecH20B (5'-AGAAACGGTACCTCGCCTGATAATGCCGTCTTATCC-3'), diseñados para eliminar los codones 2 a 19 de *nleH* e introducir sitios de restricción *KpnI*. El producto se digirió con *KpnI* y se autoligó. Para generar el plásmido pTnleH1-133HA, expresando una versión de NleH-HA truncada en el extremo carboxilo terminal, el plásmido pTnleH-HA se usó como molde para una IPCR con los oligonucleótidos NleHHAF (5'-AGTCGCTCGAGTATCCGTATGATG-3') y NleH2AC160 (5'-ATTACCCTCGAGGGGTGACTTGTATAGTCCAC-3'), diseñados para eliminar los codones 134 a 293 de *nleH*, e introducir sitios *XhoI*. El producto se digirió con *XhoI* y se autoligó.

Para generar un plásmido conteniendo el gen *nleH* marcado con dos epítopes de HA en operón con el gen reportero *cat*, bajo el control de la región reguladora de *nleH*, se amplificó por PCR la región codificante de *nleH* sin el codón de paro, más 1334 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción con los oligonucleótidos NleHReg (5'-AAGTGCAAGCTTCCTCATAAGATGGAAAAGTGC-3') y NleHCR. El producto resultante se clonó en los sitios *HindIII* y *XhoI* del pTOPO-2HA, para generar el plásmido pTregNleH-HA (Tabla 1). Posteriormente, se llevó a cabo una PCR para amplificar el inserto de *nleH* en el pTregNleH-HA, incluyendo la secuencia correspondiente al doble epítipo de HA. El producto de esta reacción se clonó en los sitios *BamHI-HindIII* del vector pKK232-8, y de este modo generar el plásmido pKKnleH-HA. De la misma manera, el plásmido pKKespG-

HA (Tabla 1) se construyó utilizando los oligonucleótidos EspGHibF (5'-GTCCTAGGATCCCCGGGGCGGGGTCAGTCC-3') y EspGHibR (5'-GTAATACTCGAGAGCATTGTTTCAGATATGTTTCAG-3') para amplificar *espG* del genoma de *C.rodentium*, incluyendo 353 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción, sin codón de paro, y clonando el producto resultante en los sitios *Bam*HI-*Xho*I del pKKnleH-HA.

Para crear un vector apropiado para la construcción de fusiones reporteras a *CyaA*, se amplificó por PCR la secuencia correspondiente a los codones 2 a 401 de la secuencia de *cyaA* contenida en el plásmido pOG-ATCΔ304 (Tabla 1) y se clonó en los sitios *Eco*RI-*Not*I del vector pMPM-K3, para generar el plásmido pK3cyaA. El pK3cyaA posee sitios únicos *Pst*I y *Bgl*II en el extremo 5'. Para generar la fusión pK3nleHcyaA, la región codificante de *nleH* sin codón de paro se amplificó del cromosoma de *C. rodentium* y se clonó en los sitios *Hind*III-*Pst*I del pK3cyaA. Para generar el plásmido pK3nleH1-19cyaA, que expresa *CyaA* fusionada a los primeros 19 residuos de *NleH*, el pK3nleHcyaA se usó como molde para IPCR con oligonucleótidos conteniendo sitios de restricción *Pst*I, diseñados para amplificar los codones 20 a 293 de *nleH*. El producto resultante se digirió con *Pst*I y se autoligó.

Para generar el plásmido pTnleG-HA, la región codificante de *nleG* sin codón de paro, incluyendo el sitio de unión a ribosoma putativo, se amplificó a partir de DNA genómico de *C. rodentium*, utilizando los oligonucleótidos NleG1CyAF (5'-CCT ACC AAG CTT GTT TGT TAA GAA GCG GCG-3') y NleGR (5'-CTA GAC TCG AGA CTA TTT TTT ATA ACG AAG TTA CCC-3') mediante PCR. El producto resultante se clonó en los sitios *Hind*III-*Xho*I del pTOPO-2HA.

Para generar el pTespK-HA, se amplificó por PCR la región codificante del gen *espK* sin el codón de paro, incluyendo el probable sitio de unión a ribosoma a partir de DNA genómico

de *C. rodentium*, con los oligonucleótidos YopMCF (5'-GCT TGT AAG CTT GTA GTA TGG ATA GAA CTT ACA CTG-3') y YopMCR (5'-TTG CTA CTC GAG AGA ATA TTT ATA TGT GGA ACC GG-3'). El producto resultante se clonó en los sitios *HindIII-XhoI* del pTOPO-2HA.

Para generar el pFLAG-EspXL, se amplificó por PCR la región estructural de *espX* en *C.rodentium*, sin los codones de inicio y de paro de la traducción, utilizando los oligonucleótidos SopACF1N (5'- GTG CGA GAA TTC CCT GCC CAC GAC AAA TAT TCC-3') y SopACF2 (5'-GTC TCT GGT ACC ACG CCA AGA AAC AGG ATA AT-3'). El producto resultante se clonó en los sitios *EcoRI-KpnI* del pFLAG-CTC, para generar el pFLAG-EspX. Para eliminar los residuos correspondientes a los sitios *HindIII*, *XhoI* y *EcoRI* del pFLAG-CTC (Tabla 1) que se incluyen en el extremo amino terminal de EspX en el pFLAG-EspX, se utilizaron los oligonucleótidos SopACFL (5'-ACA GGA GAA TTC ATG CTG CCC ACG ACA AAT ATT CC-3') y SopACRL (5'-ACA GGA GAA TTC TCT CCT GTG TGA AAT TGT TAT CC-3') para realizar una IPCR utilizando como molde el pFLAG-EspX. El producto resultante se digirió con *EcoRI* y se autoligó.

Todas las construcciones fueron confirmadas por secuencia.

Ensayo de secreción de proteínas. Se inoculó 50 ml de DMEM con el antibiótico apropiado con 500 μ L de un cultivo de toda la noche en LB (D.O._{600nm}=2) de las cepas indicadas, se incubó por 1 h a 37 °C en atmósfera al 5% de CO₂ sin agitación. Después se indujo con 0.5 mM o 5 μ M de IPTG según se indica, y se incubó por 5 h más. Las bacterias se recuperaron por centrifugación a 17900 X g por 10 minutos. Las proteínas secretadas se precipitaron (1350 μ L de sobrenadante para cada cepa) con 10% de ácido tricloroacético (TCA) a 4°C durante

toda la noche, y se concentraron por centrifugación a 17900 X g por 30 minutos a 4°C. Las fracciones resultantes se sometieron a SDS-PAGE y análisis tipo western.

Fraccionamiento celular. El procedimiento de fraccionamiento celular mecánico se realizó mediante un procedimiento reportado por Gauthier y colaboradores (27), con algunas modificaciones. Se inocularon monocapas de células Caco-2 (aproximadamente 2×10^6 células) cultivadas en frascos de 75 cm² en MEM con 200 µL de un cultivo de las cepas de EPEC conteniendo los plásmidos correspondientes, las cuales se precrecieron por 3 horas en DMEM (MDI=25) (preinducción) lo cual favoreció la expresión de los factores de virulencia. Se incubó por 1.5 h, se indujo la expresión de las fusiones agregando IPTG a una concentración final de 0.5 mM, y se dejó proseguir la infección por 1.5 h más. Al término del tiempo de incubación se retiró el medio de las monocapas, las células se lavaron tres veces con PBS, y se despegaron con PBS conteniendo 0.025% de tripsina y 0.2 g/L de EDTA. Después las células se centrifugaron a 3000 X g durante 5 minutos, se retiró el PBS y se resuspendieron en 300 µL de amortiguador de homogenización (3 mM imidazol (pH 7.4), 250 mM sacarosa y 0.5 mM EDTA), más un cóctel inhibidor de proteasas (Roche). A continuación las células fueron lisadas mecánicamente mediante 2 pases a través de una aguja calibre 22, y 6 pases a través de una aguja calibre 27. Se aplicó una centrifugación de baja velocidad (3000 X g) por 15 minutos al homogenizado para decantar las bacterias, células Caco-2 intactas, núcleos y componentes del citoesqueleto (fracción *centrifugación de baja velocidad*). Después el sobrenadante se sometió a ultracentrifugación (33000 X g) durante 60 minutos para separar la fracción insoluble (membranas de la célula hospedera) de la fracción soluble (proteínas del citosol de la célula hospedera). Las fracciones obtenidas se sometieron a SDS-PAGE (12% poliacrilamida) y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa para su análisis mediante ensayos tipo western.

Ensayos tipo western. Las membranas de nitrocelulosa conteniendo las proteínas transferidas se bloquearon en 1% de leche libre de grasa en PBS durante 1 h. Las membranas se incubaron con alguno de los anticuerpos con las siguientes diluciones: anti-HA monoclonal (COVANCE) 1:5000, anti-DnaK monoclonal (StressGen) 1:15000, anti-CyaA monoclonal (Cedarlane) 1:5000, anti α -tubulina monoclonal (Sigma) 1:10000, anti-calnexina policlonal de conejo (Sigma) 1:10000 y anti-EspA (proveído por V. Sperandio y J. B. Kaper) 1:10000. Como anticuerpo secundario se utilizó anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa, origen cabra (Pierce), y anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa, origen conejo (Pierce), ambos en una dilución 1:10000. Las señales positivas se visualizaron mediante el reactivo “Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus” (Perkin-Elmer).

Análisis de infección de ratones por *C. rodentium*. Se obtuvieron ratones C57BL/6 de tres a seis semanas de edad de los Laboratorios Jackson (Bar Harbor, Maine, EUA). Las cepas de *C. rodentium* silvestre y mutante en *nleH* se cultivaron en caldo LB a 37 °C a 200 r.p.m. durante toda la noche. Los ratones se inocularon por vía oral con 100 μ L de los cultivos. Los inóculos se titularon mediante dilución serial y plateo en cajas, y se determinó que contenían 2.5×10^8 bacterias por ratón para ambos grupos. Para el ensayo de colonización bacteriana, los ratones se sacrificaron y se colectaron los 4 primeros cm de la parte distal del colon a partir del orificio anal. El tejido de colon y las heces fecales se homogenizaron utilizando un homogenizador de tejidos Polytron, y se diluyeron serialmente para platear en agar MacConkey (Difco Laboratories) y determinar la carga total bacteriana en el momento del sacrificio.

Análisis de actividad cloranfenicol acetil transferasa (CAT). La determinación de la actividad de las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* se realizó como se describe en (52). 500 μ L de un cultivo de toda la noche de las cepas indicadas (D.O. = 2) se cultivaron en 50 mL de DMEM o M9 con los antibióticos apropiados, durante 6 horas. Al final del tiempo de incubación se tomaron alícuotas para realizar análisis de secreción, y para determinación de actividad CAT. Las alícuotas se centrifugaron a 14000 X g durante 2 minutos, las pastillas se lavaron con regulador TDTT (Tris-HCl 50 mM pH 7.6 y DTT 3 μ M), y se resuspendieron en 500 μ L del mismo regulador. Los extractos se lisaron mediante sonicación, y se centrifugaron a 14000 X g durante 20 minutos a 4 °C. Se determinó la concentración de proteína en los extractos con el estuche comercial BCA (Pierce). La actividad CAT se calculó mediante una cinética de actividad enzimática con acetil-CoA, cloranfenicol y 5,5' ditio-bis(2-ácido nitrobenzoico) (DNTB, Research Organics) en un lector de microplacas automatizado modelo Ceres 900C (Biotek), y el programa KC3, leyendo a 410 nm cada 5 segundos durante un tiempo total de 5 minutos. La actividad específica de CAT expresada en μ mol/mg/min se determinó dividiendo la actividad obtenida entre la concentración de proteína de cada extracto.

Análisis estadístico. Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de análisis de varianza (ANDEVA) de una vía, utilizando el programa estadístico SPSS (SPSS).

6. RESULTADOS

6.1 Análisis de la secreción de NleH.

Para establecer si *nleH* codifica para una proteína sustrato del SST3 de *C. rodentium*, se construyó el plásmido pTnleH-HA que expresa bajo el promotor P_{lac} una versión de NleH marcada con dos epítopes de HA en el extremo carboxilo terminal (Fig. 5A). El pTnleH-HA se transformó en la cepa silvestre de *C. rodentium*, y en las mutantes $\Delta escN$ en la cual el SST3 no es funcional, y $\Delta sepD$ la cual hipersecreta efectores. Las cepas se cultivaron en DMEM durante 6 horas, induciendo la expresión de la fusión con IPTG, y las proteínas secretadas al medio se precipitaron con TCA. Las fracciones correspondientes a las pastillas totales y las proteínas secretadas se sometieron a SDS-PAGE y a análisis tipo western con anticuerpos anti-HA y anti-DnaK (Fig. 5B). Este análisis mostró que la fusión NleH-HA se expresa en las tres cepas, y se secreta al medio en la cepa silvestre y en mayor cantidad en la cepa $\Delta sepD$, pero no se detecta en el sobrenadante de la cepa $\Delta escN$. La detección de la fusión NleH-HA en los sobrenadantes no se debe a lisis bacteriana, ya que la proteína citosólica no secretada DnaK no se detecta en los sobrenadantes. Estos resultados indican que NleH se secreta en *C. rodentium* a través del SST3 codificado en el LEE, y su perfil de secreción coincide con el de una proteína efectora.

A pesar de no haberse detectado una secuencia consenso señal para la secreción de efectores a través del SST3, tanto en los efectores de los patógenos A/E como para los efectores de otros modelos, se ha reportado que la secuencia necesaria reside en los primeros 10 a 20 codones del extremo amino terminal (9, 29). Para determinar el dominio de NleH involucrado en la secreción tipo 3, construimos un recorte de los codones 2-19 en la región codificante de *nleH* en el plásmido pTnleH-HA, para generar el plásmido pTnleH20-293HA, y un recorte de 160 residuos por el extremo carboxilo terminal (pTnleH Δ 134-293HA) (Fig. 5A). Los plásmidos se

introdujeron en la cepa silvestre de *C. rodentium*, y se realizó un ensayo de secreción en DMEM. De manera consistente con los resultados anteriores, la fusión completa NleH-HA se detecta en el sobrenadante, así como la fusión con el recorte por el extremo carboxilo terminal NleH_(Δ 134-293)-HA (Fig. 5C). La fusión con el recorte por el extremo amino terminal, a pesar de ser expresada en la cepa silvestre, no se detecta en la fracción correspondiente al sobrenadante (Fig. 5C). Este resultado indica que el extremo amino terminal de NleH se requiere para la secreción y concuerda con lo observado para otros efectores. Para determinar si los residuos 2-19 de NleH son suficientes para conferir la secreción a través del SST3 a NleH, se construyó una fusión de la región codificante de NleH a CyaA (pK3nleHcyaA), y una fusión que contiene los primeros 19 residuos de NleH a CyaA (pK3nleH1-19cyaA) (Fig. 5A). Estas construcciones se introdujeron en las cepas de *C. rodentium* indicadas en el ensayo de secreción mostrado en la figura 5D. La fusión a CyaA que contiene la proteína completa NleH, al igual que la fusión a HA, se secreta al medio en la cepa silvestre. En la pastilla de esta cepa detectamos tres bandas con el anticuerpo anti-CyaA, lo que indica que en la fusión NleH-CyaA ocurre un procesamiento probablemente debido a la sobreproducción de la proteína. La fusión a CyaA que contiene los primeros 19 residuos de NleH se secreta en la cepa silvestre y en la mutante en *sepD*, no así en la cepa Δ *escN*. En conjunto, los resultados indican que los primeros 19 residuos del extremo amino terminal de NleH son suficientes para conferir la secreción dependiente del SST3. De manera interesante también observamos que este dominio es suficiente para producir el aumento en la secreción en una mutante en *sepD* (Fig. 5D).

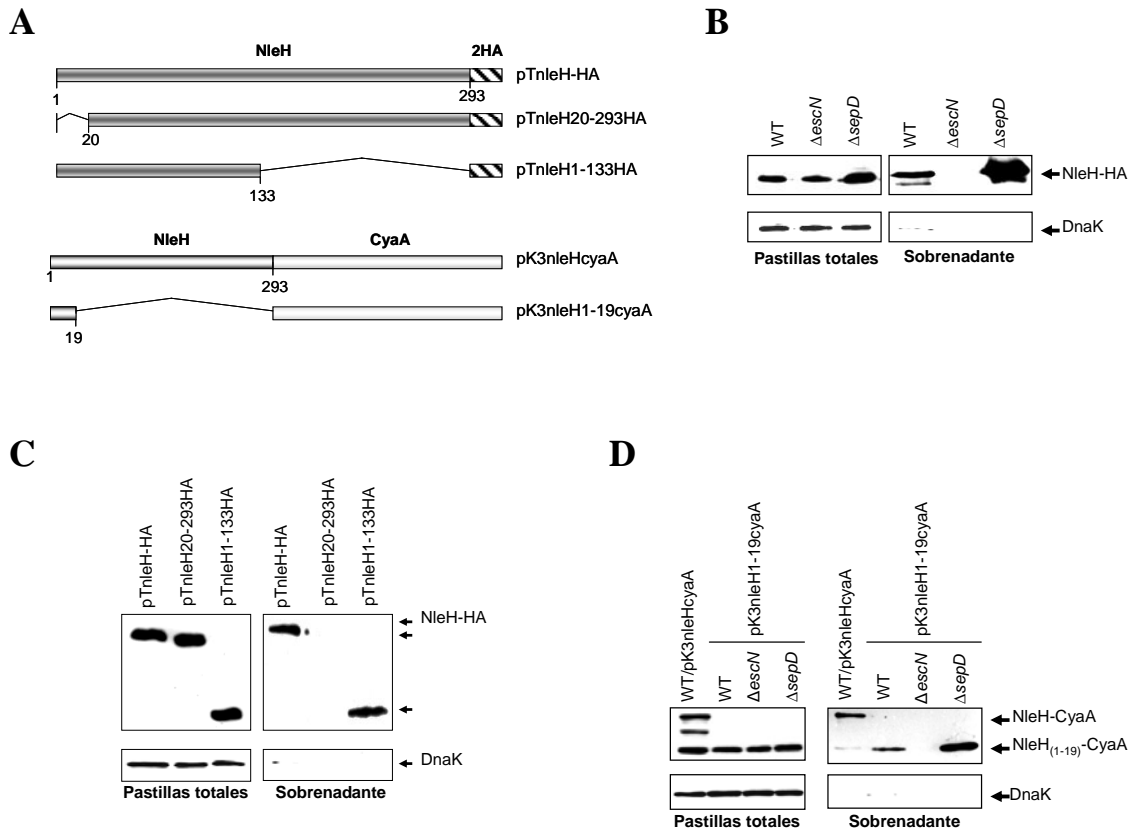


Figura 5. Análisis de la secreción de NleH. (A) Representación esquemática de las fusiones reporteras NleH-HA y NleH-CyaA, y sus respectivos recortes utilizados en este trabajo. (B) Ensayos tipo western de proteínas totales y proteínas secretadas por las cepas silvestre, deficiente en el SST3 $\Delta escN$, e hipersecretora de efectores $\Delta sepD$, expresando la fusión NleH-HA desde el pTnleH-HA. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE y se probaron con anticuerpos anti-HA y anti-DnaK como control de carga y para monitorear lisis bacteriana en la fracción de proteínas secretadas. (C) Los primeros 19 residuos de NleH son suficientes para mediar la secreción tipo 3. Análisis tipo western utilizando anticuerpos contra HA y DnaK de las proteínas totales y secretadas al medio por las cepas de *C. rodentium* silvestre, conteniendo los plásmidos pTnleH-HA, pTnleH Δ 2-19HA y pTnleH Δ 134-293HA. (D) Los plásmidos expresando las fusiones NleH-CyaA (pK3nleHcyaA) y NleH₍₁₋₁₉₎-CyaA (pK3nleH1-19HA) se transformaron en las cepas WT, $\Delta escN$ y $\Delta sepD$ de *C. rodentium*. Las cepas se cultivaron en DMEM y se tomaron muestras de extractos totales y sobrenadantes para obtener las proteínas secretadas. Las muestras se separaron por SDS-PAGE y se analizaron por ensayos tipo western usando anticuerpos anti-CyaA y anti-DnaK.

6.2. Análisis de la translocación de NleH.

De la familia de patógenos A/E, EPEC es más eficiente en la colonización de células epiteliales en cultivo debido a que posee un pili tipo IV llamado BFP, el cual le permite adherirse a la célula epitelial en forma de microcolonias (10) y, por lo tanto, translocar a la célula proteínas efectoras con más eficiencia. Considerando que los SST3 de EPEC y *C. rodentium* comparten un alto nivel de identidad y que EPEC se ha utilizado como vector para evaluar la translocación de efectores de EHEC (12, 51, 81), en este trabajo se usaron cepas de EPEC para evaluar la translocación de NleH de *C. rodentium* hacia células epiteliales en cultivo. Las fusiones de NleH al epítotope de HA y CyaA (Fig. 5A) se introdujeron en las cepas de EPEC E2348/69 silvestre y Δ_{escN} . Estas cepas se utilizaron para infectar células Caco-2 en cultivo induciendo la expresión de las fusiones. Las células se sometieron a un fraccionamiento por centrifugación previa lisis mecánica. Las fracciones obtenidas se sometieron a ensayos tipo western usando anticuerpos contra el epítotope de HA y CyaA (Fig. 6). La fusión NleH-HA completa se detecta en las fracciones de centrifugación a baja velocidad, tanto en la cepa silvestre como en la mutante en *escN*, pero sólo se detecta en la fracción correspondiente a las membranas de las células Caco-2 infectadas con la cepa silvestre (Fig. 6). La señal detectada en la fracción membranal no proviene de contaminación bacteriana, pues la proteína DnaK sólo se detecta en la fracción correspondiente a la centrifugación a baja velocidad. Este resultado indica que la proteína NleH es translocada hacia la célula epitelial mediante el SST3 codificado en el LEE. La proteína calnexina, la cual es una proteína integral de membrana en retículo endoplásmico, se detectó en la fracción membranal. La proteína de esqueleto celular tubulina se detectó en todas las fracciones. La fusión al epítotope de HA que contiene los residuos 1-133 de NleH, de manera similar a la fusión completa, es translocada a la célula epitelial y se asocia a la fracción membranal, indicando que en el extremo carboxilo no reside ninguna señal de translocación o de asociación a membranas. La fusión NleH-CyaA, en concordancia con el

resultado obtenido con la fusión al epítipo de HA, también se transloca de manera dependiente del SST3, y se detecta en la fracción membranal de las células infectadas con la cepa silvestre. La fusión a CyaA que contiene los residuos 1-19 de NleH es expresada por la cepa silvestre y Δ_{escN} , pero no se detecta en las fracciones citosólica y membranal, lo que indica que los primeros residuos del extremo amino terminal, a pesar de ser capaces de conferir la secreción tipo 3, no son suficientes para dirigir la fusión hacia la célula epitelial (Fig. 6). La translocación de NleH requiere una porción más larga del extremo amino terminal, ya que la fusión NleH₍₁₋₁₃₃₎-HA se internaliza de manera eficiente. En conjunto, estos resultados indican que NleH se transloca hacia la célula epitelial por el SST3, y que el dominio de translocación reside en el extremo amino terminal pero comprende una región más amplia que el dominio de secreción. Además, NleH es capaz de asociarse a membranas, y dicha capacidad reside en los primeros 133 residuos.

