



**Universidad Nacional  
Autónoma de México**

---

Instituto de Biotecnología

**“Caracterización molecular de la proteína GrIA,  
un regulador positivo de factores de virulencia  
de *Escherichia coli* enteropatógena”**

T E S I S

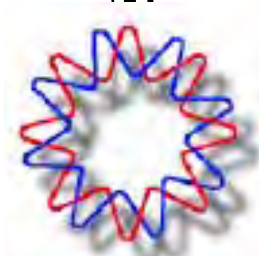
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

M. C. RAFAEL JIMÉNEZ MEJÍA

**TUTOR:**

DR. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA



**Agosto, 2010**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Agradecimientos**

A José Luis por permitirme formar parte de su grupo de investigación, por su amistad, sus consejos académicos y personales.

A mi comité revisor de tesis, por sus comentarios que enriquecieron y mejoraron el escrito final.

Dra. Bertha González Pedrajo  
Dra. Guadalupe Espín Ocampo  
Dr. Miguel Ángel Ceballos Gaos  
Dr. Mario Soberón Chávez  
Dr. José Luis Puente García

A mi comité tutorial, por sus sugerencias, aportaciones y dirección durante el desarrollo del presente trabajo.

Dra. Gloria Soberón Chávez  
Dr. Lorenzo Segovia Forcella  
Dr. José Luis Puente García

A mis compañeros de Laboratorio por las experiencias vividas durante mi estancia, a todos aquellos que gracias a sus opiniones, aportaciones y críticas contribuyeron a la culminación de este trabajo. Gracias a todos.

Durante el desarrollo del proyecto conté con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (No. de registro 183500)

## **Dedicatoria**

A mis Padres, Delia y José Inés, por su comprensión y apoyo.

A mis hermanos, Pascual, Agustín, Leticia, Miguel, Enrique, Adrián, María y Juan, por todas las cosas maravillosas que hemos vivido juntos.

Con cariño para Sandra, Adriana y Edgar.

A mis amigos.

A todas las personas que directa o indirectamente han contribuido en mi formación y en la culminación del presente trabajo.

## Lista de abreviaturas

|                 |  |
|-----------------|--|
| <b>A/E</b>      | Adherencia y destrucción.  |
| <b>LEE</b>      | Locus de destrucción del enterocito.                             |
| <b>SST3</b>     | Sistema de secreción tipo 3                                      |
| <b>DNA</b>      | Ácido desoxirribonucleico  |
| <b>MBP</b>      | Proteína de unión a maltosa                                      |
| <b>GrIA</b>     | Regulador global del LEE (Activador)                             |
| <b>GrIR</b>     | Regulador global del LEE (Represor)                              |
| <b>CAT</b>      | Cloranfenicol acetil transferasa                                 |
| <b>HTH</b>      | Hélice-vuelta-hélice   |
| <b>EPEC</b>     | <i>Escherichia coli</i> enteropatógena                           |
| <b>EHEC</b>     | <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica                        |
| <b>RNA</b>      | Ácido ribonucleico   |
| <b>RNAP</b>     | RNA polimerasa   |
| <b>EAF</b>      | Factor de adherencia de EPEC                                     |
| <b>LB</b>       | Luria-Bertani  |
| <b>DMEM</b>     | Medio de Eagle modificado por Dulbecco                           |
| <b>PCR</b>      | Reacción en cadena de la polimerasa                              |
| <b>SDS-PAGE</b> | Electroforesis en gel de poliacrilamida-Dodecil sulfato de sodio |
| <b>EMSAs</b>    | Ensayos de retardamiento en gel de la movilidad electroforética  |
| <b>RPM</b>      | Revoluciones por minuto  |
| <b>mM</b>       | Milimolar  |
| <b>μM</b>       | Micromolar   |
| <b>ml</b>       | Mililitros   |
| <b>μl</b>       | Microlitros  |
| <b>μg</b>       | Microgramos  |
| <b>ng</b>       | Nanogramos   |
| <b>DTT</b>      | Ditiotreitol   |
| <b>BSA</b>      | Albúmina de suero bovino   |
| <b>DTNB</b>     | 5,5-ditio-bis-(ácido nitrobenzoico)                              |
| <b>PBS</b>      | Amortiguador de fosfatos salino                                  |