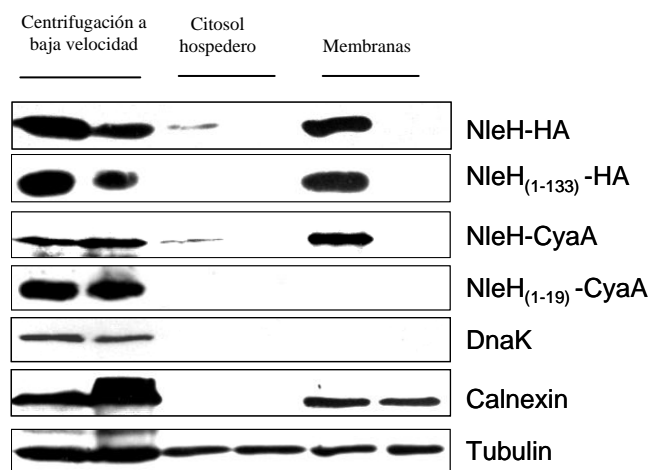


Figura 6. Análisis de la translocación de NleH a células Caco-2 en cultivo. Células epiteliales Caco-2 en cultivo fueron infectadas con las cepas silvestre y Δ_{escN} de EPEC E2348/69 transformadas con los plásmidos que expresan las fusiones descritas en la figura 4A. Después de la inducción con IPTG, las células se sometieron a un fraccionamiento mediante lisis mecánica, como se describe en *Materiales y Métodos*. La fracción correspondiente a la centrifugación a baja velocidad contiene células Caco-2 intactas, organelos completos, componentes del citoesqueleto y bacterias intactas. La localización de las fusiones a NleH se monitoreó por análisis tipo western con anticuerpos anti-HA y anti-CyaA. Como control del fraccionamiento, todas las muestras se analizaron utilizando anticuerpos anti-DnaK, anti-calnexina y anti-tubulina. Se muestra un resultado representativo de cada análisis con los controles. Cada experimento se realizó dos veces, con resultados idénticos.

6.3. Análisis de la regulación de NleH.

A pesar de que el número de efectores no codificados en el LEE se incrementa de manera constante (12, 51, 76, 81), poco se sabe de la regulación de éstos en los patógenos A/E. Debido a que los resultados anteriores muestran que NleH es un sustrato del SST3, y que los reguladores codificados en el LEE son capaces de regular factores de virulencia codificados fuera del LEE, se investigó si la expresión de la proteína NleH se co-regula con la expresión y

la actividad del SST3. Para monitorear al mismo tiempo la expresión de la proteína NleH, y la de un gen reportero bajo el promotor de *nleH*, se construyó una fusión transcripcional de la región reguladora y estructural del gen *nleH* marcada con dos epítopes de HA, al gen reportero *cat* (pKKnleH-HA) (Fig. 7A). Para investigar si los reguladores codificados en el LEE regulan la transcripción de *nleH*, transformamos la fusión en la cepa silvestre de *C. rodentium*, así como en las mutantes de Δler , $\Delta grlA$ y $\Delta glrR$. Las cepas se cultivaron en DMEM, a 37°C sin agitación en una atmósfera de CO₂ al 5%, condiciones en donde se expresan los genes del LEE en *C. rodentium*. Se obtuvieron extractos tanto para determinar la actividad CAT de los cultivos, como para determinar la expresión y secreción de NleH, mediante ensayos tipo western con anticuerpos anti-HA. La actividad CAT de la fusión pKKnleH-HA presenta una disminución moderada no significativa en las cepas Δler y $\Delta grlA$ con respecto a la cepa silvestre, lo cual sugiere que la transcripción de *nleH* no forma parte del regulón Ler-GrlA (Fig. 7B). En contraste, no se detecta NleH-HA en el análisis por western en los extractos totales y proteínas secretadas en las mutantes de *ler* y *grlA* (Fig. 7C). Este resultado sugiere que la síntesis de NleH es regulada indirectamente por los reguladores positivos Ler y GrlA a un nivel posterior a la transcripción. Por su parte, la cepa mutante en *grlR* presentó un ligero incremento en la actividad de CAT, lo cual se reproduce en la detección de NleH-HA en el extracto total y las proteínas secretadas de esta cepa (Fig. 7C). Como control se construyó una fusión similar al pKKnleH-HA para el efector codificado en el LEE EspG, cuya transcripción está regulada por Ler (79), generando el plásmido pKKespG-HA (Fig. 7D). De acuerdo a lo reportado, la actividad CAT, así como la detección de EspG-HA, se redujeron de manera dramática en las cepas mutantes en *ler* y *grlA* conteniendo el pKKespG-HA (Fig. 7E). La mutante en *sepD* produce un efecto de hipersecreción de efectores, y en el caso de NleH esto sucede aun cuando la proteína se expresa desde un promotor heterólogo inducible (Fig. 5B). Para probar si

además la mutación en *sepD* produce un aumento en la transcripción de *nleH*, se transformó esta cepa con el pKKnleH-HA. La actividad CAT no se afecta significativamente en esta cepa; sin embargo, la detección de NleH-HA por western se incrementa tanto en los extractos totales como en las proteínas secretadas al medio por la cepa $\Delta sepD$ (Fig. 7B y C). Para determinar si este incremento en la estabilidad de NleH-HA es dependiente de la hipersecreción observada en la mutante en *sepD*, se transformó una doble mutante $\Delta sepD/\Delta escN$ con el plásmido pKKnleH-HA. En esta cepa tampoco se altera la transcripción de *nleH*, medida por la actividad CAT. Sin embargo, los niveles totales de NleH-HA se disminuyen en esta cepa con respecto a la mutante en *sepD*, y aun con respecto a la cepa silvestre (Fig. 7C). Este resultado se corroboró al transformar una mutante sencilla en *escN* (Fig. 7C). Estos resultados indican que NleH se degrada, o no se traduce, si no se secreta activamente por el SST3.

La proteína CesT está codificada en el operón LEE5, regulado por Ler (68), la cual funciona como chaperona de varios efectores en patógenos A/E, ya que en su ausencia algunos efectores como Tir o NleA no se secretan (75). Para determinar si la secreción de NleH depende de CesT, una mutante en *cesT* se incluyó en este análisis. Este experimento demostró que la secreción, al igual que la estabilidad de NleH, es dependiente de CesT, ya que no se detecta NleH-HA en el sobrenadante de una mutante en *cesT* y, además, los niveles de la fusión disminuyen marcadamente en el extracto total, sin alterar la transcripción (Fig. 7C). Por el contrario, en el caso de la fusión control pKKespG-HA no se observó una dependencia en CesT para la secreción y estabilidad de la proteína (Fig. 7F). Básicamente los mismos resultados se obtuvieron al analizar la secreción y la transcripción de NleH-HA en medio mínimo M9 modificado, una condición en donde se favorece la secreción de efectores por *C. rodentium* (datos no mostrados). En conjunto, los resultados obtenidos con el análisis de

secreción de NleH, indican que la ausencia de NleH-HA en las mutantes en *ler* y *grlA* es debida posiblemente a que no se expresan CesT, EscN, y el resto de los componentes del SST3 y, por lo tanto, a la inhibición de la secreción, lo cual favorece que NleH se degrade.

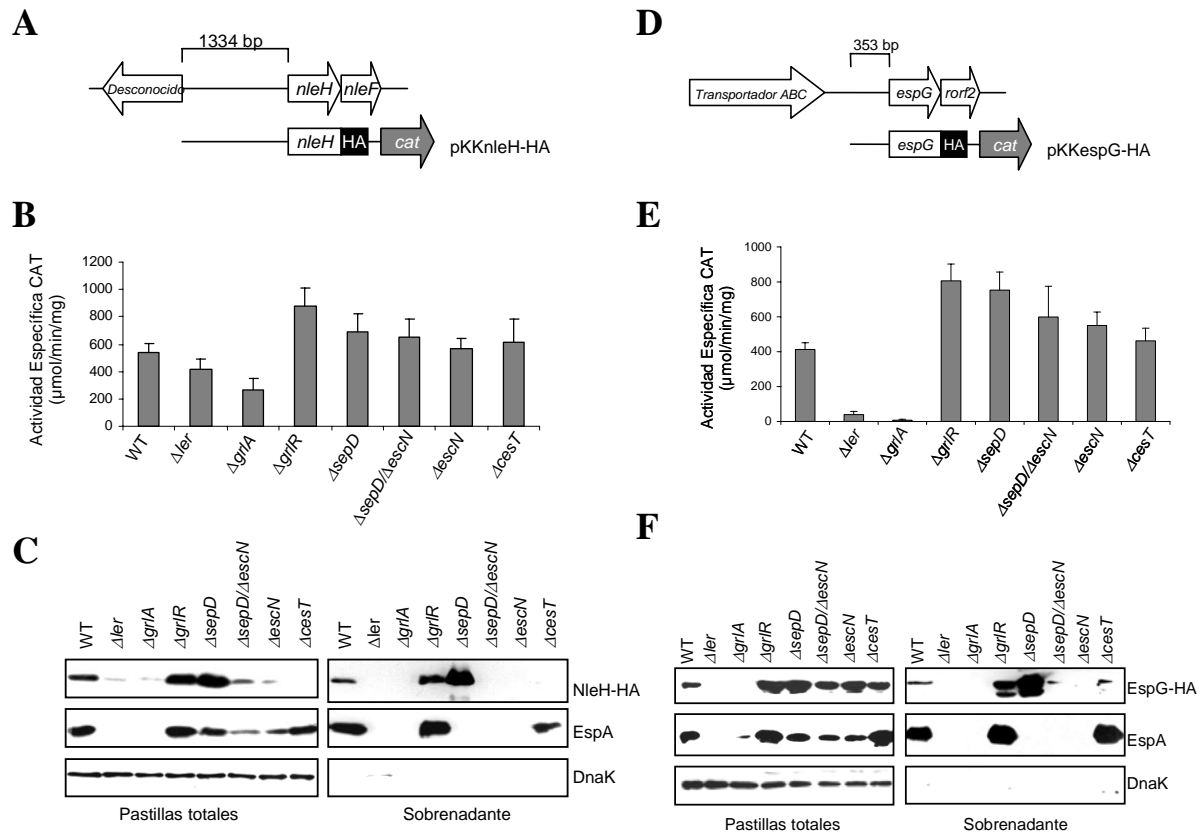


Figura 7. Regulación de la expresión y la secreción de NleH en DMEM. (A) Representación esquemática de la fusión transcripcional de *nleH* al gen reportero *cat* (pKKnleH-HA). La región estructural de *nleH* marcada con un doble epítipo de HA se fusionó a manera de operón al gen reportero *cat* carente de promotor. La fusión incluye 1334 pb corriente arriba del codón de inicio de la traducción de *nleH*. (B) Actividad específica de CAT producida por el pKKnleH-HA en las cepas de *C. rodentium* indicadas, las cuales fueron cultivadas en DMEM por seis horas. Los resultados mostrados son el promedio y la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. (C) Ensayo tipo western de extractos bacterianos totales y proteínas secretadas de los cultivos usados en el experimento mostrado en (B), utilizando anticuerpos anti-HA, anti-EspA y anti-DnaK. Se muestra un experimento con resultados representativos. (D) Representación esquemática de la fusión transcripcional de *espG* al gen reportero *cat* (pKKespG-HA). La región estructural de *espG* etiquetada con dos epítipos de HA se fusionó a manera de operón a *cat*. La fusión incluye 353 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción de *espG*. (E) Actividad específica de CAT obtenida de los cultivos de las cepas de *C. rodentium* indicadas, las cuales fueron transformadas con el pKKespG-HA, después de 6 horas de crecimiento en DMEM. Los resultados mostrados son el promedio y la desviación estándar de cuatro experimentos independientes. (F) Análisis tipo western de extractos totales y proteínas secretadas de las cepas mostradas en (E). Se muestra un experimento con resultados representativos.

Para confirmar el efecto en la estabilidad de NleH mediado por Ler y GrlA, las mutantes en estos genes se transformaron con el plásmido pTnleH-HA, el cual expresa la fusión NleH-HA desde un promotor heterólogo inducible por IPTG, las cepas se cultivaron en DMEM, y las pastillas totales y proteínas secretadas al medio se sometieron a un análisis tipo western para detectar la fusión NleH-HA. En contraste con lo observado en la cepa silvestre y $\Delta grlR$, la fusión NleH-HA no se detecta en los extractos totales o las proteínas secretadas de las cepas Δler o $\Delta grlA$ (Fig. 8A). Por otro lado, no hay diferencias en la detección de la fusión EspG-HA en las mutantes de los reguladores *ler*, *grlA*, y *grlR*, comparados con la cepa silvestre, cuando se expresa desde un promotor inducible por IPTG (Fig. 8B). Este resultado confirma que la proteína NleH es regulada a nivel post-traducciona en las mutantes en los reguladores Ler y GrlA que no expresan el SST3.

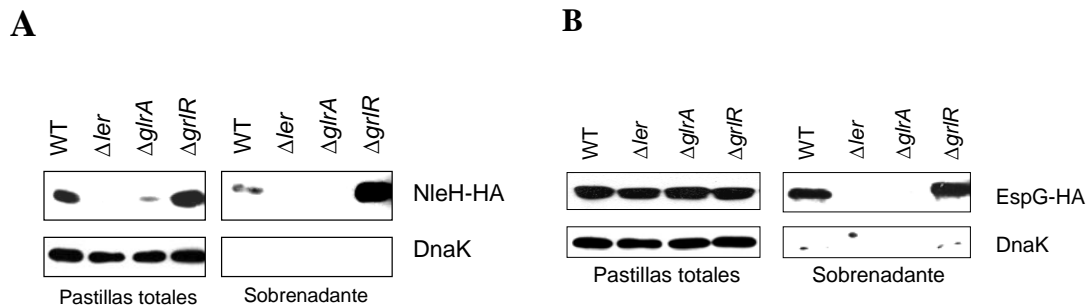


Figura 8. La estabilidad o síntesis de NleH depende de los reguladores Ler y GrlA, los cuales controlan la expresión del SST3 y de CesT. Análisis tipo western de los extractos totales y proteínas secretadas de las cepas de *C. rodentium* indicadas conteniendo los plásmidos pTnleH-HA (A) o pTespG-HA (B), los cuales expresan las proteínas NleH-HA y EspG-HA, respectivamente, desde el promotor inducible P_{lac} . La detección se realizó usando anticuerpos anti-HA y anti-DnaK. La expresión de las fusiones se indujo con 5 μ M de IPTG durante 5 horas. Los experimentos se realizaron dos veces con resultados idénticos.

6.4. Regulación post-traducciona de NleH por la proteasa Lon.

Los resultados anteriores sugieren la existencia de un mecanismo de degradación de la proteína NleH en ausencia de un SST3 activo. Las proteasas dependientes de energía como Lon y ClpP se han involucrado en la expresión o en la estabilidad de efectores de SST3 en diferentes bacterias patógenas (revisado en (5)). Para explorar si estas proteasas son responsables del procesamiento de NleH observado en ausencia de secreción activa, el plásmido pTnleH se introdujo en la cepa de EPEC silvestre y la cepa mutante en $\Delta cesT$, así como en las dobles mutantes $\Delta cesT/\Delta lon$ y $\Delta cesT/\Delta clpP$. Como se muestra en la figura 9, es posible detectar la fusión NleH-HA en las proteínas totales de la cepa mutante en $cesT$ en ausencia de la proteasa Lon, pero continúa degradándose en ausencia de ClpP. Los resultados son los mismos cuando se introduce la fusión pKKnleH-HA, expresando la fusión NleH-HA desde el promotor nativo de *nleH*, en las cepas de EPEC (Fig. 9B). Además, ninguna de las mutaciones afecta significativamente la transcripción de la fusión, medida por la actividad específica de CAT (Fig. 9C). Estos resultados sugieren que en las condiciones donde NleH no es reclutada por CesT para la secreción y, por tanto, no es secretada activamente, esta proteína efectora es dirigida específicamente para degradación mediada por Lon.

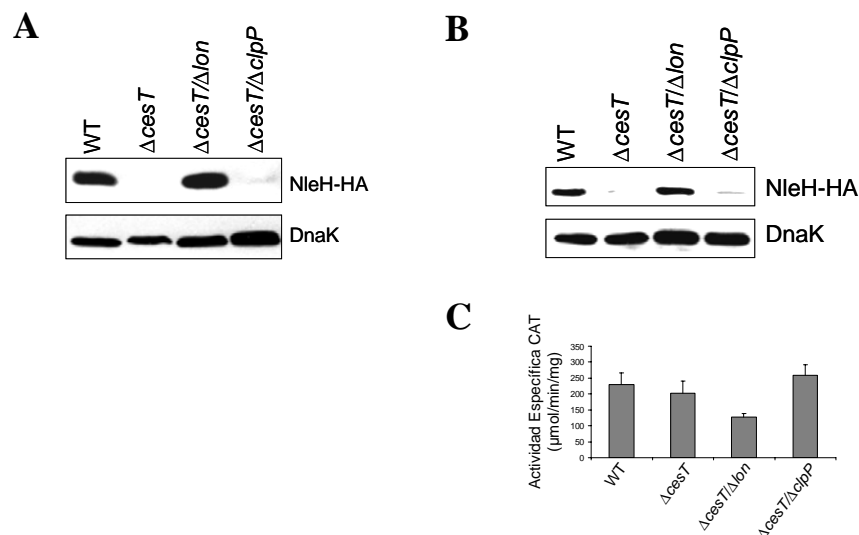


Figura 9. La proteasa Lon está involucrada en la degradación de NleH en ausencia de CesT.

(A) Ensayo tipo western de los extractos totales de las cepas de EPEC indicadas conteniendo el plásmido pTnleH-HA, que expresa NleH-HA desde el P_{lac} , con anticuerpos anti-HA y anti-DnaK. La expresión de la fusión se indujo con 5 μ M de IPTG, durante 5 horas. El experimento se realizó dos veces con resultados idénticos. (B) Análisis tipo western de extractos totales de cepas de EPEC transformadas con el plásmido pKKnleH-HA, con anticuerpos anti-HA y anti-DnaK. El experimento se realizó dos veces con el mismo resultado. (C) Actividad específica de CAT para los cultivos de las cepas de EPEC de donde se obtuvieron las muestras para el experimento que se muestra en el panel (B). Se muestra el promedio y la desviación estándar de dos experimentos independientes.

Para determinar si el efecto regulador que sincroniza la presencia de la proteína NleH a la actividad del SST3 es común entre los efectores codificados fuera del LEE, utilizamos plásmidos codificando versiones del efector NleA y un miembro de la familia de efectores EspX (76) presente en *C. rodentium*, etiquetados con un epítoto FLAG (pFLAG-NleA y pFLAG-EspX, respectivamente), y versiones de EspK y NleG marcados con un doble epítoto de HA (pTespK-HA y pTnleG-HA, respectivamente), para transformar las cepas silvestre y Δ ler de *C. rodentium*. Estas cepas, junto con las cepas silvestre y Δ ler expresando la fusión NleH-HA, se cultivaron en DMEM, induciendo la expresión de las fusiones, y se tomaron alícuotas para analizar la expresión. El ensayo tipo western con muestras obtenidas de estos cultivos

mostró que la mutación en *ler* no afecta la estabilidad de ninguno de los efectores analizados, como sucede para NleH (Fig. 10A y B). La proteína control EspA, regulada a nivel transcripcional por Ler (79), no es detectable en los extractos totales de las cepas Δler (Fig. 10A y B). Este resultado sugiere que el mecanismo de regulación post-traducciona mediado por la actividad del SST3 observado para NleH no es común para todos los efectores codificados fuera del LEE.

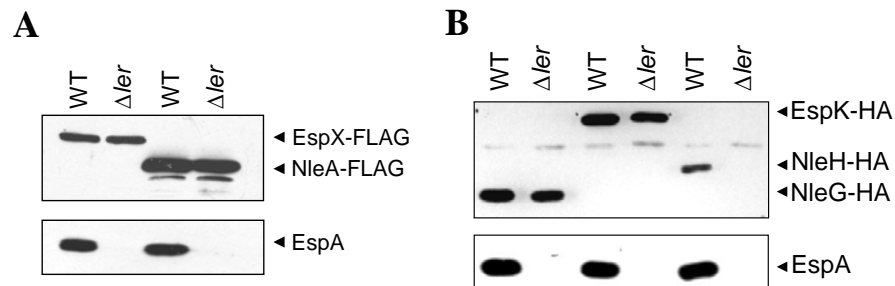


Figura 10. Análisis de la estabilidad de efectores codificados fuera del LEE en mutantes en *ler*.

(A) Ensayo tipo western de las cepas silvestre y Δler de *C. rodentium* transformadas con el pFLAG-NleA y el pFLAG-EspXL, expresando NleA y EspX etiquetados con FLAG, respectivamente, desde el P_{lac} , y (B) pTespK-HA, pTnleG-HA, y pTnleH-HA expresando EspK, NleG y NleH marcados con dos epítopes de HA desde el P_{lac} , utilizando anticuerpos anti-EspA, (A) anti-FLAG y (B) anti-HA. Las cepas se cultivaron en DMEM, y se indujo la expresión de las fusiones con 5 μ M de IPTG. El experimento se realizó dos veces con idénticos resultados.

6.5. Análisis del papel *in vivo* de NleH en *C. rodentium*.

Los resultados anteriores mostraron que NleH posee diferentes características de una proteína efectora, por lo tanto se investigó su papel como factor de virulencia. Para esto, se construyó una mutante nula en el gen *nleH*, reemplazándolo con un gen de resistencia a kanamicina, mediante la técnica de mutagénesis en un solo paso por fragmentos de PCR (13). Se infectaron ratones C57BL/6 con un inóculo oral de 10^8 bacterias de la cepa silvestre y la mutante en *nleH*.

Los animales se sacrificaron a los 6 y 10 días post-infección, y se determinó la carga total de *C. rodentium* en la parte distal del colon. La mutante en *nleH* presentó una moderada, pero estadísticamente significativa ($P=0.01$) reducción en la capacidad de colonizar el colon de ratones a los 6 días PI (Fig. 11A). Sin embargo, a los 10 días PI no hay diferencia entre las UFC recuperadas de los colones de ratones infectados con la cepa silvestre y la cepa $\Delta nleH$ (Fig. 11B). Este modelo es útil para detectar diferencias en colonización asociadas a la falta de secreción tipo 3, ya que mutantes en *nleB* y *escN* presentan un defecto significativo en colonización a los 6 y 10 días P.I., respectivamente, como se ha reportado previamente (19, 39, 82). Este resultado indica que *nleH* puede tener un papel promoviendo la colonización completa de colon en etapas tempranas.

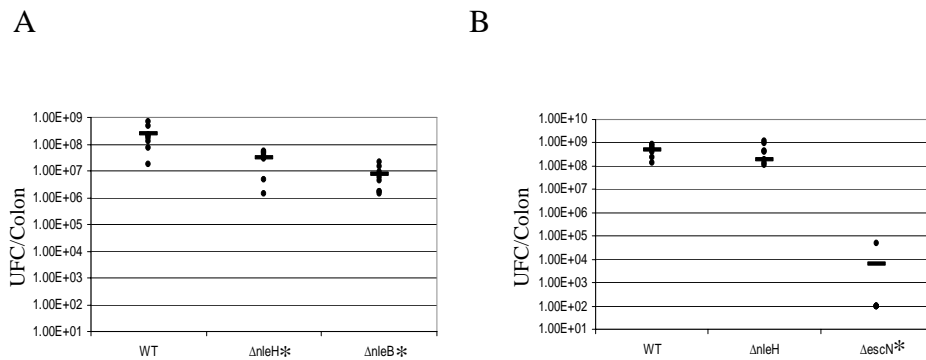


Figura 11. La ausencia de NleH retrasa la colonización de ratones C57BL/6 por *C. rodentium*. Grupos de ratones C57BL/6 se infectaron oralmente con números iguales de bacterias silvestres y mutantes. Los ratones se sacrificaron a los días 6 (A) o 10 (B) post-infección, y la carga total de *C. rodentium* se determinó por dilución serial en MacConkey. * Diferencia estadísticamente significativa comparada con la cepa silvestre ($P \leq 0.01$).

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En los últimos años, el descubrimiento de mutantes hipersecretoras de efectores combinado con técnicas proteómicas y bioinformáticas ha permitido identificar una cantidad significativa de nuevas proteínas efectoras codificadas fuera de la isla LEE en patógenos A/E (19, 58, 76, 81). En este trabajo describimos a NleH, una nueva proteína translocada por el SST3 codificado en el LEE en *C. rodentium*.

El gen *nleH* se encuentra conservado en los genomas de EHEC EDL933 y EPEC E2348/69 (www.sanger.ac.uk). En EPEC y EHEC se encuentran dos copias de *nleH*, ambas localizadas en profagos. Este hecho no resulta inesperado, dada la importancia que poseen los fagos como vectores de diseminación de genes de virulencia, particularmente efectores tipo 3 (22, 76). El gen *nleA* en algunas cepas patógenas de *E. coli* está codificado en un fago inducible que es capaz de diseminar el gen mediante transferencia horizontal (11). Un trabajo reciente (2) demostró que en cepas de EPEC de serotipos O86a, O127 y O142 el gen *nleH* está codificado en un profago que también contiene los genes para la toxina CDT-1. El profago CDT-1 Φ es capaz de formar partículas de fago completas e infectar a la cepa receptora de *E. coli* C600. De manera interesante, en la cepa C600 el fago CDT-1 Φ se inserta en el mismo sitio del locus que contiene al gen *nleH* en *C. rodentium*, entre los genes *yjjG* y *prfC*. El locus de 12.6 kb que contiene a *nleH* en *C. rodentium* posee los genes para la toxina CDT-1, pero no se conservan los genes para la biogénesis del fago completo. El sitio de inserción de *nleH* en *C. rodentium* es diferente a los sitios en que se localizan *nleH1* y *nleH2* en EPEC y EHEC. En este locus se encuentran codificados también los efectores A/E NleG y EspJ, y la proteína secretada por el SST3 NleF. Las diferencias entre los contextos de los genes efectores refuerzan la teoría de una adquisición independiente de algunos de los efectores codificados fuera del LEE mediante eventos múltiples de transferencia horizontal.

Mediante una fusión al epítipo HA, demostramos que el SST3 es capaz de secretar a NleH, y translocarla hacia la célula epitelial, en donde se asocia a la fracción membranal. Durante el desarrollo de este trabajo, Tobe y col. (76), realizaron un análisis bioinformático y proteómico para identificar efectores en el genoma de EHEC 0157:H7 basado en la comparación de más de 300 efectores tipo 3 de diferentes organismos. En ese trabajo se identificaron 39 proteínas efectoras divididas en más de 20 familias. Entre los efectores descritos se encuentran homólogos de NleH1 y NleH2, detectados debido a su identidad con OspG de *S. flexneri*. Ambos homólogos de NleH son secretados por una mutante en SepL, y translocados por el SST3 de la cepa Sakai de EHEC.

Se ha reportado que los primeros 20 codones son suficientes para mediar la secreción y la translocación de los efectores Tir, EspF, Map, Cif y NleI (9). Mediante recortes en la proteína NleH, en este trabajo se demostró que los primeros 19 codones son suficientes para dirigir la secreción al medio a través del SST3, pero no lo son para mediar su translocación hacia la célula epitelial. La translocación se logra con una secuencia más larga del extremo amino terminal, ya que un recorte que contiene los primeros 133 codones fusionados al epítipo de HA es eficientemente translocado. Este dominio es también suficiente para conferir la capacidad de asociarse a membranas. Esta asociación probablemente sea con la membrana plasmática, y no con membranas de organelos, ya que un reporte reciente indica que después de su translocación, NleH de EPEC se localiza bajo el sitio de adhesión de la bacteria (74). En todos los efectores tipo 3 estudiados hasta la fecha, la capacidad de secreción y translocación yace hacia el extremo amino terminal (revisado en (29)). La composición modular del extremo amino terminal consistente en un dominio de secreción y otro de translocación, ha sido reportada en otros modelos, tal es el caso de YopE y YopH, proteínas translocadas por el SST3 Ysc de *Yersinia enterocolitica*. Los primeros 15 residuos de YopE son suficientes para la

secreción de una fusión reportera, mientras que la translocación hacia macrófagos murinos requiere 50 residuos. En el caso de YopH, los primeros 17 codones dirigen la secreción, y se requieren 71 codones para la internalización de la proteína en macrófagos (72).

La translocación de efectores no codificados en el mismo locus que el SST3, y probablemente adquiridos de manera independiente, es un tema común entre los organismos poseedores de tal sistema. En *Salmonella enterica* los efectores SigD/SopB y PipB, codificados en la isla de patogenicidad SPI-5 son translocados por los SST3 codificados en las islas SPI-1 y SPI-2, respectivamente. En *Salmonella*, cada SST3 se expresa en condiciones de crecimiento específicas. En este caso, los efectores son expresados de manera coordinada con el SST3 encargado de translocarlo (43). Un estudio reciente demostró que la transcripción de los genes *nleA*, *nleB*, *nleD* y *nleE* se incrementa en condiciones de inducción del SST3 en EHEC; más aun, la expresión de una fusión traduccional a *nleA* en estas condiciones es dependiente de *ler* (67). Este experimento, sin embargo, no permitió discernir si el efecto de Ler se lleva a cabo de manera transcripcional o post-transcripcional.

En este trabajo se encontró que la expresión de *nleH* no está regulada a nivel transcripcional por Ler o GrlA, los reguladores codificados en el LEE requeridos para la expresión del SST3 en *C. rodentium*. De manera interesante, en este trabajo se encontró que la regulación de la expresión del LEE mediada por Ler tiene influencia a nivel postraduccional en la expresión de NleH, ya que los niveles de NleH en la bacteria se reducen drásticamente en ausencia de Ler y GrlA. Además, los niveles de la proteína NleH disminuyen de manera marcada en ausencia de CesT, al igual que en la cepa deficiente en secreción Δ_{escN} , siendo éste un efecto completamente independiente de la transcripción. De manera reciente, se reportó que CesT funciona como una chaperona que recluta a diferentes proteínas efectoras, codificadas dentro y fuera del LEE, para la secreción tipo 3 (74, 75). Con estos datos, se especuló que cuando NleH

no se secreta activamente, las proteasas previenen su acumulación, potencialmente tóxica, dentro de la célula. La regulación a nivel transcripcional podría ser energéticamente más favorable para controlar los niveles de esta proteína efectora, a través de los mismos mecanismos que regulan la expresión del SST3. El hecho de que no suceda así, podría ser un indicativo de la reciente adquisición de este gen por los patógenos A/E. Sin embargo, aún queda por determinar bajo qué condiciones se activa la transcripción de *nleH*, ya que no podemos descartar la posibilidad de que la expresión espacio-temporal de NleH difiere de la del SST3. Esto implicaría que su activación transcripcional independiente de Ler es necesaria para asegurar su expresión en una etapa diferente durante la infección o en un nicho diferente, una vez que se ha ensamblado el SST3.

Con respecto a la estabilidad de la proteína, reportes recientes han establecido que las proteasas dependientes de energía, tales como Lon y ClpP, controlan la concentración intracelular de factores de virulencia en patógenos bacterianos (revisado en (5)). En este trabajo, se demostró que NleH es completamente estable en ausencia de CesT cuando Lon es inactiva. Este resultado sugiere que cuando NleH no está unida a CesT e involucrada activamente en secreción, la actividad proteolítica de Lon degrada a la proteína acumulada para prevenir efectos no deseados. De manera consistente, los niveles de NleH en la célula se incrementan notablemente cuando está siendo secretada muy eficientemente en la cepa $\Delta sepD$. En ese sentido, bajo condiciones ambientales que no permiten la expresión de los genes del LEE dependiente de Ler, la falta de CesT y los componentes del SST3 activaría la degradación de NleH por proteasas endógenas. Losada y Hutcheson demostraron que los efectores del SST3 en *P. syringae* son degradados por Lon, y que las chaperonas específicamente protegen a los efectores de esta degradación (49). En nuestro modelo, además de CesT, la secreción activa se requiere para proteger a NleH de la degradación. Ciertamente, en *P. syringae* la presencia de un

SST3 activo provee cierto grado de protección a los efectores AvrPto, AvrRpt2 y HopPsyA de la degradación intracelular, aun en presencia de Lon (49). No es claro si el efecto de degradación por Lon ocurre con otros efectores no codificados en el LEE, ya que los homólogos de EspK, EspX, NleA y NleG no se degradan en la mutante en Ler cuando se expresan desde un promotor heterólogo, a pesar de que se ha reportado que el homólogo de NleG en EPEC no es regulado transcripcionalmente por Ler (47). Por otro lado, ClpP se ha involucrado en el control positivo de la expresión de los genes del LEE, regulando los niveles de GrlR y RpoS en EHEC (34). Sin embargo, el moderado incremento en la transcripción que se observa en la cepa $\Delta grlR$ no es suficiente para explicar el aumento en el nivel de NleH acumulada en la bacteria y secretada al medio, particularmente porque este efecto se mantiene al expresar NleH desde un promotor inducible por IPTG. Esto sugiere que GrlR también está relacionado al control post-traducciona l de NleH. Es interesante notar que este efecto de control post-traducciona l no ocurre para EspG, un efector regulado por Ler, cuyos niveles se mantienen en las mutantes en los reguladores cuando se expresa desde un promotor inducible por IPTG.

En conjunto, estos resultados confirmaron que NleH posee características inherentes a las proteínas efectoras, y se procedió a investigar su posible papel durante la infección. A pesar de las diferencias entre los hospederos colonizados, el modelo de infección murino con *C. rodentium* ha sido aceptado como una alternativa para el estudio de los mecanismos involucrados en el establecimiento de una infección causada por EHEC y EPEC en humanos (19, 57). Por lo anterior, en este trabajo se construyó una mutante nula en el gen *nleH* y se evaluó el efecto de la mutación en la colonización de ratones C57BL/6. En este ensayo detectamos una moderada, pero estadísticamente significativa, reducción de aproximadamente 1 log en la capacidad de colonización de colon de ratones a los 6 días post-infección por parte

de la cepa mutante en *nleH*. Este efecto es revertido a los 10 días post-infección, donde no hay diferencia entre la UFC de colonias recuperadas del colon de ratones infectados con la cepa silvestre y la cepa $\Delta nleH$. Este resultado sugiere un papel de NleH en etapas tempranas de la infección con *C. rodentium*. Un papel similar se ha asignado al efector EspG codificado en el LEE. Una mutante en *espG* posee una deficiencia para colonizar y producir hiperplasia en colon de ratones a los seis días PI, sin embargo a los 10 días PI la mutante produce niveles de hiperplasia y colonización similares a la cepa silvestre (33). De los efectores descritos hasta la fecha, solamente Tir, NleA/EspI y EspZ poseen un papel esencial en la colonización de ratones por parte de *C. rodentium* (20, 31, 58). Mientras que una mutante en NleB tiene un fenotipo intermedio en este modelo (39, 82). Para el resto de las proteínas efectoras sólo se han documentado efectos moderados en colonización, virulencia y mortalidad de ratones (12, 17, 19, 39, 51, 81, 83). Este hecho sugiere la existencia de funciones redundantes entre los efectores, cuyo repertorio en patógenos A/E es muy amplio (76). Se ha reportado redundancia funcional para EspG y EspG2, dos proteínas efectoras que comparten 43.5% de identidad en EPEC, las cuales de manera independiente son capaces de activar RhoA y aumentar la permeabilidad paracelular (53), además de ser capaces de inducir la eliminación de los microtúbulos (70). Por otro lado, las proteínas efectoras sin relación a nivel de secuencia Map y EspF, participan en el rompimiento de la función de la barrera epitelial producida por EPEC, la cual se puede producir en ausencia de Map o EspF, pero desaparece completamente en una doble mutante Map/EspF (revisado en (15)). Recientemente se demostró que Map puede interactuar con el regulador de iones Na^+/H^+ intestinal EBP50/NHERF1, a través de una secuencia de interacción con dominios PDZ (71). Otro trabajo demostró que NleA también es capaz de interactuar con proteínas que contienen dominios PDZ, y en particular con EBP50/NHERF1 (45), aunque la existencia de funciones similares entre Map y NleA a través

de esta proteína no se ha comprobado. En ocasiones, los resultados obtenidos para la evaluación *in vivo* de mutantes en efectores depende del modelo utilizado. Una mutante en *espH* de *C. rodentium* no presenta un defecto en colonización o grado de hiperplasia medida por peso de colon en ratones (19, 58); sin embargo, una mutante en *espH* de EHEC reduce la capacidad de colonizar el tracto intestinal de conejos, y reduce la severidad de la diarrea (65). Debido a las diferencias entre los patógenos A/E y sus hospederos específicos, puede ser necesario el análisis de varios modelos para detectar la función de un efector en particular. Algunos efectores han sido estadísticamente asociados a cepas de patógenos A/E con mayor capacidad de causar enfermedad. NleE, el cual posee un papel moderado en colonización de ratones y en la generación de hiperplasia (39, 83), se encuentra asociado a la capacidad de producir diarrea en cepas atípicas de EPEC (1), y con el desarrollo del síndrome urémico hemolítico y la capacidad de producir brotes infecciosos por cepas de EHEC de serotipos distintos a O157 (82). En un trabajo reciente, se utilizó la técnica de hibridación genómica comparativa basada en microarreglos para detectar diferencias en el contenido genómico de 31 cepas de EHEC O157:H7, y la presencia de los genes *nleF*, *nleH1* y *nleH2* se encontró asociada a las cepas de linaje I, las cuales están asociadas más frecuentemente a enfermedad en humanos (85). Estos datos sugieren que el modelo de colonización en ratones por *C. rodentium* no es el indicado para la evaluación del papel de NleH en la enfermedad.

En conclusión, este trabajo demuestra que la proteína NleH es secretada y translocada hacia la célula epitelial por *C. rodentium* a través del SST3 codificado en el LEE. NleH dentro de la célula eucariota se encuentra asociado a membranas. El extremo amino terminal de NleH es necesario y suficiente para conferir la secreción tipo 3. Aunque el dominio de translocación también reside en el extremo amino terminal, requiere una porción más larga que la región suficiente para la secreción. NleH es regulado por una vía post-traducciona que involucra la

degradación específica por la proteasa Lon, dependiente de los reguladores codificados en el LEE, la cual acopla la estabilidad de NleH con el estado funcional del SST3. Una mutante en *nleH* en *C. rodentium* presenta una deficiencia moderada para colonizar colon de ratones en etapas tempranas. Sin embargo, es capaz de colonizar a niveles similares a los de una cepa silvestre en etapas posteriores.

8. PERSPECTIVAS

- Evaluación del papel *in vivo* de NleH en los patógenos A/E utilizando modelos alternativos (infección de ratones C3H/HeJ, conejos, o utilizando el modelo bovino).
- Evaluación de la probable redundancia funcional de NleH con otros efectores del SST3.
- Búsqueda de reguladores transcripcionales específicos para NleH y otros efectores codificados fuera del LEE.
- Estudio del mecanismo de regulación de NleH mediado por la degradación dependiente de Lon.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. **Afset, J. E., G. Bruant, R. Brousseau, J. Harel, E. Anderssen, L. Bevanger, and K. Bergh.** 2006. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3703-3711.
2. **Asakura, M., A. Hinenoya, M. S. Alam, K. Shima, S. H. Zahid, L. Shi, N. Sugimoto, A. N. Ghosh, T. Ramamurthy, S. M. Faruque, G. B. Nair, and S. Yamasaki.** 2007. An inducible lambdoid prophage encoding cytolethal distending toxin (Cdt-I) and a type III effector protein in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**:14483-14488.
3. **Barba, J., V. H. Bustamante, M. A. Flores-Valdez, W. Deng, B. B. Finlay, and J. L. Puente.** 2005. A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *J. Bacteriol.* **187**:7918-7930.
4. **Bustamante, V. H., F. J. Santana, E. Calva, and J. L. Puente.** 2001. Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol. Microbiol.* **39**:664-678.
5. **Butler, S. M., R. A. Festa, M. J. Pearce, and K. H. Darwin.** 2006. Self-compartmentalized bacterial proteases and pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **60**:553-562.
6. **Campellone, K. G., D. Robbins, and J. M. Leong.** 2004. EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. *Dev. Cell.* **7**:217-228.
7. **Caron, E., V. F. Crepin, N. Simpson, S. Knutton, J. Garmendia, and G. Frankel.** 2006. Subversion of actin dynamics by EPEC and EHEC. *Curr. Opin. Microbiol.* **9**:40-45.
8. **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.* **2**:1-9.
9. **Charpentier, X., and E. Oswald.** 2004. Identification of the secretion and translocation domain of the enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector Cif, using TEM-1 beta-lactamase as a new fluorescence-based reporter. *J. Bacteriol.* **186**:5486-5495.
10. **Clarke, S. C., R. D. Haigh, P. P. Freestone, and P. H. Williams.** 2003. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**:365-378.
11. **Creuzburg, K., and H. Schmidt.** 2007. Molecular Characterization and Distribution of Genes Encoding Members of the Type III Effector NleA Family among Pathogenic *Escherichia coli* Strains. *J. Clin. Microbiol.* **45**:2498-2507.
12. **Dahan, S., S. Wiles, R. M. La Ragione, A. Best, M. J. Woodward, M. P. Stevens, R. K. Shaw, Y. Chong, S. Knutton, A. Phillips, and G. Frankel.** 2005. EspJ is a prophage-carried type III effector protein of attaching and effacing pathogens that modulates infection dynamics. *Infect. Immun.* **73**:679-686.

13. **Datsenko, K. A., and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:6640-6645.
14. **Dean, P., and B. Kenny.** 2004. Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein. *Mol. Microbiol.* **54**:665-675.
15. **Dean, P., M. Maresca, and B. Kenny.** 2005. EPEC's weapons of mass subversion. *Curr. Opin. Microbiol.* **8**:28-34.
16. **Dean, P., M. Maresca, S. Schuller, A. D. Phillips, and B. Kenny.** 2006. Potent diarrheagenic mechanism mediated by the cooperative action of three enteropathogenic *Escherichia coli*-injected effector proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**:1876-1881.
17. **Deng, W., Y. Li, P. R. Hardwidge, E. A. Frey, R. A. Pfuetzner, S. Lee, S. Gruenheid, N. C. Strynacka, J. L. Puente, and B. B. Finlay.** 2005. Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens. *Infect. Immun.* **73**:2135-2146.
18. **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.
19. **Deng, W., J. L. Puente, S. Gruenheid, Y. Li, B. A. Vallance, A. Vazquez, J. Barba, J. A. Ibarra, P. O'Donnell, P. Metalnikov, K. Ashman, S. Lee, D. Goode, T. Pawson, and B. B. Finlay.** 2004. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:3597-3602.
20. **Deng, W., B. A. Vallance, Y. Li, J. L. Puente, and B. B. Finlay.** 2003. *Citrobacter rodentium* translocated intimin receptor (Tir) is an essential virulence factor needed for actin condensation, intestinal colonization and colonic hyperplasia in mice. *Mol. Microbiol.* **48**:95-115.
21. **Dziva, F., P. M. van Diemen, M. P. Stevens, A. J. Smith, and T. S. Wallis.** 2004. Identification of *Escherichia coli* O157 : H7 genes influencing colonization of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* **150**:3631-3645.
22. **Ehrbar, K., and W. D. Hardt.** 2005. Bacteriophage-encoded type III effectors in *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium. *Infect. Genet. Evol.* **5**:1-9.
23. **Elliott, S. J., E. O. Krejany, J. L. Mellies, R. M. Robins-Browne, C. Sasakawa, and J. B. Kaper.** 2001. EspG, a novel type III system-secreted protein from enteropathogenic *Escherichia coli* with similarities to VirA of *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* **69**:4027-4033.
24. **Elliott, S. J., V. Sperandio, J. A. Giron, S. Shin, J. L. Mellies, L. Wainwright, S. W. Hutcheson, T. K. McDaniel, and J. B. Kaper.** 2000. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **68**:6115-6126.
25. **Garmendia, J., G. Frankel, and V. F. Crepin.** 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect. Immun.* **73**:2573-2585.

26. **Garmendia, J., A. D. Phillips, M. F. Carlier, Y. Chong, S. Schuller, O. Marches, S. Dahan, E. Oswald, R. K. Shaw, S. Knutton, and G. Frankel.** 2004. TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cell. Microbiol.* **6**:1167-1183.
27. **Gauthier, A., M. de Grado, and B. B. Finlay.** 2000. Mechanical fractionation reveals structural requirements for enteropathogenic *Escherichia coli* Tir insertion into host membranes. *Infect. Immun.* **68**:4344-4348.
28. **Gauthier, A., J. L. Puente, and B. B. Finlay.** 2003. Secretin of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization. *Infect. Immun.* **71**:3310-3319.
29. **Ghosh, P.** 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **68**:771-795.
30. **Gomez-Duarte, O. G., and J. B. Kaper.** 1995. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **63**:1767-1776.
31. **Gruenheid, S., I. Sekirov, N. A. Thomas, W. Deng, P. O'Donnell, D. Goode, Y. Li, E. A. Frey, N. F. Brown, P. Metalnikov, T. Pawson, K. Ashman, and B. B. Finlay.** 2004. Identification and characterization of NleA, a non-LEE-encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* **51**:1233-1249.
32. **Haack, K. R., C. L. Robinson, K. J. Miller, J. W. Fowlkes, and J. L. Mellies.** 2003. Interaction of Ler at the *LEE5* (*tir*) operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **71**:384-392.
33. **Hardwidge, P. R., W. Deng, B. A. Vallance, I. Rodriguez-Escudero, V. J. Cid, M. Molina, and B. B. Finlay.** 2005. Modulation of host cytoskeleton function by the enteropathogenic *Escherichia coli* and *Citrobacter rodentium* effector protein EspG. *Infect. Immun.* **73**:2586-2594.
34. **Iyoda, S., and H. Watanabe.** 2005. ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **187**:4086-4094.
35. **Iyoda, S., and H. Watanabe.** 2004. Positive effects of multiple *pch* genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 to HEp-2 cells. *Microbiology* **150**:2357-2571.
36. **Jordan, D. M., N. Cornick, A. G. Torres, E. A. Dean-Nystrom, J. B. Kaper, and H. W. Moon.** 2004. Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in vivo. *Infect. Immun.* **72**:6168-6171.
37. **Kanack, K. J., J. A. Crawford, I. Tatsuno, M. A. Karmali, and J. B. Kaper.** 2005. SepZ/EspZ is secreted and translocated into HeLa cells by the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system. *Infect. Immun.* **73**:4327-4337.
38. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:123-140.
39. **Kelly, M., E. Hart, R. Mundy, O. Marches, S. Wiles, L. Badea, S. Luck, M. Tauschek, G. Frankel, R. M. Robins-Browne, and E. L. Hartland.** 2006. Essential role of the type III secretion system effector NleB in colonization of mice by *Citrobacter rodentium*. *Infect. Immun.* **74**:2328-2337.

40. **Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey, and B. B. Finlay.** 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**:511-520.
41. **Kenny, B., S. Ellis, A. D. Leard, J. Warawa, H. Mellor, and M. A. Jepson.** 2002. Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. *Mol. Microbiol.* **44**:1095-1107.
42. **Kim, D. W., G. Lenzen, A. L. Page, P. Legrain, P. J. Sansonetti, and C. Parsot.** 2005. The *Shigella flexneri* effector OspG interferes with innate immune responses by targeting ubiquitin-conjugating enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**:14046-14051.
43. **Knodler, L. A., J. Celli, W. D. Hardt, B. A. Vallance, C. Yip, and B. B. Finlay.** 2002. *Salmonella* effectors within a single pathogenicity island are differentially expressed and translocated by separate type III secretion systems. *Mol. Microbiol.* **43**:1089-1103.
44. **Kujat Choy, S. L., E. C. Boyle, O. Gal-Mor, D. L. Goode, Y. Valdez, B. A. Vallance, and B. B. Finlay.** 2004. SseK1 and SseK2 are novel translocated proteins of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. *Infect. Immun.* **72**:5115-5125.
45. **Lee, S. F., M. Kelly, A. McAlister, S. N. Luck, E. L. Garcia, R. A. Hall, R. M. Robins-Browne, G. Frankel, and E. L. Hartland.** 2007. A C-terminal class I PDZ binding motif of EspI/NleA modulates the virulence of attaching and effacing *Escherichia coli* and *Citrobacter rodentium*. *Cell. Microbiol.*
46. **Levine, M. M., E. J. Bergquist, D. R. Nalin, D. H. Waterman, R. B. Hornick, C. R. Young, and S. Sotman.** 1978. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* **1**:1119-1122.
47. **Li, M., I. Rosenshine, H. B. Yu, C. Nadler, E. Mills, C. L. Hew, and K. Y. Leung.** 2006. Identification and characterization of NleI, a new non-LEE-encoded effector of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Microbes. Infect.* **8**:2890-2898.
48. **Lio, J. C., and W. J. Syu.** 2004. Identification of a negative regulator for the pathogenicity island of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biomed. Sci.* **11**:855-863.
49. **Losada, L. C., and S. W. Hutcheson.** 2005. Type III secretion chaperones of *Pseudomonas syringae* protect effectors from Lon-associated degradation. *Mol. Microbiol.* **55**:941-953.
50. **Marches, O., T. N. Ledger, M. Boury, M. Ohara, X. Tu, F. Goffaux, J. Mainil, I. Rosenshine, M. Sugai, J. De Rycke, and E. Oswald.** 2003. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Mol. Microbiol.* **50**:1553-1567.
51. **Marches, O., S. Wiles, F. Dziva, R. M. La Ragione, S. Schuller, A. Best, A. D. Phillips, E. L. Hartland, M. J. Woodward, M. P. Stevens, and G. Frankel.** 2005. Characterization of two non-locus of enterocyte effacement-encoded type III-translocated effectors, NleC and NleD, in attaching and effacing pathogens. *Infect. Immun.* **73**:8411-8417.

52. **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.
53. **Matsuzawa, T., A. Kuwae, and A. Abe.** 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli* type III effectors EspG and EspG2 alter epithelial paracellular permeability. *Infect. Immun.* **73**:6283-6289.
54. **Maurelli, A. T.** 2007. Black holes, antivirulence genes, and gene inactivation in the evolution of bacterial pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* **267**:1-8.
55. **Mayer, M. P.** 1995. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**:41-46.
56. **Mellies, J. L., A. M. Barron, and A. M. Carmona.** 2007. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Virulence Gene Regulation. *Infect. Immun.* **75**:4199-4210.
57. **Mundy, R., T. T. MacDonald, G. Dougan, G. Frankel, and S. Wiles.** 2005. *Citrobacter rodentium* of mice and man. *Cell. Microbiol.* **7**:1697-1706.
58. **Mundy, R., L. Petrovska, K. Smollett, N. Simpson, R. K. Wilson, J. Yu, X. Tu, I. Rosenshine, S. Clare, G. Dougan, and G. Frankel.** 2004. Identification of a novel *Citrobacter rodentium* type III secreted protein, EspI, and roles of this and other secreted proteins in infection. *Infect. Immun.* **72**:2288-2302.
59. **Nagai, T., A. Abe, and C. Sasakawa.** 2005. Targeting of enteropathogenic *Escherichia coli* EspF to host mitochondria is essential for bacterial pathogenesis: critical role of the 16th leucine residue in EspF. *J. Biol. Chem.* **280**:2998-3011.
60. **Nougayrede, J. P., and M. S. Sonnenberg.** 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. *Cell. Microbiol.* **6**:1097-1111.
61. **Pallen, M. J., S. A. Beatson, and C. M. Bailey.** 2005. Bioinformatics, genomics and evolution of non-flagellar type-III secretion systems: a Darwinian perspective. *FEMS Microbiol. Rev.* **29**:201-229.
62. **Pallen, M. J., and B. W. Wren.** 2007. Bacterial pathogenomics. *Nature* **449**:835-42.
63. **Porter, M. E., P. Mitchell, A. J. Roe, A. Free, D. G. Smith, and D. L. Gally.** 2004. Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, PerA from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **54**:1117-1133.
64. **Ravinder, K., G., Borthakur, A., Hodges, K., Turner, J. R., Clayburg, D. R., Saksena, S., Zaheer, A., Ramaswamy, K., Hecht, G. and Dudeja, P. K.** 2007. Mechanism underlying inhibition of intestinal apical Cl⁻/OH⁻ exchange following infection with enteropathogenic *E. coli*. *J. Clin. Invest.* **117**:428-437.
65. **Ritchie, J. M., and M. K. Waldor.** 2005. The locus of enterocyte effacement-encoded effector proteins all promote enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenicity in infant rabbits. *Infect. Immun.* **73**:1466-1474.
66. **Rodriguez-Escudero, I., P. R. Hardwidge, C. Nombela, V. J. Cid, B. B. Finlay, and M. Molina.** 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli* type III effectors alter cytoskeletal function and signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **151**:2933-2945.
67. **Roe, A. J., L. Tysall, T. Dransfield, D. Wang, D. Fraser-Pitt, A. Mahajan, C. Constandinou, N. Inglis, A. Downing, R. Talbot, D. G. Smith, and D. L. Gally.**

2007. Analysis of the expression, regulation and export of NleA-E in *Escherichia coli* O157 : H7. *Microbiology* **153**:1350-1360.
68. **Sanchez-SanMartin, C., V. H. Bustamante, E. Calva, and J. L. Puente.** 2001. Transcriptional regulation of the *orf19* gene and the *tir-cesT-eae* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:2823-33.
69. **Schauer, D. B., and S. Falkow.** 1993. Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect. Immun.* **61**:2486-2492.
70. **Shaw, R. K., K. Smollett, J. Cleary, J. Garmendia, A. Straatman-Iwanowska, G. Frankel, and S. Knutton.** 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli* type III effectors EspG and EspG2 disrupt the microtubule network of intestinal epithelial cells. *Infect. Immun.* **73**:4385-4390.
71. **Simpson, N., R. Shaw, V. F. Crepin, R. Mundy, A. J. FitzGerald, N. Cummings, A. Straatman-Iwanowska, I. Connerton, S. Knutton, and G. Frankel.** 2006. The enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system effector Map binds EBP50/NHERF1: implication for cell signalling and diarrhoea. *Mol. Microbiol.* **60**:349-363.
72. **Sory, M. P., A. Boland, I. Lambermont, and G. R. Cornelis.** 1995. Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**:11998-12002.
73. **Spears, K. J., A. J. Roe, and D. L. Gally.** 2006. A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* **255**:187-202.
74. **Thomas, N. A., W. Deng, N. T. Baker, J. L. Puente, and B. B. Finlay.** 2007. Hierarchical delivery of an essential host colonization factor in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **282**:29634-29645.
75. **Thomas, N. A., W. Deng, J. L. Puente, E. A. Frey, C. K. Yip, N. C. Strynadka, and B. B. Finlay.** 2005. CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **57**:1762-1779.
76. **Tobe, T., S. A. Beatson, H. Taniguchi, H. Abe, C. M. Bailey, A. Fivian, R. Younis, S. Matthews, O. Marches, G. Frankel, T. Hayashi, and M. J. Pallen.** 2006. An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:14941-14946.
77. **Torres, A. G., L. Milflores-Flores, J. G. Garcia-Gallegos, S. D. Patel, A. Best, R. M. La Ragione, Y. Martinez-Laguna, and M. J. Woodward.** 2007. Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae (LPF) of *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Med. Microbiol.* **297**:177-185.
78. **Tu, X., I. Nisan, C. Yona, E. Hanski, and I. Rosenshine.** 2003. EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **47**:595-606.
79. **Umanski, T., I. Rosenshine, and D. Friedberg.** 2002. Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**:2735-2744.

80. **Vidal, J. E., A. Canizalez-Roman, J. Gutierrez-Jimenez, and F. Navarro-Garcia.** 2007. Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex.* **49**:376-386.
81. **Vlisidou, I., O. Marches, F. Dziva, R. Mundy, G. Frankel, and M. P. Stevens.** 2006. Identification and characterization of EspK, a type III secreted effector protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol. Lett.* **263**:32-40.
82. **Wickham, M. E., C. Lupp, M. Mascarenhas, A. Vazquez, B. K. Coombes, N. F. Brown, B. A. Coburn, W. Deng, J. L. Puente, M. A. Karmali, and B. B. Finlay.** 2006. Bacterial genetic determinants of non-O157 STEC outbreaks and hemolytic-uremic syndrome after infection. *J. Infect. Dis.* **194**:819-827.
83. **Wickham, M. E., C. Lupp, A. Vazquez, M. Mascarenhas, B. Coburn, B. K. Coombes, M. A. Karmali, J. L. Puente, W. Deng, and B. B. Finlay.** 2007. *Citrobacter rodentium* virulence in mice associates with bacterial load and the type III effector NleE. *Microbes. Infect.* **9**:400-407.
84. **Yip, C. K., T. G. Kimbrough, H. B. Felise, M. Vuckovic, N. A. Thomas, R. A. Pfuetzner, E. A. Frey, B. B. Finlay, S. I. Miller, and N. C. Strynadka.** 2005. Structural characterization of the molecular platform for type III secretion system assembly. *Nature* **435**:702-707.
85. **Zhang, Y., C. Laing, M. Steele, K. Ziebell, R. Johnson, A. K. Benson, E. Taboada, and V. P. Gannon.** 2007. Genome evolution in major *Escherichia coli* O157:H7 lineages. *BMC Genomics* **8**:121-136.
86. **Zurawski, D. V., K. L. Mumy, L. Badea, J. A. Prentice, E. L. Hartland, B. A. McCormick, and A. T. Maurelli.** 2007. NleE/OspZ family of effector proteins is required for PMN transepithelial migration, a characteristic shared by enteropathogenic *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* infections. *Infect. Immun.*

1 **Regulation of expression and secretion of NleH, a new non-LEE-**
2 **encoded effector in *Citrobacter rodentium*.**

3
4 **Víctor A. García-Angulo¹, Wanyin Deng², Nikhil A. Thomas^{2,3}, B. Brett**
5 **Finlay² and José L. Puente^{1*}**

6 Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología,
7 Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico,¹
8 Michael Smith Laboratories, University of British Columbia, Vancouver, British
9 Columbia, Canada² and Department of Microbiology and Immunology/Medicine,
10 Dalhousie University, Halifax, Nova Scotia, Canada³.
11

12
13
14
15
16 **Running title:** NleH of *Citrobacter rodentium*.

17
18 Key words: Type 3 secretion system, effector protein, EPEC, EHEC, Ler, GrlA,
19 CstT

20
21 ***Corresponding author. Mailing address: Departamento de Microbiología**
22 **Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de**
23 **México, Av. Universidad 2001, Cuernavaca, Morelos 62210, México. Phone:**
24 **(52) (777) 329-1621. Fax: (52) (777) 313-8673. E-mail: puente@ibt.unam.mx.**

25 **Abstract**

26 Together with enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic *Escherichia coli*
27 (EPEC), *Citrobacter rodentium* is a member of the “attaching and effacing” (A/E)
28 family of bacterial pathogens. A/E pathogens use a type III secretion system
29 (T3SS) to translocate an assortment of effector proteins, encoded both within
30 and outside the locus of enterocyte effacement (LEE), into the colonized host cell
31 leading to the formation of A/E lesions and disease. Here we report the
32 identification and characterization of a new non-LEE encoded effector NleH in *C.*
33 *rodentium*. NleH is conserved among A/E pathogens and shares identity with
34 OspG, a type III secreted effector protein in *Shigella flexneri*. Downstream of
35 *nleH*, genes encoding homologues of the non-LEE-encoded effectors EspJ and
36 NleG/NleI are found. NleH secretion and translocation into Caco-2 cells requires
37 a functional T3SS and signals located at its amino terminal domain. Transcription
38 of *nleH* is not significantly reduced in mutants lacking the LEE-encoded
39 regulators Ler and GrlA; however, NleH protein levels are highly reduced in these
40 strains, as well as in *escN* and *cesT* mutants. Inactivation of Lon, but not of ClpP,
41 protease restores NleH levels even in the absence of CesT. Our results indicate
42 that the efficient engagement of NleH in active secretion is needed for its
43 stability, thus establishing a post-translational regulatory mechanism that co-
44 regulates NleH levels with the expression of LEE-encoded proteins. A *C.*
45 *rodentium nleH* mutant shows a moderate defect during the colonization of
46 C57BL/6 mice at early stages of infection.

47

INTRODUCTION

48

49 Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and enterohemorrhagic *E. coli*
50 (EHEC) are important causes of infectious diarrhea. EPEC is the leading cause
51 of severe watery bacterial diarrhea in children under six months of age living in
52 developing countries. EHEC infections are associated with outbreaks of bloody
53 diarrhea and hemorrhagic colitis in the developed world and can lead to severe
54 kidney failure due to the development of the often fatal hemolytic-uremic
55 syndrome (HUS) (33). EPEC and EHEC are non-invasive pathogens that infect
56 their host by adhering to the surface of the intestinal epithelial cells. These
57 organisms belong to a family of pathogens capable of producing a common
58 histopathology denominated the attaching and effacing (A/E) lesion, which is
59 characterized by the localized destruction of the enterocyte microvilli, and the
60 formation of pedestal-shaped actin rich structures underneath the adherent
61 bacteria (30). The *in vivo* study of the mechanisms underlying EPEC and EHEC
62 pathogenesis has been difficult to perform mainly due to the inability of these
63 pathogens to efficiently colonize laboratory animals. Because of this, *Citrobacter*
64 *rodentium*, an A/E pathogen that naturally colonizes laboratory mice causing A/E
65 lesions and disease, has emerged as a suitable model to study A/E infections
66 (48).

67 The genes required for A/E lesion formation are located within the locus of
68 enterocyte effacement (LEE) and encode an assortment of proteins involved in
69 the assembly of a type three secretion system (T3SS), intimate attachment,

70 effector functions, chaperones and regulation, which at different degrees are all
71 required for virulence (15, 21).

72 The LEE also encodes SepL and SepD, two proteins that form a
73 molecular switch that confers specificity to the T3SS for the secretion of
74 translocator proteins. In addition, this switch acts as a gatekeeper for the
75 secretion of effector proteins, as mutants in *sepD* or *sepL* hypersecrete them,
76 without secreting translocator proteins (14, 15). Proteomic analysis of the
77 secreted proteins of a *C. rodentium* *sepD* mutant led us to the identification of
78 seven new T3SS-secreted proteins, all of which are encoded outside the LEE in
79 *C. rodentium* and other A/E pathogens. We named these proteins non-LEE-
80 encoded effectors (Nle): NleA, NleB, NleC, NleD, NleE, NleF and NleG (15).
81 Further characterization of NleA (also called EspI), which is widely distributed
82 among EHEC and EPEC strains (9, 10, 49), showed that it is critical for virulence
83 and colonization of the mouse colon and upon translocation into epithelial cells
84 localizes to the Golgi apparatus (27, 49). NleB, which plays a key role for *C.*
85 *rodentium* virulence (35, 65), is encoded within O-island O122, which has been
86 proposed to enhance virulence in EHEC O157:H7 strains (34), be associated
87 with diarrheal disease due to atypical EPEC (1) and associated with the LEE
88 forming a mosaic island in EHEC and atypical EPEC strains of serogroup O26
89 (4). It has also been demonstrated that NleC and NleD are translocated through
90 the EHEC T3SS. NleC is not required for EHEC colonization of lambs or calves
91 or for *C. rodentium* colonization of mice (35, 41). An EHEC EDL933 *nleD* mutant
92 was originally identified by signature-tagged mutagenesis as being attenuated in

93 calves (17); however, it was later reported that no attenuation was observed for
94 *nleD* deletion mutants of both EHEC 85-170 and EDL933 (41). The *nleE* gene is
95 also associated with EHEC O-island 122 (34) and *C. rodentium nleE* mutants are
96 attenuated in mixed infections and produce delayed mortality in susceptible mice
97 (35, 66). The role of NleG *in vivo* has not been studied; however, a NleG
98 homologue found in EPEC, named NleI, has been shown to be translocated into
99 epithelial cells in a T3S-dependent manner (39). A recent proteomic and
100 bioinformatic approach expanded the number of effectors in EHEC to 39, which
101 were classified into 20 families (61). In addition to the Nle proteins, other non-
102 LEE encoded effectors have been described in A/E pathogens (reviewed in (21)).

103 Along with the acquisition of virulence factors, pathogenic bacteria have
104 also acquired or developed regulatory mechanisms to ensure the appropriate
105 spatio-temporal expression of such factors. In A/E pathogens, the expression of
106 LEE-encoded genes is tightly regulated by both global and A/E specific
107 regulatory factors (reviewed in (45)). The LEE encodes three A/E specific
108 regulators. Ler (LEE-encoded regulator) has an essential role in the positive
109 regulation of all the genes within the LEE (5, 28, 46, 54), as well as of others
110 located outside the LEE such as *espC* in EPEC (20) and *lpf* in EHEC (62). Ler
111 positively regulates LEE gene expression by counteracting the repression
112 exerted by the global regulator H-NS (5, 28, 63). The first gene of the LEE1
113 operon encodes Ler, which expression is negatively and positively regulated by a
114 myriad of global regulatory proteins (reviewed in (45)). In addition, A/E specific
115 regulatory proteins such as the EAF plasmid-encoded PerC in EPEC (5, 26, 50)

116 or Pch in EHEC (32), as well as GrIA, which is also encoded within the LEE (3,
117 15), play critical roles in *ler* positive regulation; while GrIR, which is co-expressed
118 with GrIA, has a negative role (15, 40). Interestingly, Ler and GrIA establish a
119 positive regulatory loop that, together with GrIR, seems to modulate Ler levels in
120 the cell (3). Ler and GrIA have been shown to play an essential role *in vivo* (15,
121 68). Furthermore, the regulatory mechanisms associated with the expression of
122 effector genes located outside the LEE have just started to be elucidated (47, 51,
123 53).

124 Due to its association with the gene coding for the previously identified
125 non-LEE-encoded effector NleF in *C. rodentium* and its similarity with OspG of *S.*
126 *flexneri*, we hypothesized that the upstream gene, herein denominated *nleH*, was
127 likely to encode an effector protein. Using 2HA and CyaA-tagged versions of
128 NleH, we showed that its secretion and translocation to epithelial cells depends
129 on a functional T3SS and that upon translocation it localizes to the cell
130 membranes. Regulation of *nleH* was analyzed in different regulatory and
131 secretory mutants using an operon fusion between the entire *nleH* gene and the
132 *cat* reporter gene. NleH is regulated at the post-translational level by a novel
133 mechanism that couples protein stability with Ler-GrIA-dependent regulation of
134 LEE gene expression. Its role in colonization was assessed using the murine
135 model of infection.

136

137

138

MATERIALS AND METHODS

139 **Bacterial strains, plasmids, cell lines and culture conditions.** The
140 bacterial strains and plasmids used in this study are described in Table 1.
141 Bacteria were grown at 37 °C in Luria-Bertani (LB) broth or agar, or in Dulbecco's
142 modified Eagle's medium (DMEM). When required, the medium was
143 supplemented with ampicillin (100 µg/mL) and kanamycin (30 µg/mL). Growth of
144 *C. rodentium* in DMEM was carried out at 37°C, 5% (v/v) CO₂ atmosphere
145 without shaking. When EPEC was grown in DMEM, media were supplemented
146 with 1% LB, and incubated at 37°C with shaking (220 rpm). Caco-2 (ATCC HTB-
147 37) cells were cultivated in minimum essential medium (MEM) buffered with 2.4
148 g/L HEPES and supplemented with 15% (v/v) fetal bovine serum (FBS) and 200
149 mM L-glutamine at 37 °C in a humidified 5% (v/v) CO₂ atmosphere.

150 **Construction of deletion mutants and plasmids.** Deletion of the *nleH*
151 gene from *C. rodentium* DBS100 was performed by the one-step mutagenesis
152 procedure developed by Datsenko and Wanner (12). The mutation eliminated the
153 structural region of *nleH* and replaced it with a Km resistance marker. For the
154 construction of plasmid pTnleH-HA expressing NleH tagged with a double
155 hemagglutinin (2HA) epitope, the DNA sequence containing the *nleH* putative
156 ribosome binding site and the NleH coding region without its stop codon was
157 amplified by PCR from the *C. rodentium* DBS100 genome using primers NleHCF
158 (5'-GCAAAAAGCTTCCGGTTTTTGTGTCATGTCAGGG-3') and NleHCR (5'-
159 GCCACTCGAGAATTCTACTTAATACCACTCTGATAAG-3') containing HindIII
160 and XhoI sites, respectively. The resulting PCR product was digested with
161 HindIII-XhoI and ligated into pTOPO-2HA (Table 1) digested with the same

162 restriction enzymes. EPEC $\Delta lon/\Delta ler$ and $\Delta lon/\Delta grlA$ mutants were generated by
 163 the *sacB* gene-based allelic exchange method, as described previously (15)
 164 using suicide clones carrying in frame deletions of *grlA* and *ler* (Table 1).

165 To generate pTnleH20-293HA and pTnleH1-133HA expressing truncated
 166 versions of NleH-2HA, pTnleH-HA DNA was used as template for inverse PCR
 167 (IPCR) with primers RecHA (5'-
 168 AGCTCCGGTACCCATACATTTCAACCTTCAAATAAGAC-3') and RecH20B
 169 (5'-AGAAACGGTACCTCGCCTGATAATGCCGTCTTATCC-3') that were
 170 designed to eliminate *nleH* codons 2 to 19 and to introduce KpnI sites. The
 171 resulting PCR products were digested with KpnI and self-ligated. To generate
 172 pTnleH1-133HA, pTnleH-HA DNA was used as template for inverse PCR with
 173 primers NleHHAF (5'-AGTCGCTCGAGTATCCGTATGATG-3') and NleH2AC160
 174 (5'-ATTACCCTCGAGGGGTGACTTGTTATAGTCCAC-3') that were designed to
 175 eliminate *nleH* codons 134 to 293 and to introduce XhoI sites. The resulting PCR
 176 products were digested with XhoI and self-ligated.

177 To generate a plasmid containing the 2HA tagged *nleH* gene and the *cat*
 178 reporter gene forming an operon under the control of the *nleH* regulatory region,
 179 the *nleH* coding region without its stop codon plus 1334 bp upstream of the
 180 translational start codon was amplified by PCR from the *C. rodentium* genome
 181 using primers NleHReg (5'-AAGTGCAAGCTTCCTCATAAGATGGAAAAGTGC-
 182 3') and NleHCR. The resulting PCR product was cloned into the HindIII-XhoI
 183 sites of pTOPO-2HA to generate pTregNleH-HA (Table 1). Next, PCR reactions
 184 were performed to amplify the whole insert from pTregNleH-HA including the

185 sequence corresponding to the double HA epitope. The resulting PCR product
186 was cloned into the BamHI-HindIII sites of pKK232-8 to generate pKKnleH-HA
187 (Table 1). Likewise, pKKespG-HA was constructed using primers EspGHibF (5'-
188 GTCCTAGGATCCCCGGGGCGGGGTCAGTCC-3') and EspGHibR (5'-
189 GTAATACTCGAGAGCATTGTTTCAGATATGTTTCAG-3') designed to amplify
190 *espG* from the *C. rodentium* chromosome, including 353 bp upstream of the start
191 codon. The PCR product was cloned into the BamHI-XhoI sites of pKKnleH-HA.

192 To create a vector suitable for the construction of *CyaA* reporter fusions,
193 the sequence corresponding to codons 2 to 401 of the *cyaA* sequence contained
194 in pOG-ATC Δ 304 were amplified by PCR and cloned into the EcoRI-NotI sites of
195 pMPM-K3, to generate pK3cyaA (Table 1). pK3cyaA possesses unique PstI and
196 BglII sites at the *cyaA* 5' end. To generate pK3nleHcyaA, the *nleH* coding region
197 without its stop codon, plus 73 bp upstream of the start codon, was amplified
198 from the *C. rodentium* chromosome, and cloned into the HindIII-PstI sites of
199 pK3cyaA. To construct pK3nleH1-19cyaA, pK3nleHcyaA DNA was used as
200 template for IPCR with primers containing PstI restriction sites that were
201 designed to amplify *nleH* without codons 20-293. The resulting PCR product was
202 PstI digested and self-ligated.

203 **Protein secretion assays.** Fifty mLs of DMEM with the appropriate
204 antibiotic were inoculated with 500 μ L of a LB broth overnight culture (O.D._{600nm} =
205 2) of the indicated strains, incubated for 1 hour at 37°C, in a 5% CO₂ atmosphere
206 without shaking, then induced with 0.5 mM or 5 μ M IPTG, and incubated for
207 another 5 hours. Bacteria were harvested by centrifugation at 17900 X g for 10

208 min. Secreted proteins were precipitated from 1350 μ L of culture supernatants of
209 each strain with 10% trichloroacetic acid (TCA) at 4°C overnight and
210 concentrated by centrifugation at 17900 X g for 30 min at 4°C. The resulting
211 fractions were subjected to SDS-PAGE and western blot analysis.

212 **Cellular fractionation.** Mechanical fractionation of infected epithelial cells
213 was performed as previously described (23), with slight modifications. Caco-2
214 cell monolayers (approximately 2×10^6 cells) in 75 cm² flasks were inoculated with
215 200 μ L of a 3 hrs pre-induced DMEM culture of EPEC strains (MOI=25) carrying
216 different plasmids. Infection proceeded for 1.5 hours, then the expression of NleH
217 and its derivatives was induced by adding 0.5 mM IPTG and incubating for
218 another 1.5 hours. Media were discarded from monolayers, cells were washed
219 three times with PBS, and harvested after treatment with 0.025 % trypsin/0.2 g/L
220 EDTA in PBS. After washing the cells three times with ice-cold PBS, they were
221 resuspended in 300 μ l of homogenization buffer (3 mM imidazole (pH 7.4), 250
222 mM sucrose, 0.5 mM EDTA), plus a protease inhibitor cocktail (Roche). Cells
223 were mechanically disrupted by vigorous passage (two times) through a 22-
224 gauge needle, and six times through a 27-gauge needle. Low speed
225 centrifugation (3000 X g) for 15 min was applied to this homogenate to pellet
226 bacteria, unbroken Caco-2 cells, host nuclei and cytoskeleton components (low
227 speed pellet). The supernatant was then subjected to ultracentrifugation at 33000
228 X g for 60 min to separate the insoluble fraction (host cell membranes) from the
229 soluble fraction (host cytosol). The resulting fractions were resolved by SDS-

230 PAGE (10% polyacrylamide) and transferred to nitrocellulose for western blot
231 analysis.

232 **Western blot assays.** Nitrocellulose membranes containing transferred
233 proteins were blocked in 5% non-fat milk for 1 hour. Membranes were incubated
234 with either a 1:5000 dilution of an anti-HA monoclonal (MAb) (Covance); 1:15000
235 dilution of an anti-DnaK MAb (Invitrogen); a 1:5000 dilution of an anti-CyaA MAb
236 (Cedarlane); a 1:10000 dilution of an anti- γ -tubulin MAb (Sigma); a 1:10000
237 dilution of an anti-calnexin rabbit polyclonal (Sigma); and a 1:20000 dilution of an
238 anti-EspA rabbit polyclonal (kind gift of V. Sperandio and J.B. Kaper). Secondary
239 antibodies included goat anti-rabbit IgG (Pierce) at a 1:10000 dilution and rabbit
240 anti-mouse IgG (Pierce) at a 1:10000 dilution. Positive signals were visualized by
241 Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin-Elmer).

242 **Infection analysis of *C. rodentium* in mice.** Three- to four-weeks old
243 C57BL/6 mice were obtained from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine).
244 Wild-type *C. rodentium* and its *nleH* mutant derivative were grown in LB broth
245 overnight at 37°C at 200 r.p.m. Mice were inoculated by oral gavage with 100 μ L
246 of these cultures. The inoculum was titrated by serial dilution and plating and was
247 calculated to be, approximately, 2.5×10^8 CFU per mouse for all groups. To
248 assay bacterial colonization, mice were sacrificed and the first 4 cm of the distal
249 colon starting from the anal verge was collected. Colonic tissue and faecal pellets
250 were homogenized using a Polytron tissue homogenizer and serially diluted
251 before being plated on MacConkey agar (Difco Laboratories) to determine the
252 total bacterial burden in the mouse at the time of sacrifice.

253 **CAT assay.** Determination of CAT activity and protein quantification to
254 calculate CAT specific activities were performed as previously described (42).

255 **Statistical analysis.** The one-way ANOVA test, using SPSS software
256 (SPSS), was used for statistical analysis.

257

258

RESULTS

259 **Identification of *nleH* in the genome of *C. rodentium*.** We previously
260 reported the identification, by proteomic analysis, of a new set of putative effector
261 proteins secreted by a *sepD* mutant strain of *C. rodentium* in a T3S-dependent
262 manner (15). Genome sequence analysis revealed that these proteins were not
263 encoded by genes within the LEE, but by genes scattered throughout the
264 genome that were located in cryptic prophages or putative pathogenicity islands,
265 thereby denominated non-LEE-encoded effectors (Nle) (15). Analysis of the
266 chromosomal location of *nle* genes in the partially sequenced *C. rodentium*
267 genome (<http://www.sanger.ac.uk>) showed that the genes coding for *nleF* and a
268 *nleG* homologue were located in a chromosomal locus inserted between the *yjjG*
269 and *prfC* genes, which are contiguous in the EHEC EDL933 and non-pathogenic
270 *E. coli* K-12 chromosome (Fig.1A). This locus spans 12.6 kb, and also contains
271 the gene coding for the T3SS-translocated effector EspJ found in a different
272 location in EHEC and EPEC (11). Besides the described effector genes, in this
273 locus we found an open reading frame of 293 codons immediately upstream of
274 *nleF*, whose product shares 15% identity with OspG, an effector of *Shigella*
275 *flexneri* (36) (Fig. 1B). Because of its location in the *C. rodentium* genome and

276 the fact that its predicted amino acid sequence shares identity with a type 3
277 secreted-effector in *S. flexneri*, we speculated that this gene codes for an effector
278 protein, herein named NleH. In addition, we had also found that an NleH
279 homologue present in the secreted proteins of EPEC Δ *sepD* interacts with CstT
280 (60).

281 NleH shares a high degree of identity (83%) with the predicted protein
282 products of two ORFs of unknown function found in the genome of EHEC EDL-
283 933, designated Z6021 and Z0989, herein called NleH1 and NleH2, respectively
284 (Fig. 1B). In the partially sequenced genome of EPEC strain E2348/69
285 (<http://www.sanger.ac.uk>), we also found two NleH homologues sharing around
286 83% of identity with *C. rodentium* NleH. The loci containing the EPEC and EHEC
287 *nleH* homologues do not share the chromosomal insertion site with *C. rodentium*
288 *nleH*. The *nleH1* gene in EHEC is part of a 58.6 kb chromosomal locus
289 containing prophage genes and the genes coding for NleA, NleF and a NleG-like
290 protein, which interrupt *yciD*, between *E. coli* backbone genes *yciE* and *ynfA*. In
291 EPEC, the 55.5 kb locus containing *nleH1* is inserted between *yciD* and *trpA*, and
292 also contains *nleA* and *nleF*, but not *nleG* (Fig. 1A). NleH2 genes in EPEC and
293 EHEC are also found in regions containing prophage structural genes. In both
294 cases the region containing *nleH2* is inserted between the *E. coli* K12 backbone
295 genes *ybhC* and *ybhB*, though the size of the locus in each case is different (Fig.
296 1A). In EPEC the *nleH2* locus spans 52.3 kb and in EHEC 38.1 kb. In EPEC, the
297 *nleH2* locus contains a *cif* homologue, while in EHEC the *nleH2* locus contains
298 homologues of three *nle* genes: *nleD*, *nleC* and *nleB2*. The gene organization of

299 the *nleH* locus in *C. rodentium* is similar to the *nleH1* locus of both EHEC and
300 EPEC; however, the predicted protein shares higher identity with NleH2,
301 including the lack of a 10 amino acid indel between residues 29 and 30 (Fig. 1B).

302
303 **NleH is a substrate of the LEE encoded T3SS.** To test if NleH is a
304 substrate of the T3SS in *C. rodentium*, plasmid pTnleH-HA expressing NleH-2HA
305 (Fig. 2A) was transformed into WT *C. rodentium* and its T3S deficient Δ *escN* and
306 effector hypersecreting Δ *sepD* derivatives. These strains were grown in DMEM at
307 37°C for 6 hours in the presence of 100 μ M IPTG to induce the expression of
308 NleH-2HA. The secreted proteins were recovered from culture supernatants by
309 TCA precipitation and subjected to western blot analysis using anti-HA antibodies
310 (Fig. 2B). NleH-2HA was expressed in all the strains tested, but only detected in
311 the culture supernatants of the WT and Δ *sepD* strains, as expected for a T3S
312 effector (Fig. 2B). Together, these results demonstrate that NleH is secreted
313 through the LEE-encoded T3SS in *C. rodentium*.

314 Although a signature secretion signal has not been described for T3S
315 effectors, it has been determined to reside within the first 10-20 N-terminal amino
316 acid residues (8, 58). To determine if the NleH secretion signal was located at
317 the N- or C-terminus, two NleH-2HA derivatives were generated by deleting
318 codons 2 to 19 and 134 to 293 obtaining plasmids pTnleH20-293-HA and
319 pTnleH1-133HA, respectively (Fig. 2A). The secretion of these NleH derivatives
320 was tested in *C. rodentium* where, as shown in Fig. 2C, the construct lacking the
321 first 19 amino acids was expressed, but not detected in culture supernatants. In

322 contrast, deletion of the C-terminus did not affect expression or secretion
323 indicating that, as for other T3S effectors, the signal required for NleH secretion
324 resides at the amino terminal domain.

325 To further support this observation, two CyaA reporter fusions were
326 constructed with the entire NleH amino acid sequence (pK3nleHcyaA) and with
327 only the first 19 amino terminal residues (pK3nleH1-19cyaA) (Fig. 2A). In
328 accordance with our previous results, the complete NleH-CyaA fusion was
329 secreted by WT *C. rodentium*, as it was detected by western blot with anti-CyaA
330 antibodies in the culture supernatant (Fig. 2D). The presence of two NleH-CyaA
331 processing products indicated that this construct was somehow unstable, but it
332 did not interfere with the secretion of the entire fusion. The CyaA fusion
333 containing NleH residues 2-19 was detected in the culture supernatants of the
334 WT and $\Delta sepD$ strains, but not in the supernatant of the $\Delta escN$ strain,
335 demonstrating that the first 19 residues of NleH are sufficient to confer type 3-
336 dependent secretion (Fig. 2D).

337
338 **NleH associates with host cell membranes upon translocation.** In
339 order to determine if NleH is also translocated into epithelial cells through the
340 LEE-encoded T3SS, we used EPEC E2348/69 and its $\Delta escN$ derivative
341 expressing the NleH-2HA and NleH-CyaA fusions depicted in Fig. 2A to infect
342 Caco-2 cells and perform fractionation assays. It has been shown that EPEC
343 adheres more efficiently to epithelial cells *in vitro*, thus providing a more sensitive
344 way to evaluate the T3SS-dependent translocation of effector proteins by A/E

345 pathogens into epithelial cells (11, 41, 64). Infected cells were subjected to
346 mechanical fractionation and the fractions obtained analyzed by western blot
347 using anti-HA and anti-CyaA antibodies (Fig. 3). These results showed that upon
348 translocation, full-length NleH-2HA and NleH-CyaA mainly associate with the
349 host membrane fraction and that this association requires a functional T3SS, as
350 NleH was not found in membrane fractions of cells infected with EPEC Δ escN
351 (Fig. 3). NleH₍₁₋₁₃₃₎-HA was also found to be translocated and associated with the
352 membrane fraction, indicating that the carboxyl terminus does not contain the
353 translocation or membrane association signal. In contrast, the NleH₍₁₋₁₉₎-CyaA
354 was not translocated, suggesting that even when sufficient for secretion, the first
355 19 amino acids are not enough for translocation. Collectively, these results
356 indicate that while secretion is achieved with only the first 19 amino acids, the
357 signals sustaining translocation and membrane association of NleH are located
358 within its first 133 amino acids.

359
360 **Regulation of NleH expression by LEE-encoded regulators.** Despite
361 the fact that the number of identified non-LEE-encoded effectors in A/E
362 pathogens has significantly grown in recent years, little is known about their
363 regulation. As NleH is secreted and translocated in a T3S-manner, we
364 investigated if its expression is co-regulated with the expression of LEE-encoded
365 genes. To monitor the expression of both the protein and of a reporter gene
366 under the control of the *nleH* regulatory region, we constructed an operon fusion
367 between the *nleH* regulatory and structural region double tagged with the HA

368 epitope and the chloramphenicol acetyl transferase (CAT) gene in plasmid
369 pKK232-8 generating plasmid pKKnleH-HA (Fig. 4A). To assess the role of LEE-
370 encoded regulators in NleH expression, we introduced pKKnleH-HA in *C.*
371 *rodentium* WT, Δler , $\Delta grlA$ and $\Delta grlR$ strains. Strains were grown in DMEM at
372 37°C without shaking under a 5% CO₂ atmosphere for 6 hours, which are
373 conditions known to induce LEE gene expression in *C. rodentium* (3, 15). Culture
374 samples were used to determine CAT activity and analyze NleH-2HA expression
375 and secretion by western blot. As shown in Fig. 4B, the CAT activity directed by
376 the fusion contained in pKKnleH-HA is not significantly reduced in the Δler and
377 $\Delta grlA$ strains with respect to the WT strain, suggesting that *nleH* transcription is
378 not part of the Ler-GrIA regulon. In contrast, NleH-HA was undetectable by
379 western blot in both whole cells and culture supernatants of the Δler and $\Delta grlA$
380 mutants (Fig. 4C). Although not statistically significant, the CAT activities directed
381 by the fusion contained in pKKnleH-HA showed opposite trends in the *grlA*
382 (reduced expression) and *grlR* (enhanced expression) mutants, suggesting that
383 GrIA and GrIR may modulate NleH expression positively and negatively,
384 respectively. This possibility is currently being investigated. As a control we
385 constructed a fusion similar to pKKnleH-HA for the LEE-encoded effector EspG,
386 which expression is regulated by Ler (45), generating pKKespG-HA (Fig. 4D). As
387 expected, CAT activity and EspG-2HA expression were markedly reduced in the
388 Δler and $\Delta grlA$ strains carrying pKKespG-HA (Fig. 4E and F).

389

390 **NleH is not stable in the absence of CesT or active secretion.** The
391 results described above suggested that NleH levels are regulated post-
392 transcriptionally, in a Ler- and GrlA-dependent manner, probably by controlling
393 the expression of LEE-encoded proteins important for NleH stability and
394 secretion. In accordance to this, we have recently reported that NleH is a binding
395 substrate of CesT and that in its absence NleH becomes unstable (59). CesT is
396 encoded by the *LEE5* operon, which expression is regulated by Ler (54). We
397 have also shown that CesT interacts with the T3SS membrane-associated
398 ATPase EscN (60), which is encoded by the Ler-dependent operon *LEE3* (5). To
399 further test this possibility, plasmids pKKnleH-HA and pKKespG-HA were
400 transformed into $\Delta cesT$, $\Delta escN$ and $\Delta sepD\Delta escN$ mutant strains, all deficient in
401 effector secretion (15, 60), as well as in $\Delta sepD$. As expected, NleH was not
402 secreted by or present in whole cells of the $\Delta cesT$ mutant, and the $\Delta escN$ mutant
403 showed a very similar phenotype, while the $\Delta sepD$ mutant showed higher levels
404 of secretion (Fig. 4C). Moreover, the higher levels of NleH observed in a $\Delta sepD$
405 mutant, both in the secreted fraction and whole cells, were drastically reduced in
406 a $\Delta sepD\Delta escN$ double mutant (Fig. 4C). In all cases reduced NleH levels were
407 not due to an effect on transcription (Fig. 4B). Taking together, these results
408 indicated that the absence of NleH in the *ler* and *grlA* regulatory mutants (Fig.
409 4C) is most likely due to the lack of expression of CesT, EscN and T3SS
410 components in general, and thus the lack of secretion, which seems to make
411 NleH accessible to degradation. To further confirm that NleH is not stable in the
412 Δler and $\Delta grlA$ regulatory mutants, these strains were transformed with pTnleH-

413 HA, which expresses NleH-2HA from an IPTG-inducible promoter (Table 1). In
414 contrast to the wt and $\Delta grlR$ strains, NleH-2HA was not seen in whole cells or
415 culture supernatans of Δler and $\Delta grlA$ (Fig. 5A). Together, these results indicated
416 that even when expressed from an inducible promoter, NleH stability was not
417 only dependent on the presence of its chaperone, but also on active secretion.
418 Interestingly, the EspG effector protein was not subjected to the same post-
419 translational control, as EspG-2HA could be detected in whole cells of all strains,
420 except for the Δler and $\Delta grlA$ strains, and as a secreted protein in the $\Delta cesT$
421 strain when expressed from its own promoter (Fig. 4F). When expressed from an
422 inducible promoter, EspG-2HA could be detected even in whole cells of the
423 regulatory mutants, but not, as expected, in their secreted proteins (Fig. 5B).

424
425 **Lon, but not ClpP, is involved in the degradation of NleH in the**
426 **absence of CesT.** Energy-dependent proteases such as Lon and ClpP have
427 been involved in the expression or stability of T3S effectors in different
428 pathogenic bacteria (reviewed in (6)). To explore if these proteases are
429 responsible of the rapid turnover of NleH observed in the absence of CesT,
430 NleH-2HA was expressed in wt EPEC and its $\Delta cesT$, $\Delta cesT\Delta lon$ and $\Delta cesT\Delta clpP$
431 derivatives. As shown in Fig. 6A, NleH-2HA was readily detected in whole cells of
432 the $\Delta cesT$ strain in the absence of the Lon protease, but was still degraded in the
433 absence of ClpP, suggesting that when NleH is not being recruited by CesT and
434 actively secreted, this effector protein is being specifically targeted for
435 degradation by Lon. Then we addressed if the *lon* mutation was able to restore

436 NleH stability in the Δler and $\Delta grlA$ backgrounds. Interestingly, NleH stability was
437 restored in $\Delta grlA\Delta lon$, but not in the $\Delta ler\Delta lon$ double mutant (Fig. 6A), revealing
438 that the post-translational regulation of NleH may involve two different pathways
439 and that more than one Ler-regulated component, in addition to CesT, may be
440 involved in NleH protein stability. This result prompted an additional experiment
441 in which the role in protein instability of the N- and C-terminal domains of NleH
442 was tested by expressing the N-terminal (NleH₍₂₀₋₂₉₃₎-HA) and C-terminal (NleH₍₁₋₁₃₃₎-HA)
443 deletions in Δler and $\Delta grlA$ mutants. Consistent with the notion that two
444 different pathways are involved in NleH degradation, only the N-terminal deletion
445 was stable in the $\Delta grlA$ mutant, while none of the NleH deletion derivatives was
446 stable in the Δler mutant (Fig. 6B). These observations are in line with our recent
447 observation that the CesT-binding domain of NleH is contained within the first 40
448 amino acids (59).

450 **Lack of NleH delays colonization of C57BL/6 mice by *C. rodentium*.**

451 Considering that NleH displays different features of a T3S effector, its role as a
452 virulence factor for *C. rodentium* was assessed by infecting C57BL/6 mice with
453 *C. rodentium* DBS100 and its *nleH* null mutant. Infected animals were sacrificed
454 at day 6 and 10 post-infection (PI), and total bacterial burden in the mouse colon
455 was calculated. The *nleH* mutant showed a moderate, statistically significant
456 ($P=0.01$) reduction in its capacity to colonize the mouse colon at day 6 PI (Fig.
457 7A). However, no difference in colonization between WT and $\Delta nleH$ strains was
458 observed at day 10 PI (Fig. 7B). In contrast, a strong attenuation was observed

459 for the *nleB* and *escN* mutants (data not shown), as previously reported (15, 35,
460 65). Overall, these results indicate that NleH has a role in promoting efficient
461 colonization of the mouse colon by *C. rodentium* during early stages of infection.

462

463

DISCUSSION

464 In recent years, the development of effector hyper secretion mutants
465 combined with the use of proteomics and bioinformatics has allowed the
466 identification of a significant number of new T3S effector proteins in A/E
467 pathogens, which are encoded outside the LEE pathogenicity island (15, 61). In
468 this work, we describe different features of NleH, a non-LEE-encoded effector
469 that we originally identified in *C. rodentium* based on its homology to *S. flexneri*
470 OspG and its genetic linkage to other previously characterized T3S effectors
471 (Fig. 1A) (15), as well as in EPEC as a CesT binding substrate (60).

472 In *C. rodentium*, *nleH* is located in a 12.6 kb locus inserted between the
473 *yjjG* and *prfC* genes that has no apparent structural phage genes. In EPEC
474 E2348/69 and EHEC EDL933 there are two loci encoding *nleH* homologues
475 (*nleH1* and *nleH2*), but their site of insertion is different with respect to *C.*
476 *rodentium* (Fig. 1A). The fact that both *nleH* copies in EHEC and EPEC are
477 prophage-encoded (61) is not unexpected given the importance that phage has
478 acquired as virulence gene dissemination vectors, in particular T3S effectors (19,
479 61). Furthermore, in EPEC serogroups O86a, O127 and O142, isolated from
480 patients with acute diarrhea, it has recently been reported that the locus
481 encoding *nleH2* is an inducible lambdoid prophage that also encodes the

482 cytolethal-distending toxin (Cdt-I) (2), an observation that highlights the potential
483 mobility of these putative virulence factors. Differences in the genomic context of
484 the *nleH* homologues, as for other T3SS-effectors, support the notion that the
485 acquisition of effector genes by A/E pathogens has been the result of multiple
486 and independent horizontal transfer events.

487 Using NleH-2HA and NleH-CyaA tagged proteins we show that the first 19
488 N-terminus amino acid residues of *C. rodentium* NleH are essential and sufficient
489 for its secretion through the LEE-encoded T3SS, but not for its translocation into
490 epithelial cells. In contrast, it has been reported that the first 20 amino acids are
491 sufficient to mediate both secretion and translocation of other A/E effectors such
492 as Tir, EspF, Map, Cif and NleA/EspI (8). However, our results are consistent
493 with the notion that the secretion signal resides within the first 15-20 amino acids
494 of effector proteins of different T3SSs, while translocation signals are located
495 further down the N-terminus domain (25). In fact, the modular organization of N-
496 termini consisting of separated secretion and translocation domains has been
497 reported for other effectors, such as *Yersinia* YopE and YopH (57). Secretion and
498 translocation of NleH homologues in EPEC and EHEC have also been recently
499 reported (59, 61). In addition, we show that upon translocation NleH associates
500 with the membrane fraction, likely corresponding to the cytoplasmic membrane
501 instead of organelle's membranes, considering that upon translocation EPEC
502 NleH localizes underneath adherent bacteria, as we have recently reported (59).

503 Another distinctive feature of all LEE-encoded effectors, as well as of
504 T3SS components, is that their expression is coordinated at the transcriptional

505 level by Ler (45). As non-LEE encoded effectors are secreted by the LEE-
506 encoded T3SS, it has been tempting to speculate that their expression is co-
507 regulated with the LEE. In this regard, it has been recently reported that *nleA*,
508 *nleB*, *nleD* and *nleE* are transcribed in EHEC under secretion permissive
509 conditions and that the expression of *nleA::gfp*, *nleA::bla* and *nleD::bla*
510 translational reporter fusions showed a reduction in the absence of Ler (53). This
511 result, however, did not distinguish whether Ler-mediated regulation occurs at
512 the transcriptional or post-translational level. Interestingly, we found here that
513 even when Ler and GrlA don't seem to play a significant role in *nleH*
514 transcription, the Ler-mediated regulation of LEE expression influences post-
515 translationally the expression of NleH, as even when expressed from an
516 inducible promoter NleH levels in the cell were drastically reduced in the absence
517 of these regulatory proteins. In addition, NleH protein levels were greatly
518 diminished in the absence of CesT, as well as in secretion deficient strains such
519 as the *escN* mutant, although no significant effects were seen for *nleH*
520 transcription in these strains.

521 We have recently shown that CesT is a multi-effector chaperone that
522 recruits different LEE- and non-LEE-encoded effectors for their efficient T3S (59,
523 60). These observations led to us to speculate that when NleH is not actively
524 engaged for secretion, its protein levels may be controlled by the competing
525 action of proteases to prevent its potentially toxic accumulation within the cell.
526 One would expect that it would be more energetically favorable to regulate the
527 expression of these non-LEE-encoded effector proteins at the transcriptional

528 level, through the same mechanisms that regulate the expression of LEE genes.
529 However, we still have to determine when and under which conditions NleH is
530 expressed, as we can't rule out the possibility that the spatio-temporal expression
531 of NleH differs from that of LEE-encoded genes. This would imply that its Ler-
532 independent transcriptional regulation is required to ensure its expression at a
533 different stage of the infection or at a different niche, once the T3SS components
534 are all in place. Thus, if T3S does not occur, NleH expression would be post-
535 transcriptionally regulated, either by controlling mRNA stability, translation or
536 protein stability. The first two options don't seem to be the case, as no polar
537 effect is seen in the expression of the *cat* reporter gene when in operon with
538 *nleH*.

539 Regarding protein stability, recent reports have established that energy-
540 dependent proteases, such as Lon and ClpP, control the intracellular
541 concentration of effector proteins in different bacterial pathogens expressing
542 T3SS effectors (reviewed in (6)). Here, we show that NleH is fully stable in the
543 absence of CesT when Lon, but not ClpP, is inactive, suggesting that when NleH
544 is not bound by CesT and/or engaged for secretion, Lon specific proteolysis
545 degrades the accumulated protein to prevent undesired effects. Interestingly, the
546 mutation of *lon* restored NleH levels in the $\Delta grlA$ mutant, but not in the Δler
547 mutant, suggesting that NleH stability may rely on, in addition to CesT, another
548 NleH-stabilizing factor regulated by Ler that prevents NleH degradation by a Lon-
549 independent pathway. Consistently, we also observed differential stability
550 between the N-terminus and C-terminus deletion derivatives of NleH in the Δler

551 and $\Delta grlA$ mutants. In line with these observations, even in the presence of
552 CesT, lack of secretion of NleH in the $\Delta escN$ mutant also prompts its degradation
553 while higher levels of NleH are secreted when actively engaged in secretion in
554 the $\Delta sepD$ hypersecretion mutant. Thus, in the absence of GrIA, although the
555 expression of Ler is not completely abolished, it is nevertheless highly reduced
556 (3, 15). This low level of Ler expression may not support the expression of CesT
557 to sustain NleH stability, but may be enough to activate the expression of an
558 additional NleH-stabilizing factor that is needed to prevent NleH degradation from
559 the C-terminus. This model may explain why the stability of NleH and its
560 derivatives was not restored in the $\Delta ler\Delta lon$ mutant, where the lack of Ler has a
561 profound effect on the expression of the Ler regulon (reviewed in (45)). In this
562 way, under environmental conditions that are not permissive for Ler-dependent
563 expression of LEE genes, the lack of CesT, as well as of T3SS and other Ler-
564 regulated elements, will prompt the degradation of NleH by endogenous
565 proteases, and probably the degradation of other non-LEE-encoded effectors,
566 which expression is not directly controlled by Ler. Of note, ClpP has instead been
567 shown to play a positive role in controlling the expression of LEE genes by
568 regulating RpoS and GrIR levels in EHEC (31). However, the slight increase of
569 *nleH* transcription seen in the $\Delta grlR$ strain does not seem to account for the
570 higher levels of accumulated and secreted NleH seen in the *C. rodentium* *grlR*
571 mutant. This suggests that GrIR could also be linked to the post-translational
572 control of NleH expression, since when expressed under the control of an
573 inducible promoter, higher levels of NleH are still observed in $\Delta grlR$ with respect

574 to WT. It is interesting to note that this putative post-translational control does not
575 apply for the Ler-regulated LEE-encoded effector EspG, which protein levels are
576 not reduced in regulatory mutants when expressed from an inducible promoter.

577 Overall, these observations confirmed that NleH behaves as a T3S
578 effector and prompted the experiments to address its potential role during
579 infection. Initial experiments to look at pedestal formation and actin accumulation
580 underneath adherent bacteria on epithelial cells revealed that A/E lesion
581 formation was not affected in the absence of NleH (data not shown). This was
582 not completely unexpected, as in addition to Tir only one effector encoded
583 outside the LEE, EspFu/TccP, has been shown to be required for pedestal
584 formation (7, 22). Then we tested the ability of the *C. rodentium nleH* mutant to
585 colonize C57BL/6 mice, which has become an accepted model for the study of
586 the disease caused by A/E pathogens (48). In this assay, the *nleH* mutant
587 showed a moderate, but statistically significant, reduction of about one log in its
588 ability to colonize the mouse colon at day 6 PI; however, this defect is overcome
589 at day 10 PI. This result suggests that NleH may play a role at early stages of
590 infection by *C. rodentium*, as has been suggested for the LEE-encoded effector
591 EspG (29). It is worth noticing that among all the effectors described to date, only
592 Tir, EspZ/SepZ, NleA/Espl and NleB have been shown to play a critical role in
593 the colonization of the mouse colon by *C. rodentium* (15, 16, 27, 35, 49, 65). The
594 other tested effector proteins have been shown to have only moderate effects on
595 colonization or on the outcome of the disease (see introduction). Considering the
596 diverse distribution of genetic variability that is being observed between different

597 human and animal isolates of EHEC O157:H7, non-O157 STEC, EPEC and
598 atypical EPEC strains, it is tempting to speculate that the potential redundancy
599 between different effector proteins, either due to the existence of genes encoding
600 highly similar proteins, as in the case of NleH in EPEC and EHEC, or to
601 functional mimicry despite not sharing sequence similarity, may obscure the role
602 of some of them during infection.

603 Functional redundancy has been reported for EspG and EspG2, two
604 effector proteins that share 43.5% identity in EPEC. Both EspG and EspG2 can
605 independently activate RhoA in the host cell, and increase paracellular
606 permeability (43), beside of being able to induce microtubule elimination (56).
607 Map and EspF, two effector proteins not related at the sequence level, participate
608 in EPEC-mediated disruption of epithelial barrier function, which can occur in the
609 absence of Map or EspF, but completely disappears in a *map/espF* double
610 mutant (13). Furthermore, the results obtained during the *in vivo* evaluation of
611 mutants in effector genes may vary depending on the animal model employed.
612 For example, a *C. rodentium espH* mutant colonizes and causes hyperplasia as
613 well as the wild type strain in mice (49); however, the inactivation of *espH* in
614 EHEC affects its capacity to colonize the intestinal tract of baby rabbits and
615 reduces the severity of diarrhea caused in this model (52). Due to differences
616 among A/E pathogens and specificity for their hosts, the analysis of different
617 models may be necessary to identify the function of a particular effector protein.
618 Moreover, some effectors have been more frequently associated with A/E strains
619 derived from severe cases of the disease. For example, NleE, which plays a

620 moderate role in colonization and hyperplasia in the mouse model of infection
621 (35, 66), has been linked to diarrhea production by atypical EPEC strains (1), and
622 to HUS development and outbreaks by non-O157 EHEC strains (65). In a recent
623 work, a microarray-based comparative genomic hybridization technique was
624 used to detect differences in the genomic content of 31 O157:H7 EHEC strains.
625 Interestingly, the presence of *nleH1*, *nleH2* and *nleF* was found to be associated
626 with lineage I strains, which are more frequently linked to human disease (67).

627 The role in disease, both individually or in concert, of the ample collection
628 of Nle proteins in A/E pathogens, may depend on several, but at least two,
629 different aspects, the genetic repertoire of each strain and the host's
630 characteristics. These elements may influence the pathogenic potential of the
631 strains, including their ability to colonize different hosts. In addition, A/E
632 pathogens may have implemented different mechanisms to coordinate and
633 control the expression of these effector proteins. The tremendous challenge we
634 face in future studies is to elucidate the molecular mechanisms underlying the
635 coordinated expression and function in pathogenesis and disease of such an
636 extended repertoire of effector proteins.

637

638

ACKNOWLEDGEMENTS

639 We thank F.J. Santana, A. Huerta-Saquero and R. Baños-Lara for technical
640 assistance and V.H. Bustamante for helpful discussions and critical reading of
641 the manuscript. VAGA was supported by a Ph.D. fellowship from CONACyT
642 (157392) and a Hugo Aréchiga Urtuzuástegui fellowship from the Colegio de
643 Sinaloa. This research was supported by grants from the Canadian Institutes of
644 Health Research (CIHR) and the Howard Hughes Medical Institute (HHMI) to

645 BBF and from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico
646 (DGAPA-PAPIIT IN224107 and IN201703-3), Consejo Nacional de Ciencia y
647 Tecnología (CONACyT 42918Q) and HHMI to JLP.

ACCEPTED

References

648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693

1. **Afset, J. E., G. Bruant, R. Brousseau, J. Harel, E. Anderssen, L. Bevanger, and K. Bergh.** 2006. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. *J. Clin. Microbiol.* **44**:3703-3711.
2. **Asakura, M., A. Hinenoya, M. S. Alam, K. Shima, S. H. Zahid, L. Shi, N. Sugimoto, A. N. Ghosh, T. Ramamurthy, S. M. Faruque, G. B. Nair, and S. Yamasaki.** 2007. An inducible lambdoid prophage encoding cytolethal distending toxin (Cdt-I) and a type III effector protein in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**:14483-14488.
3. **Barba, J., V. H. Bustamante, M. A. Flores-Valdez, W. Deng, B. B. Finlay, and J. L. Puente.** 2005. A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *J. Bacteriol.* **187**:7918-7930.
4. **Bielaszewska, M., A. K. Sonntag, M. A. Schmidt, and H. Karch.** 2007. Presence of virulence and fitness gene modules of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O26. *Microbes Infect.* **9**:891-897.
5. **Bustamante, V. H., F. J. Santana, E. Calva, and J. L. Puente.** 2001. Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol. Microbiol.* **39**:664-678.
6. **Butler, S. M., R. A. Festa, M. J. Pearce, and K. H. Darwin.** 2006. Self-compartmentalized bacterial proteases and pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **60**:553-562.
7. **Campellone, K. G., D. Robbins, and J. M. Leong.** 2004. EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. *Dev. Cell.* **7**:217-228.
8. **Charpentier, X., and E. Oswald.** 2004. Identification of the secretion and translocation domain of the enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector Cif, using TEM-1 beta-lactamase as a new fluorescence-based reporter. *J. Bacteriol.* **186**:5486-5495.
9. **Creuzburg, K., J. Recktenwald, V. Kuhle, S. Herold, M. Hensel, and H. Schmidt.** 2005. The Shiga toxin 1-converting bacteriophage BP-4795 encodes an NleA-like type III effector protein. *J. Bacteriol.* **187**:8494-8498.
10. **Creuzburg, K., and H. Schmidt.** 2007. Molecular Characterization and Distribution of Genes Encoding Members of the Type III Effector NleA Family among Pathogenic *Escherichia coli* Strains. *J. Clin. Microbiol.* **45**:2498-2507.
11. **Dahan, S., S. Wiles, R. M. La Ragione, A. Best, M. J. Woodward, M. P. Stevens, R. K. Shaw, Y. Chong, S. Knutton, A. Phillips, and G. Frankel.** 2005. EspJ is a prophage-carried type III effector protein of attaching and effacing pathogens that modulates infection dynamics. *Infect. Immun.* **73**:679-686.
12. **Datsenko, K. A., and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**:6640-6645.

- 694 13. **Dean, P., and B. Kenny.** 2004. Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic
695 *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and a bacterial surface
696 protein. *Mol. Microbiol.* **54**:665-675.
- 697 14. **Deng, W., Y. Li, P. R. Hardwidge, E. A. Frey, R. A. Pfuetzner, S. Lee, S.**
698 **Gruenheid, N. C. Strynacka, J. L. Puente, and B. B. Finlay.** 2005. Regulation
699 of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and
700 effacing bacterial pathogens. *Infect. Immun.* **73**:2135-2146.
- 701 15. **Deng, W., J. L. Puente, S. Gruenheid, Y. Li, B. A. Vallance, A. Vazquez, J.**
702 **Barba, J. A. Ibarra, P. O'Donnell, P. Metalnikov, K. Ashman, S. Lee, D.**
703 **Goode, T. Pawson, and B. B. Finlay.** 2004. Dissecting virulence: systematic and
704 functional analyses of a pathogenicity island. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
705 **101**:3597-3602.
- 706 16. **Deng, W., B. A. Vallance, Y. Li, J. L. Puente, and B. B. Finlay.** 2003.
707 *Citrobacter rodentium* translocated intimin receptor (Tir) is an essential virulence
708 factor needed for actin condensation, intestinal colonization and colonic
709 hyperplasia in mice. *Mol. Microbiol.* **48**:95-115.
- 710 17. **Dziva, F., P. M. van Diemen, M. P. Stevens, A. J. Smith, and T. S. Wallis.**
711 2004. Identification of *Escherichia coli* O157 : H7 genes influencing colonization
712 of the bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis.
713 *Microbiology* **150**:3631-3645.
- 714 18. **Edwards, R. A., L. H. Keller, and D. M. Schifferli.** 1998. Improved allelic
715 exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression. *Gene*
716 **207**:149-57.
- 717 19. **Ehrbar, K., and W. D. Hardt.** 2005. Bacteriophage-encoded type III effectors in
718 *Salmonella enterica* subspecies 1 serovar Typhimurium. *Infect. Genet. Evol.* **5**:1-
719 9.
- 720 20. **Elliott, S. J., V. Sperandio, J. A. Giron, S. Shin, J. L. Mellies, L. Wainwright,**
721 **S. W. Hutcheson, T. K. McDaniel, and J. B. Kaper.** 2000. The locus of
722 enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE-
723 and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and
724 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **68**:6115-6126.
- 725 21. **Garmendia, J., G. Frankel, and V. F. Crepin.** 2005. Enteropathogenic and
726 enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation,
727 translocation. *Infect. Immun.* **73**:2573-2585.
- 728 22. **Garmendia, J., A. D. Phillips, M. F. Carlier, Y. Chong, S. Schuller, O.**
729 **Marches, S. Dahan, E. Oswald, R. K. Shaw, S. Knutton, and G. Frankel.**
730 2004. TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector
731 protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cell. Microbiol.* **6**:1167-1183.
- 732 23. **Gauthier, A., M. de Grado, and B. B. Finlay.** 2000. Mechanical fractionation
733 reveals structural requirements for enteropathogenic *Escherichia coli* Tir insertion
734 into host membranes. *Infect. Immun.* **68**:4344-4348.
- 735 24. **Gauthier, A., J. L. Puente, and B. B. Finlay.** 2003. Secretin of the
736 enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system requires components
737 of the type III apparatus for assembly and localization. *Infect. Immun.* **71**:3310-
738 3319.

- 739 25. **Ghosh, P.** 2004. Process of protein transport by the type III secretion system.
740 Microbiol. Mol. Biol. Rev. **68**:771-795.
- 741 26. **Gomez-Duarte, O. G., and J. B. Kaper.** 1995. A plasmid-encoded regulatory
742 region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia*
743 *coli*. Infect. Immun. **63**:1767-1776.
- 744 27. **Gruenheid, S., I. Sekirov, N. A. Thomas, W. Deng, P. O'Donnell, D. Goode,**
745 **Y. Li, E. A. Frey, N. F. Brown, P. Metalnikov, T. Pawson, K. Ashman, and B.**
746 **B. Finlay.** 2004. Identification and characterization of NleA, a non-LEE-encoded
747 type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*
748 O157:H7. Mol. Microbiol. **51**:1233-1249.
- 749 28. **Haack, K. R., C. L. Robinson, K. J. Miller, J. W. Fowlkes, and J. L. Mellies.**
750 2003. Interaction of Ler at the *LEE5* (*tir*) operon of enteropathogenic *Escherichia*
751 *coli*. Infect. Immun. **71**:384-392.
- 752 29. **Hardwidge, P. R., W. Deng, B. A. Vallance, I. Rodriguez-Escudero, V. J. Cid,**
753 **M. Molina, and B. B. Finlay.** 2005. Modulation of host cytoskeleton function by
754 the enteropathogenic *Escherichia coli* and *Citrobacter rodentium* effector protein
755 EspG. Infect. Immun. **73**:2586-2594.
- 756 30. **Hayward, R. D., J. M. Leong, V. Koronakis, and K. G. Campellone.** 2006.
757 Exploiting pathogenic *Escherichia coli* to model transmembrane receptor
758 signalling. Nat. Rev. Microbiol. **4**:358-370.
- 759 31. **Iyoda, S., and H. Watanabe.** 2005. ClpXP protease controls expression of the
760 type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrIR levels in
761 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **187**:4086-4094.
- 762 32. **Iyoda, S., and H. Watanabe.** 2004. Positive effects of multiple *pch* genes on
763 expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of
764 enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 to HEp-2 cells. Microbiology
765 **150**:2357-2571.
- 766 33. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia*
767 *coli*. Nat. Rev. Microbiol. **2**:123-140.
- 768 34. **Karmali, M. A., M. Mascarenhas, S. Shen, K. Ziebell, S. Johnson, R. Reid-**
769 **Smith, J. Isaac-Renton, C. Clark, K. Rahn, and J. B. Kaper.** 2003.
770 Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with
771 verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to
772 epidemic and/or serious disease. J. Clin. Microbiol. **41**:4930-4940.
- 773 35. **Kelly, M., E. Hart, R. Mundy, O. Marches, S. Wiles, L. Badea, S. Luck, M.**
774 **Tauschek, G. Frankel, R. M. Robins-Browne, and E. L. Hartland.** 2006.
775 Essential role of the type III secretion system effector NleB in colonization of
776 mice by *Citrobacter rodentium*. Infect. Immun. **74**:2328-2337.
- 777 36. **Kim, D. W., G. Lenzen, A. L. Page, P. Legrain, P. J. Sansonetti, and C.**
778 **Parsot.** 2005. The *Shigella flexneri* effector OspG interferes with innate immune
779 responses by targeting ubiquitin-conjugating enzymes. Proc. Natl. Acad. Sci.
780 USA **102**:14046-14051.
- 781 37. **Kujat Choy, S. L., E. C. Boyle, O. Gal-Mor, D. L. Goode, Y. Valdez, B. A.**
782 **Vallance, and B. B. Finlay.** 2004. SseK1 and SseK2 are novel translocated
783 proteins of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*. Infect. Immun. **72**:5115-
784 5125.

- 785 38. **Levine, M. M., E. J. Bergquist, D. R. Nalin, D. H. Waterman, R. B. Hornick,**
786 **C. R. Young, and S. Sotman.** 1978. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea
787 but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive.
788 *Lancet* **1**:1119-1122.
- 789 39. **Li, M., I. Rosenshine, H. B. Yu, C. Nadler, E. Mills, C. L. Hew, and K. Y.**
790 **Leung.** 2006. Identification and characterization of NleI, a new non-LEE-encoded
791 effector of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Microbes. Infect.* **8**:2890-
792 2898.
- 793 40. **Lio, J. C., and W. J. Syu.** 2004. Identification of a negative regulator for the
794 pathogenicity island of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biomed.*
795 *Sci.* **11**:855-863.
- 796 41. **Marches, O., S. Wiles, F. Dziva, R. M. La Ragione, S. Schuller, A. Best, A. D.**
797 **Phillips, E. L. Hartland, M. J. Woodward, M. P. Stevens, and G. Frankel.**
798 2005. Characterization of two non-locus of enterocyte effacement-encoded type
799 III-translocated effectors, NleC and NleD, in attaching and effacing pathogens.
800 *Infect. Immun.* **73**:8411-8417.
- 801 42. **Martínez-Laguna, Y., E. Calva, and J. L. Puente.** 1999. Autoactivation and
802 environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the
803 transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol.*
804 *Microbiol.* **33**:153-166.
- 805 43. **Matsuzawa, T., A. Kuwae, and A. Abe.** 2005. Enteropathogenic *Escherichia*
806 *coli* type III effectors EspG and EspG2 alter epithelial paracellular permeability.
807 *Infect. Immun.* **73**:6283-6289.
- 808 44. **Mayer, M. P.** 1995. A new set of useful cloning and expression vectors derived
809 from pBlueScript. *Gene* **163**:41-46.
- 810 45. **Mellies, J. L., A. M. Barron, and A. M. Carmona.** 2007. Enteropathogenic and
811 Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Virulence Gene Regulation. *Infect. Immun.*
812 **75**:4199-4210.
- 813 46. **Mellies, J. L., S. J. Elliott, V. Sperandio, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper.**
814 1999. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli* : identification of a
815 regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte
816 effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol. Microbiol.* **33**:296-306.
- 817 47. **Mellies, J. L., K. R. Haack, and D. C. Galligan.** 2007. SOS regulation of the
818 type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*
819 **189**:2863-2872.
- 820 48. **Mundy, R., T. T. MacDonald, G. Dougan, G. Frankel, and S. Wiles.** 2005.
821 *Citrobacter rodentium* of mice and man. *Cell. Microbiol.* **7**:1697-1706.
- 822 49. **Mundy, R., L. Petrovska, K. Smollett, N. Simpson, R. K. Wilson, J. Yu, X.**
823 **Tu, I. Rosenshine, S. Clare, G. Dougan, and G. Frankel.** 2004. Identification
824 of a novel *Citrobacter rodentium* type III secreted protein, EspI, and roles of this
825 and other secreted proteins in infection. *Infect. Immun.* **72**:2288-2302.
- 826 50. **Porter, M. E., P. Mitchell, A. J. Roe, A. Free, D. G. Smith, and D. L. Gally.**
827 2004. Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-
828 like protein, PerA from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*
829 **54**:1117-1133.

- 830 51. **Reading, N. C., A. G. Torres, M. M. Kendall, D. T. Hughes, K. Yamamoto,**
831 **and V. Sperandio.** 2007. A novel two-component signaling system that activates
832 transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in
833 remodeling of host actin. *J. Bacteriol.* **189**:2468-2476.
- 834 52. **Ritchie, J. M., and M. K. Waldor.** 2005. The locus of enterocyte effacement-
835 encoded effector proteins all promote enterohemorrhagic *Escherichia coli*
836 pathogenicity in infant rabbits. *Infect. Immun.* **73**:1466-1474.
- 837 53. **Roe, A. J., L. Tysall, T. Dransfield, D. Wang, D. Fraser-Pitt, A. Mahajan, C.**
838 **Constandinou, N. Inglis, A. Downing, R. Talbot, D. G. Smith, and D. L.**
839 **Gally.** 2007. Analysis of the expression, regulation and export of NleA-E in
840 *Escherichia coli* O157 : H7. *Microbiology* **153**:1350-1360.
- 841 54. **Sanchez-SanMartin, C., V. H. Bustamante, E. Calva, and J. L. Puente.** 2001.
842 Transcriptional regulation of the *orf19* gene and the *tir-cesT-eae* operon of
843 enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:2823-33.
- 844 55. **Schauer, D. B., and S. Falkow.** 1993. Attaching and effacing locus of a
845 *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia.
846 *Infect. Immun.* **61**:2486-2492.
- 847 56. **Shaw, R. K., K. Smollett, J. Cleary, J. Garmendia, A. Straatman-Iwanowska,**
848 **G. Frankel, and S. Knutton.** 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli* type III
849 effectors EspG and EspG2 disrupt the microtubule network of intestinal epithelial
850 cells. *Infect. Immun.* **73**:4385-4390.
- 851 57. **Sory, M. P., A. Boland, I. Lambermont, and G. R. Cornelis.** 1995.
852 Identification of the YopE and YopH domains required for secretion and
853 internalization into the cytosol of macrophages, using the *cyaA* gene fusion
854 approach. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**:11998-12002.
- 855 58. **Tampakaki, A. P., V. E. Fadouloglou, A. D. Gazi, N. J. Panopoulos, and M.**
856 **Kokkinidis.** 2004. Conserved features of type III secretion. *Cell. Microbiol.*
857 **6**:805-816.
- 858 59. **Thomas, N. A., W. Deng, N. T. Baker, J. L. Puente, and B. B. Finlay.** 2007.
859 Hierarchical delivery of an essential host colonization factor in enteropathogenic
860 *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **282**:29634-29645.
- 861 60. **Thomas, N. A., W. Deng, J. L. Puente, E. A. Frey, C. K. Yip, N. C.**
862 **Strynadka, and B. B. Finlay.** 2005. CesT is a multi-effector chaperone and
863 recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and
864 non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.*
865 **57**:1762-1779.
- 866 61. **Tobe, T., S. A. Beatson, H. Taniguchi, H. Abe, C. M. Bailey, A. Fivian, R.**
867 **Younis, S. Matthews, O. Marches, G. Frankel, T. Hayashi, and M. J. Pallen.**
868 2006. An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli*
869 O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc. Natl. Acad.*
870 *Sci. U. S. A.* **103**:14941-14946.
- 871 62. **Torres, A. G., L. Milflores-Flores, J. G. Garcia-Gallegos, S. D. Patel, A. Best,**
872 **R. M. La Ragione, Y. Martinez-Laguna, and M. J. Woodward.** 2007.
873 Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae
874 (LPF) of *Escherichia coli* O157:H7. *Int. J. Med. Microbiol.* **297**:177-185.

- 875 63. **Umanski, T., I. Rosenshine, and D. Friedberg.** 2002. Thermoregulated
876 expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology*
877 **148**:2735-2744.
- 878 64. **Vlisidou, I., O. Marches, F. Dziva, R. Mundy, G. Frankel, and M. P. Stevens.**
879 2006. Identification and characterization of EspK, a type III secreted effector
880 protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol. Lett.*
881 **263**:32-40.
- 882 65. **Wickham, M. E., C. Lupp, M. Mascarenhas, A. Vazquez, B. K. Coombes, N.**
883 **F. Brown, B. A. Coburn, W. Deng, J. L. Puente, M. A. Karmali, and B. B.**
884 **Finlay.** 2006. Bacterial genetic determinants of non-O157 STEC outbreaks and
885 hemolytic-uremic syndrome after infection. *J. Infect. Dis.* **194**:819-827.
- 886 66. **Wickham, M. E., C. Lupp, A. Vazquez, M. Mascarenhas, B. Coburn, B. K.**
887 **Coombes, M. A. Karmali, J. L. Puente, W. Deng, and B. B. Finlay.** 2007.
888 *Citrobacter rodentium* virulence in mice associates with bacterial load and the
889 type III effector NleE. *Microbes Infect.* **9**:400-407.
- 890 67. **Zhang, Y., C. Laing, M. Steele, K. Ziebell, R. Johnson, A. K. Benson, E.**
891 **Taboada, and V. P. Gannon.** 2007. Genome evolution in major *Escherichia coli*
892 O157:H7 lineages. *BMC Genomics* **8**:121-136.
- 893 68. **Zhu, C., S. Feng, T. E. Thate, J. B. Kaper, and E. C. Boedeker.** 2006. Towards
894 a vaccine for attaching/effacing *Escherichia coli*: a LEE encoded regulator (*ler*)
895 mutant of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* is attenuated, immunogenic,
896 and protects rabbits from lethal challenge with the wild-type virulent strain.
897 *Vaccine* **24**:3845-3855.
898
899

FIGURE LEGENDS

900

901

902 **Figure 1. NleH is conserved in A/E pathogens.** (A) Schematic representation
903 of the loci containing *nleH* in *C. rodentium* DBS100, and the two homologues of
904 *nleH* in EPEC E2348/69 and EHEC EDL933. NleH1 and NleH2 correspond to
905 Z6021 and Z0989 in the EHEC EDL933 genome sequence, to ECs1814 and
906 ECs0848 in the EHEC Sakai genome sequence and to NleH1-2 and NleH1-1
907 according to a recently suggested nomenclature (64), respectively. Flanking
908 genes correspond to those conserved in *E. coli* K12 and are being considered
909 the boundaries of the insertion sites of this putative horizontally acquired set of
910 genes. (B) Multiplealignment of NleH homologues from *C. rodentium*, EPEC
911 E2348/69, EHEC EDL933 and OspG from *Shigella flexneri* M90T. Sequences of
912 *C. rodentium* and EPEC E2348/69 were obtained from the sequencing genome
913 project at the Sanger Institute (www.sanger.ac.uk). Conserved amino acid
914 residues involved in NF- κ B signaling as described for OspG (36) are indicated by
915 arrowheads.

916

917 **Figure 2. NleH is secreted through the LEE-encoded T3SS.** Schematic
918 representation of the NleH-2HA and NleH-CyaA reporter fusions, and deletion
919 derivatives used in this study (A). Western blot assay of total and secreted
920 proteins of *C. rodentium* WT, T3SS-deficient Δ *escN*, and effector hyper-secretion
921 Δ *sepD* strains expressing NleH-HA from pTnleH-HA. Samples were separated by
922 SDS-PAGE and probed with anti-HA antibodies. Blots were also probed with

923 anti-DnaK antibodies as a loading control and to monitor bacterial lysis in the
924 secreted protein fractions (B). The first 19 amino acid residues of NleH are
925 sufficient to mediate T3S. Bacterial pellets and secreted proteins of *C. rodentium*
926 WT harboring plasmids pTnleH-HA, pTnleH Δ 2-19HA and pTnleH Δ 134-293HA
927 were analyzed by western blot with anti-HA and anti-DnaK antibodies (C).
928 Plasmids expressing NleH-CyaA (pK3nleHcyaA) and NleH₍₁₋₁₉₎-CyaA were
929 transformed into *C. rodentium* WT, Δ escN and Δ sepD strains. Samples were
930 collected from DMEM cultures. Whole cell extracts and secreted proteins were
931 separated by SDS-PAGE and analyzed by western blot using anti-CyaA and anti-
932 DnaK antibodies.

933

934 **Figure 3. NleH translocation into Caco-2 cells.** Caco-2 cells were infected with
935 WT and Δ escN EPEC E2348/69 strains harboring plasmids expressing the NleH
936 fusions described in Fig. 2A. Upon IPTG induction cells were subjected to
937 fractionation by mechanical lysis as described in *Materials and Methods*. Low
938 speed pellet fraction contains intact Caco-2 cells, complete organelles,
939 cytoskeleton components and intact bacteria. As fractionation controls, all blots
940 were analyzed using anti-HA, anti-CyaA, anti-DnaK, anti-Calnexin and anti-
941 Tubulin antibodies. Each fractionation was done twice with identical results.

942

943 **Figure 4. Regulation of NleH.** (A) Schematic representation of the
944 transcriptional fusion of *nleH* to the *cat* reporter gene (pKKnleH-HA). Structural
945 region of *nleH* marked with a double HA epitope tag was fused as an operon to

946 the promoter-less *cat* reporter gene. Fusion includes 1741 bp upstream of the
947 *nleH* start codon. (B) CAT specific activity driven by pKKnleH in the indicated *C.*
948 *rodentium* strains after six hours of growth in DMEM cultures. Results shown are
949 the average and standard deviation of four independent experiments. (C)
950 Western blot assay of whole cell extracts and secreted proteins of the strains
951 used in the experiment shown in (B), using anti-HA, anti-EspA and anti-DnaK
952 antibodies. An experiment with representative results is shown. (D) Schematic
953 representation of the transcriptional fusion of *espG* to the *cat* reporter gene
954 (pKKespG-HA). Structural region of *espG* marked with a double HA epitope tag
955 was fused in operon to *cat*. Fusion includes 353 bp upstream of the *espG* start
956 codon. (E) CAT specific activity obtained from culture samples of strains carrying
957 pKKespG-HA after six hours of growth in DMEM. Results shown are the average
958 and standard deviation of four independent experiments. (F) Western blot
959 analysis of whole cell extracts and secreted proteins of strains shown in (E). An
960 experiment with representative results is shown.

961

962 **Figure 5. NleH expressed from P_{lac} is coordinately regulated with the LEE-**
963 **encoded T3SS.** Western blot assay of bacterial pellet and secreted proteins of
964 indicated *C. rodentium* strains carrying pTnleH-HA expressing NleH-HA from P_{lac}
965 (A) and pTOPO-2HA expressing EspG-HA from P_{lac} (B), using anti-HA and anti-
966 DnaK antibodies. Expression was induced with 5µM IPTG for 5 hours. Assays
967 were done twice with identical results.

968

969 **Figure 6. Lon protease degrades NleH in the absence of CestT.** (A) Western
970 blot assay of bacterial pellets of EPEC strains (as indicated) transformed with
971 pTnleH-HA, which expresses NleH-HA fusion from P_{lac}, using anti-HA and anti-
972 DnaK antibodies. Expression of the fusion was induced with 5μM IPTG for 5
973 hours. (B) Analysis of stability of full length NleH-HA and of its amino- and
974 carboxi-terminal deletions NleH₍₂₀₋₂₉₃₎-HA and NleH₍₁₋₁₃₃₎-HA (illustrated in Fig.
975 2A). Western blot assay of WT, Δler and $\Delta grlA$ strains of *C. rodentium* containing
976 pTnleH-HA, pTnleH20-293HA and pTnleH1-133HA plasmids. Strains were grown
977 in DMEM and the expression of fusions was induced with 5μM IPTG for 5 hours.
978 Assays were done twice with identical results.

979
980 **Figure 7. NleH is required at early stages during colonization in the mouse**
981 **model of infection.** Groups of C57BL/6 mice were orally infected with equal
982 numbers of WT or $\Delta nleH$ bacteria. Mice were sacrificed at days 6 (A) or 10 (B)
983 post-infection, and total burden of *C. rodentium* in distal colon was assessed by
984 McConckey serial dilution plating. *Statistical significant difference regarding WT
985 strain (P=0.01).

986 **Table 1.** Strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Description ^a	Reference or source
<i>C. rodentium</i> strains		
DBS100	Wild type (ATCC 51459)	(55)
Δler	DBS100 carrying an in-frame deletion of <i>ler</i>	(15)
$\Delta grlA$	DBS100 carrying an in-frame deletion of <i>grlA</i>	(15)
$\Delta grlR$	DBS100 carrying an in-frame deletion of <i>grlR</i>	(15)
$\Delta sepD$	DBS100 carrying an in-frame deletion of <i>sepD</i>	(15)
$\Delta sepD/\Delta escN$	DBS100 carrying an in-frame deletion of <i>sepD</i> and an in-frame deletion of <i>escN</i>	(15)
$\Delta escN$	DBS100 carrying an in-frame deletion of <i>escN</i>	(15)
$\Delta cesT$	DBS100 carrying an in-frame deletion of <i>cesT</i>	(15)
$\Delta nleH$	DBS100 $\Delta nleH::Km$	This study
$\Delta nleF$	DBS100 $\Delta nleF::Km$	(66)
EPEC strains		
E2348/69	Wild type	(38)
$\Delta escN$	E2348/69 carrying an in-frame deletion of <i>escN</i>	(24)
Δlon	E2348/69 carrying an in-frame deletion of <i>lon</i>	Deng, unpublished
$\Delta cesT/\Delta lon$	E2348/69 carrying an in-frame deletion of <i>cesT</i> and an in-frame deletion of <i>lon</i>	Deng, unpublished
$\Delta clpP$	E2348/69 carrying an in-frame deletion of <i>clpP</i>	Deng, unpublished
$\Delta cesT/\Delta clpP$	E2348/69 carrying an in-frame deletion of <i>cesT</i> and an in-frame deletion of <i>clpP</i>	Deng, unpublished
Δler	E2348/69 carrying an in-frame deletion of <i>ler</i>	Bustamante, unpublished
$\Delta grlA$	E2348/69 carrying an in-frame deletion of <i>grlA</i>	Huerta, unpublished
$\Delta ler/\Delta lon$	E2348/69 carrying an in-frame deletion of <i>ler</i> , and an in-frame deletion of <i>lon</i>	This study
$\Delta grlA/\Delta lon$	E2348/69 carrying an in-frame deletion of <i>grlA</i> , and an in-frame deletion of <i>lon</i>	This study
Plasmids		
pKD46	Red recombinase system under <i>araB</i> promoter; Ap^r	(12)
pKD4	Template plasmid containing the Km cassette for lambda Red recombinase	(12)
pTOPO-2HA	pCR2.1-TOPO derivative carrying <i>C. rodentium espG</i> coding region fused to two HA epitope at the carboxyl-terminus	(15)
pTnleH-HA	pTOPO-2HA derivative containing <i>C. rodentium nleH</i> coding region fused to two HA epitope at the carboxyl-terminus	This study
pTnleH20-293HA	pTnleH-HA with <i>nleH</i> coding region deleted from codons 2 to 19	This study
pTnleH1-133HA	pTnleH-HA with <i>nleH</i> coding region deleted from codons 134 to 293	This study
pMPM-K3	Low-copy-number cloning vector; p15A derivative; Km^r	(44)
pOG-ATC Δ 304	pACYC184 derivative expressing amino acids 1 to 32 of <i>S. enterica</i> SsK1 fused to CyaA	(37)
pK3cyaA	pMPM-K3 derivative containing <i>cyaA</i> residues 2-401	This study
pK3nleHcyaA	pK3cyaA containing <i>nleH</i> coding region fused to <i>cyaA</i>	This study
pK3nleH1-19cyaA	pK3nleHcyaA with <i>nleH</i> coding region deleted codons 20 to 293	This study
pKK232-8	pBR322 derivative containing a promoterless chloramphenicol acetyltransferase (<i>cat</i>) gene	Pharmacia LKB Biotechnology
pTregNleH-HA	pTOPO-2HA derivative containing <i>C. rodentium nleH</i> fused to two HA epitope at the carboxyl terminus, including 1749 bp of the regulatory region	This study

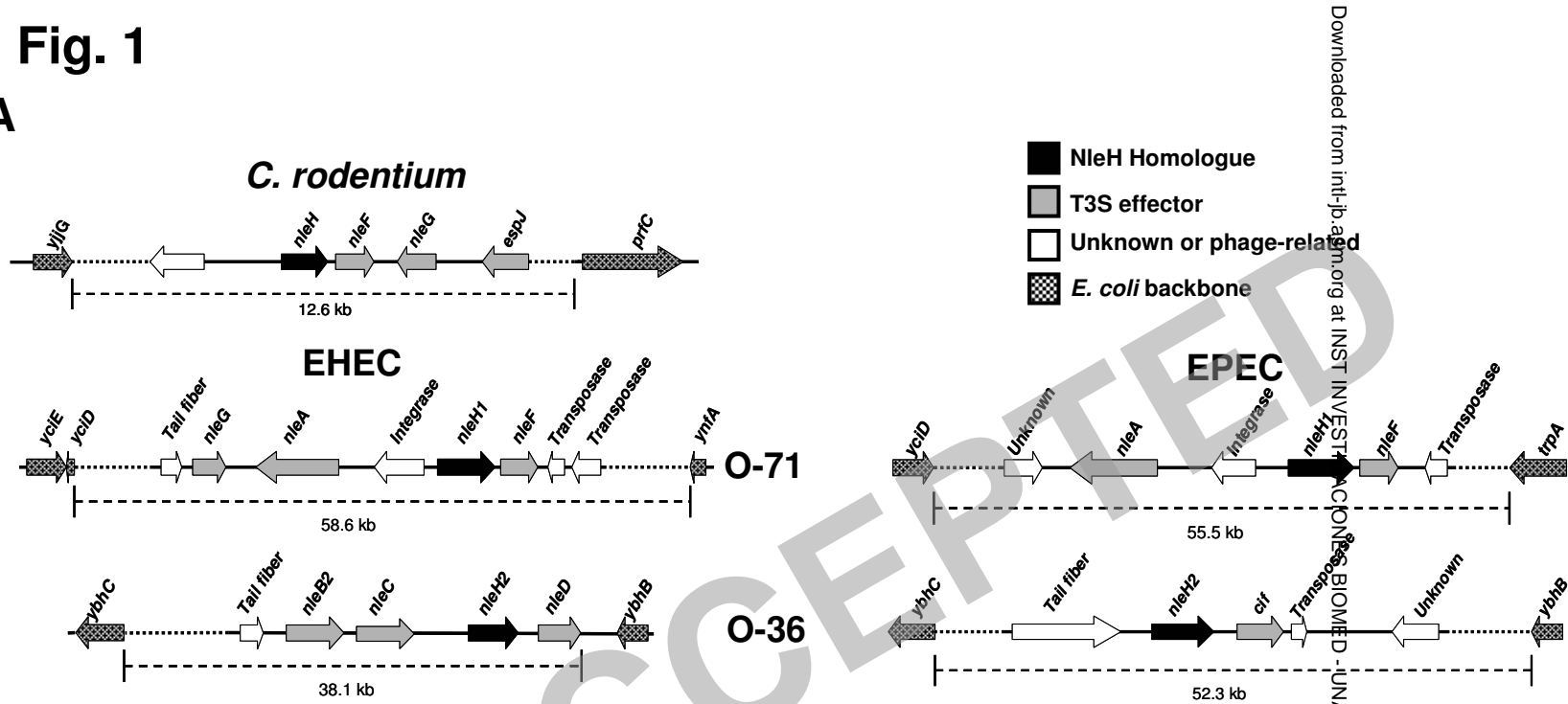
pKKnleH-HA	pKK232-8 derivative containing <i>nleH-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -1741 to +876, with respect to the start codon. <i>nleH</i> fused to two HA epitope	This study
pKKespG-HA	pKKnleH-HA derivative containing <i>espG-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -363 to +1182, with respect to the start codon. <i>espG</i> fused to two HA epitope	This study
pRE112	Suicide vector, <i>sacB</i> , Cm ^r	(18)
pRE- Δ <i>ler</i>	Suicide construct carrying an in frame deletion of EPEC <i>ler</i> in pRE112.	Bustamante, unpublished
pRE- Δ <i>grlA</i>	Suicide construct carrying an in frame deletion of EPEC <i>grlA</i> in pRE112.	Huerta, unpublished

987

ACCEPTED

Fig. 1

A



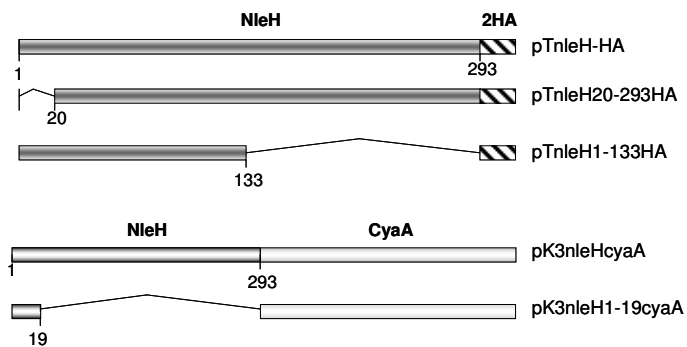
B

NleH2EHEC	MLSPYSVNLGCSWNSLTRNLTSPDNRVLS	SVRDAAVHSDNGAQVKVGNRTYRVVATDNKFCVTRES	HSGCFTNLLHRLGWPKGEISRKIEVMLNASPV	AAMERGI	VHSNRPD	LPPVDYA	120
NleH2EPEC	MLSPSSVNLGCSWNSLTRNLTSPDSRIL	SVRDAASSDNGAQVKVGNRTYRVVTDNKF	CVTRESHSGCFTNLLHRLGWPKGEISRKIEV	MLN	SSPV	RAMERGA	VHSNRPDLPPVDYA 120
NleH1EHEC	MLSPSSINLGCWNSLTRNLTSPDNRVLS	SVRDAAVHSDSGTQVTGNGRTYRVVTDNKF	CVTRESHSGCFTNLLHRLGWPKGEISRKIEA	MLNTSP	VTT	IERG	VHSNRPDLPPVDYA 120
NleH1EPEC	MLSPSSINLGCWNSLTRNLTSPDNRVLS	SVRDAAVHSDSGTQVTGNGRTYRVVTDNKF	CVTRESHSGCFTNLLHRLGWPKGEISRKIEA	MLNTSP	VTT	IERG	VHSNRPDLPPVDYA 120
NleHCROD	MLSPAPVNLGCSWNSLTRNLTSPDNAVLS	SVRDAACSDNGTQVKVGNRIYRVVTDNKF	CVARENHSGCFTNMLHRLGWPKGEITR	KIEA	MLNTSP	V	LAMERGSVHLKRPDLPPVDYM 120
OspG	-----MKITSTIIQTFFPFEN-----	-----NNSHAGIVT-----					25
	: * : * : * : *	: * : * : * : *					
NleH2EHEC	PPPELPSVDY-----NRLSVP	GNVIGKGGNAVVYEDAEADATKVLK	MFTTSQSN-----E	EVTSEVRCFNQYYGAGSAEKI	YGNNGDI	IGIRMDKINGES	LLNIS--SLPAQAEHAI 223
NleH2EPEC	PPPELPSVDY-----NNSLPVP	GYVIGKGGNAVVYEDAEADATKVLK	MFTTSQSN-----E	EVTNEVRCFNQYYGAGSAEKI	YGDNGDI	IGIRMDKINGES	LLNIS--SLPAQAEHAI 223
NleH1EHEC	QPPELPPADYTTQSELPRVSNNKSPVP	GNVIGKGGNAVVYEDMEDITKVLK	MFTTISQSH-----E	EVTSEVRCFNQYYGSGSAEKI	YNDNGNV	IGIRMDKINGES	LLDIP--SLPAQAEQAI 233
NleH1EPEC	QPPELPPADYTTQSELPRVSNNKSPVP	GNVIGKGGNAVVYEDMEDITKVLK	MFTTISQSH-----E	EVTSEVRCFNQYYGSGSAEKI	YNDNGNV	IGIRMDKINGES	LLDIP--SLPAQAEQAI 233
NleHCROD	QPPELPRVDY-----NKSVP	GNVIGKGGNAVVYEDMDITKVLK	MFTTISQNP-----E	EVTNEVSCFNQYYGSGSAEKI	YDANGDI	IGIRMDKINGES	LFNIQ--SLPTQAEQAI 223
OspG	-----EPIILGKLIQG	STAEIFEDVNDSSALYKKYDLIGNQYNEILE	MAWQES	ELFNAFYG-DEASVVIQYGGD	VY-LRMLRVP	GTP	LSDDIDTADIPDNIESLY 122
	: * : * : * : * : * : * : * : *	: * : * : * : * : * : * : * : *					
	▲ ▲ ▲ ▲						
NleH2EHEC	YDMFDRLEQKGI	LFVDTTETNVLYDR	AKNEFNPIDISSYNVSDRSWSESQ---	IMQSYHGGKQDLISV	VLSKI-		293 83
NleH2EPEC	YDMFDRLEQKGI	LFIDTTETNVLYDR	TRNEFNPIDISSYNI	SERSWSENQ---	IMQSYHGGKQDLISV	VLSKI-	293 83
NleH1EHEC	YDMFDRLEKKG	ILFVDTTETNVLYDR	MRNEFNPIDISSYNVSDISWSEHQ---	VMQSYHGGKLDLISV	VLSKI-		303 83
NleH1EPEC	YDMFDRLEKKG	ILFVDTTETNVLYDR	MRNEFNPIDISSYNVSDISWSEHQ---	VMQSYHGGKLDLISV	VLSKI-		303 83
NleHCROD	YDMFDRLEQKR	ILFVDTTETNVLYDR	RVRNEFNPIDISSYNI	SDVSWREGQ---	IMQSYHGGKQDLIRV	VLSRI-	293 100
OspG	LQLICKLNELSI	IHYDLNTGNLYD	RESESLFPIDFRNI	YAEYYAATKKDK	EIDRRRLQMR	TDFYSLN	RKYL 196 15
	: : * : * : * : * : * : * : *	: : * : * : * : * : * : * : *					

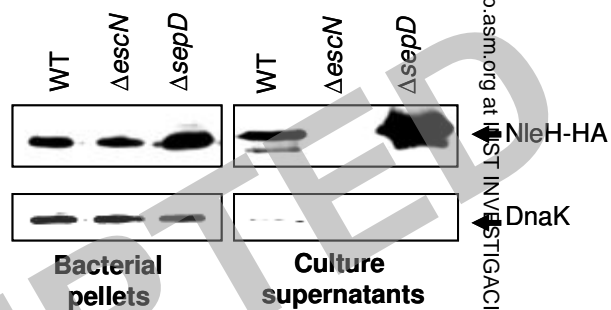
Downloaded from intl-jb.asm.org at INST INVESTI CONN BIOMED UNAM on January 25, 2008

Fig. 2

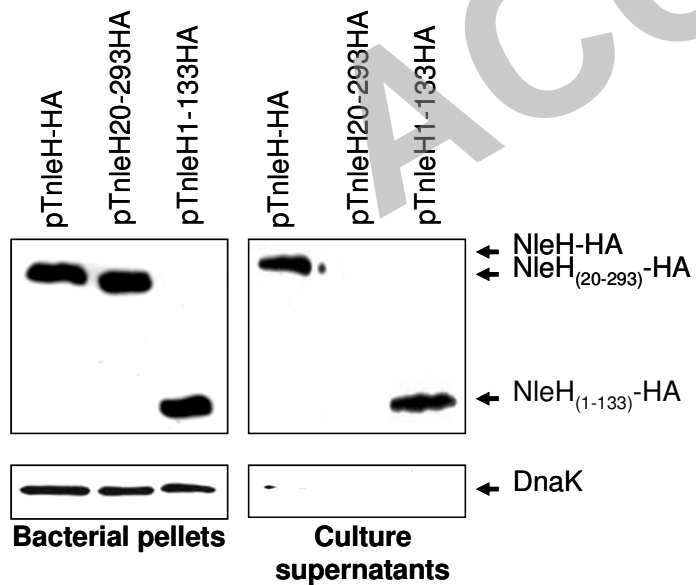
A



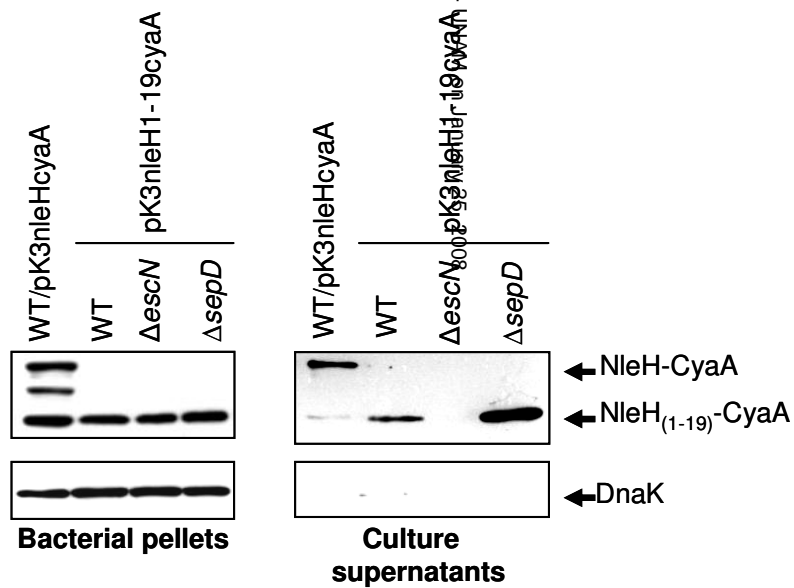
B



C



D



Downloaded from intl-jp.asnr.org at UNIV ESTADISTICAS BIOMED - VIZCAYA on 08/09/18

Fig. 3

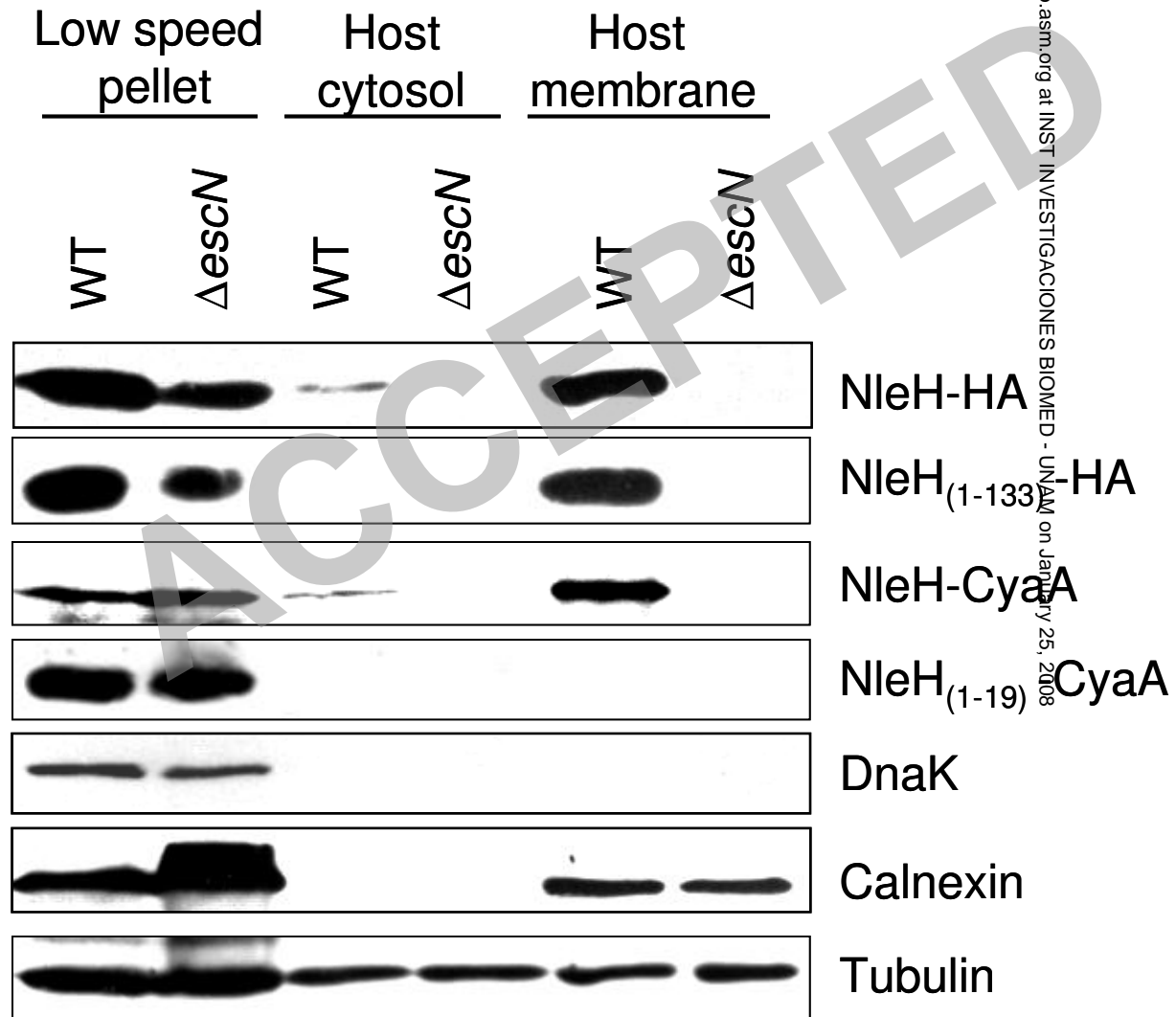
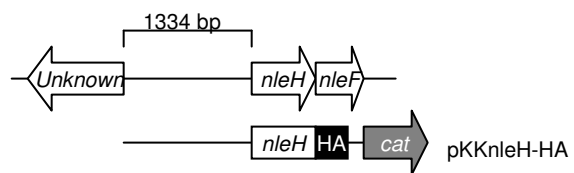
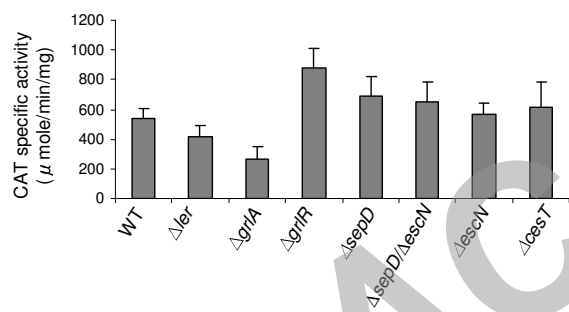


Fig. 4

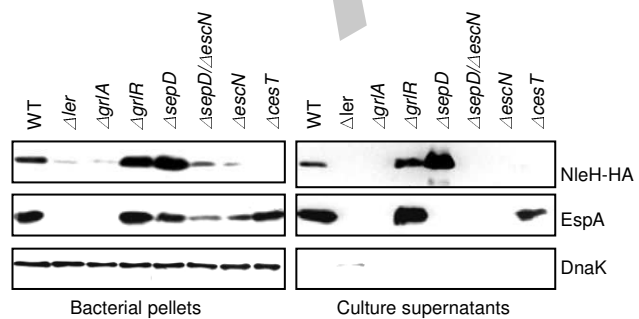
A



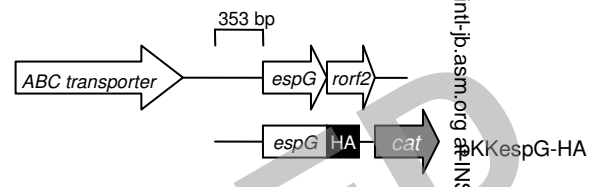
B



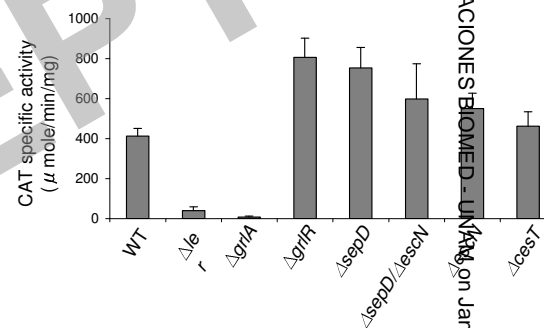
C



D



E



F

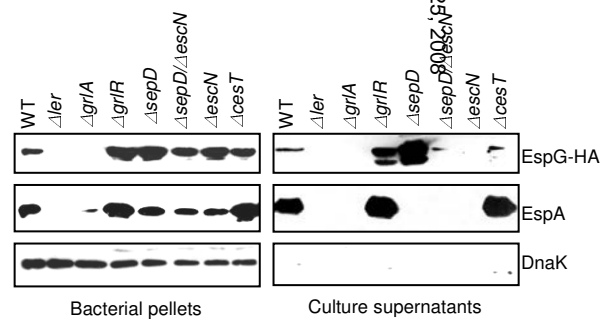


Fig. 5

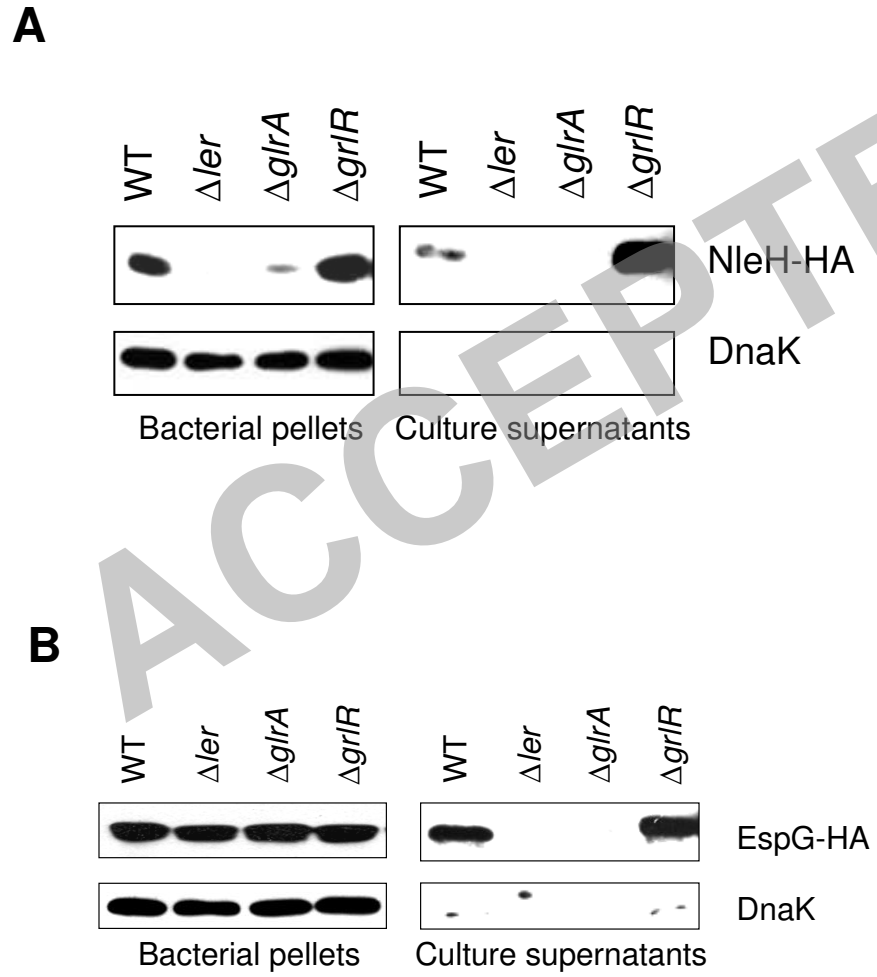


Fig. 6

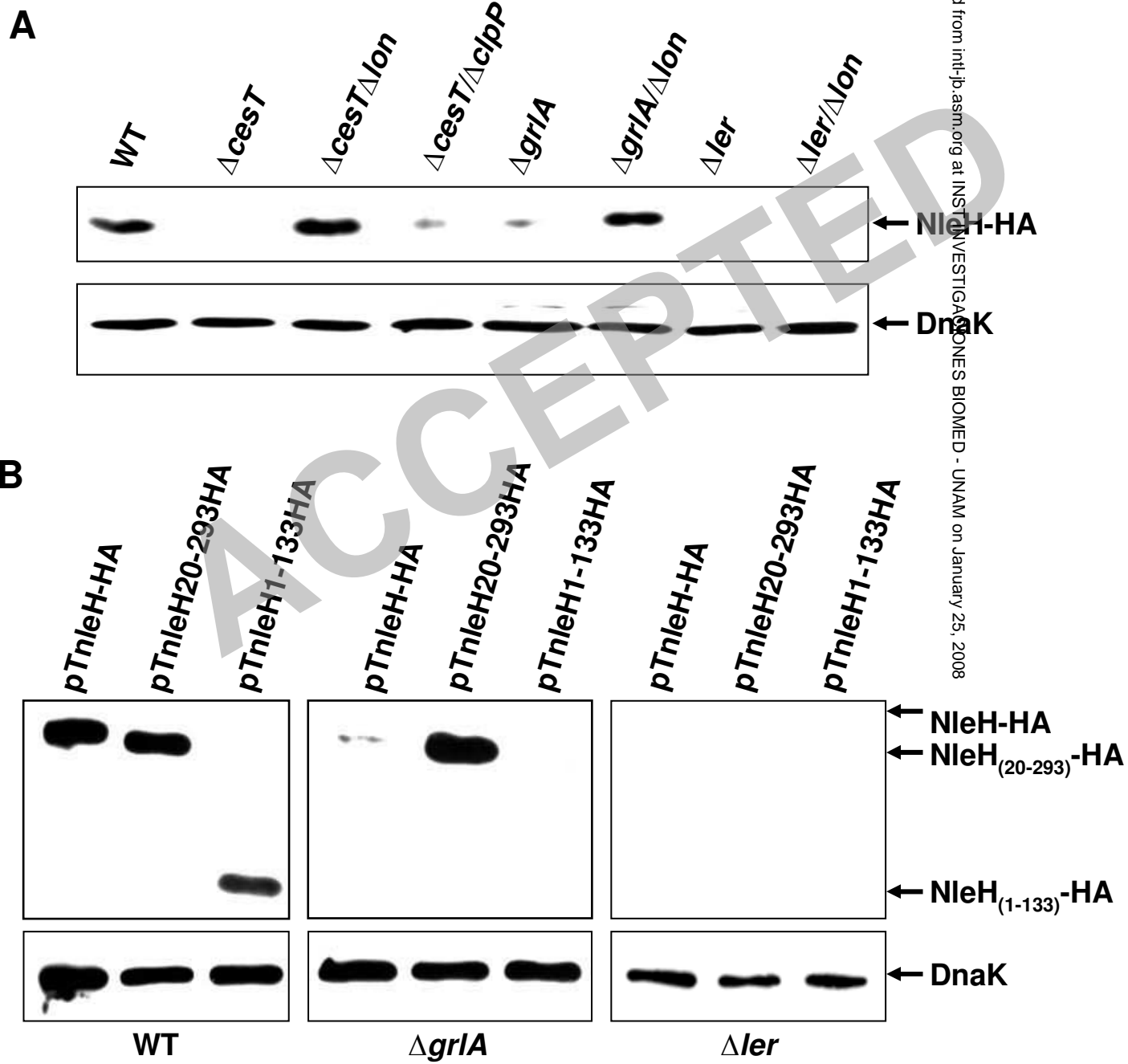
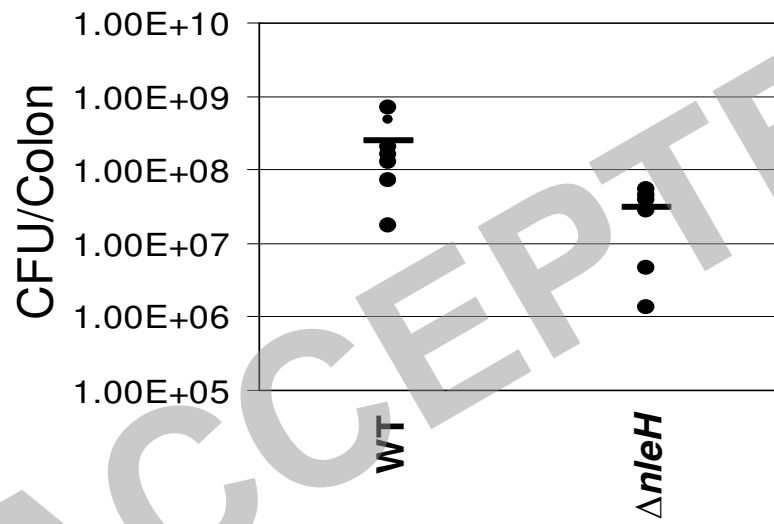


Fig. 7

A



B

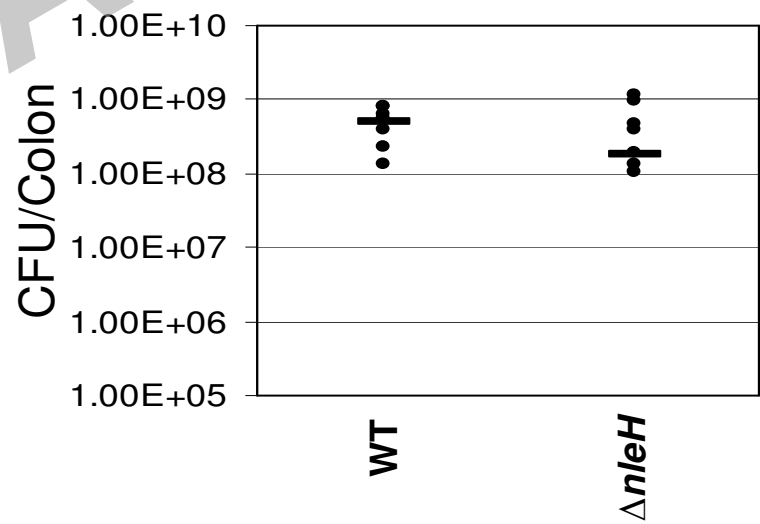


Tabla1. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio.

Cepa o plásmido	Descripción ^a	Fuente o referencia
Cepas de <i>C. rodentium</i>		
DBS100	Silvestre (ATCC 51459)	(69)
Δler	DBS100 conteniendo una eliminación en fase de <i>ler</i>	(19)
$\Delta grlA$	DBS100 conteniendo una eliminación en fase de <i>grlA</i>	(19)
$\Delta grlR$	DBS100 conteniendo una eliminación en fase de <i>grlR</i>	(19)
$\Delta sepD$	DBS100 conteniendo una eliminación en fase de <i>sepD</i>	(19)
$\Delta sepD/\Delta escN$	DBS100 conteniendo una eliminación en fase de <i>sepD</i> y una eliminación en fase de <i>escN</i>	W. Deng, no publicada
$\Delta escN$	DBS100 conteniendo una eliminación en fase de <i>escN</i>	(19)
$\Delta cesT$	DBS100 conteniendo una eliminación en fase de <i>cesT</i>	(19)
$\Delta nleH$	DBS100 $\Delta nleH::Km$	Este estudio
Cepas de EPEC		
E2348/69	EPEC Silvestre O127:H26	(46)
$\Delta escN$	E2348/69 conteniendo una eliminación en fase de <i>escN</i>	(28)
Δlon	E2348/69 conteniendo una eliminación en fase de <i>lon</i>	W. Deng, no publicada
$\Delta cesT/\Delta lon$	E2348/69 conteniendo una eliminación en fase de <i>cesT</i> y una eliminación en fase de <i>lon</i>	W. Deng, no publicada
$\Delta clpP$	E2348/69 conteniendo una eliminación en fase de <i>clpP</i>	W. Deng, no publicada
$\Delta cesT/\Delta clpP$	E2348/69 conteniendo una eliminación en fase de <i>cesT</i> y una eliminación en fase de <i>clpP</i>	W. Deng, no publicada
Plásmidos		
pKD46	Sistema Red recombinasa bajo el promotor de <i>araB</i> ; Amp ^r	(13)
pKD4	Plásmido molde conteniendo el gen de resistencia a Km para la recombinación lambda Red	(13)
pTOPO-2HA	Derivado del pCR2.1-TOPO conteniendo la región codificante de <i>espG</i> de <i>C. rodentium</i> fusionada a dos epítopes de HA en el extremo carboxilo terminal	(19)
pTnleH-HA	Derivado de pTOPO-2HA conteniendo la región codificante de <i>nleH</i> de <i>C. rodentium</i> fusionada a dos epítopes de HA en el extremo carboxilo terminal	Este estudio
pTnleH20-293HA	pTnleH-HA con una eliminación en los codones 20 a 193 de la región codificante de <i>nleH</i> .	Este estudio
pTnleH1-133HA	pTnleH-HA con una eliminación en los codones 134 a 293 de la región codificante de <i>nleH</i>	Este estudio
pMPM-K3	Vector de clonación de bajo número de copias; derivado de p15A; Km ^r	(55)
pOG-ATCΔ304	Derivado de pACYC184 expresando los residuos 1 a 32 de Ssk1 de <i>S. enterica</i> fusionados a CyaA	(44)
pK3cyaA	Derivado de pMPM-K3 conteniendo los residuos 2 a 401 de <i>cyaA</i>	Este estudio
pK3nleHcyaA	pK3cyaA conteniendo la región codificante de <i>nleH</i> fusionada a <i>cyaA</i>	Este estudio
pK3nleH1-19cyaA	pK3nleHcyaA con los codones 20 a 293 de <i>nleH</i> eliminados	Este estudio
pKK232-8	Derivado de pBR322 conteniendo el gen de cloranfenicol acetil transferasa (<i>cat</i>) sin promotor.	Pharmacia LKB
pTregNleH-HA	Derivado de pTOPO-2HA conteniendo la región codificante de	Biotechnology Este estudio

	<i>nleH</i> fusionada a dos epítopes de HA en el extremo carboxilo terminal, incluyendo 1334 pb de la región corriente arriba de <i>nleH</i>	
pKKnleH-HA	Derivado de pKK232-8 conteniendo la fusión transcripcional <i>nleH-cat</i> de los nucleótidos -1741 a +876. <i>nleH</i> fusionado a dos epítopes de HA	Este estudio
pKKespG-HA	Derivado de pKKnleH-HA conteniendo la fusión transcripcional <i>espG-cat</i> de los nucleótidos -363 a +1182. <i>espG</i> fusionado a dos epítopes de HA	Este estudio
pFLAG-CTC	Vector de expresión de proteínas fusionadas a FLAG por el extremo carboxilo; Amp ^r	Sigma-Aldrich
pFLAG-NleA	Derivado de pFLAG-CTC, conteniendo la región codificante de NleA de EHEC, fusionada al epítope FLAG por el extremo carboxilo terminal	(31)
pFLAG-EspX	Derivado de pFLAG-CTC conteniendo la región codificante de EspX de <i>C. rodentium</i> , etiquetada con el epítope FLAG por el extremo carboxilo terminal.	Este estudio
pFLAG-EspXL	Derivado de pFLAG-EspX, con el extremo amino de la región codificante de EspX libre de los codones correspondientes a los sitios HindIII, XhoI y EcoRI del polilinker	Este estudio
pTnleG-HA	Derivado del pTOPO-2HA, conteniendo la región codificante de <i>nleG</i> de <i>C. rodentium</i> etiquetada con dos epítopes de HA por el extremo carboxilo terminal	Este estudio
pTespK-HA	Derivado del pTOPO-2HA conteniendo la región codificante de <i>espK</i> de <i>C. rodentium</i> etiquetada con dos epítopes de HA por el extremo carboxilo terminal	Este estudio

^aLas coordenadas de las fusiones transcripcionales a *cat* se indican con respecto al sitio de inicio de traducción de *nleH* o *espG*.