# Índice

|   |           |
|---|-----------|
| Resumen   | VI        |
| Abstract  | VII       |
| <b>1.- Introducción</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1.- Familia de enteropatógenos A/E  | 1         |
| 1.2.- Isla de patogenicidad LEE   | 2         |
| 1.3.- Sistema de secreción tipo III (SST3)  | 3         |
| 1.4.- Proteínas efectoras de los patógenos A/E  | 5         |
| 1.5.- Regulación de la isla de patogenicidad LEE  | 7         |
| <b>2.- Antecedentes</b>   | <b>11</b> |
| <b>3.- Objetivos</b>  | <b>16</b> |
| 3.1.- General   | 16        |
| 3.2.- Particular  | 16        |
| 3.3.- Específicos   | 16        |
| <b>4.- Materiales y métodos</b>   | <b>17</b> |
| 4.1.- Cepas, medios de cultivo y plásmidos usados en este trabajo                       | 17        |
| 4.2.- Manipulaciones de DNA   | 17        |
| 4.3.- Construcción de mutantes de GrIA  | 18        |
| 4.4.- Generación de las fusiones a MBP  | 19        |
| 4.5.- Purificación de MBP-GrIA  | 20        |
| 4.6.- Ensayos de retardamiento en gel de la movilidad electroforética (EMSAs)           | 22        |
| 4.7.- Ensayo de CAT   | 23        |
| 4.8.- Ensayos de "Pull down"  | 24        |
| 4.9.- Construcción de las mutantes EPEC $\Delta$ grIA y EPEC $\Delta$ grIA $\Delta$ hns | 26        |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.10.- Perfil de proteínas secretadas   | 27        |
| 4.11.- Dominancia negativa  | 27        |
| 4.12.- Inmunodetección de proteínas por “Western blot”  | 28        |
| 4.13.- Far western  | 29        |
| <b>5.- Resultados</b>   | <b>35</b> |
| 5.1.- GrIA sólo activa la expresión de <i>ler</i>   | 35        |
| 5.2.- GrIA contrarresta el efecto negativo de H-NS en el promotor de <i>ler</i>                                 | 37        |
| 5.3.- GrIA no dimeriza ni interactúa con la RNAP o con los reguladores Ler y H-NS                               | 41        |
| 5.4.- GrIA se une específicamente a la región reguladora de <i>ler</i>  | 43        |
| 5.5.- GrIA desplaza a H-NS  | 47        |
| 5.6.- GrIA completa es requerida para activar la expresión de <i>ler</i> , pero no para la interacción con GrIR | 49        |
| 5.7.- Identificación de aminoácidos importantes para la función de GrIA   | 53        |
| 5.8.- Aminoácidos del HTH de GrIA participan en la interacción con GrIR   | 59        |
| <b>6.- Discusión y conclusiones</b>   | <b>62</b> |
| <b>7.- Perspectivas</b>   | <b>71</b> |
| <b>8.- Bibliografía</b>   | <b>72</b> |
| <b>9.- Anexos</b>   |           |

## Resumen

Las infecciones producidas por *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) se caracterizan por la formación de las lesiones A/E (**A**ttaching and **E**ffacing) sobre la superficie de las células infectadas. Los genes requeridos para la formación de la lesión A/E están codificados en la isla de patogenicidad LEE (**L**ocus of **E**nterocyte **E**ffacement). Ler (**L**EE-**e**ncoded **r**egulator) es el regulador positivo central de los genes del LEE. La expresión de *ler* es regulada positivamente por el regulador GrIA, el cual también está codificado en el LEE. En este trabajo analizamos el mecanismo por el cual GrIA regula positivamente la expresión de *ler* y demostramos que en ausencia de H-NS, GrIA no es esencial para su activación, confirmando que GrIA actúa como un antagonista de H-NS en el promotor de *ler*. Con el propósito identificar dominios funcionales de GrIA se hicieron eliminaciones de 20 residuos a lo largo de la secuencia de la proteína, dicho análisis reveló que se requiere la proteína completa para activar la expresión de *ler*, mientras que para la interacción con GrIR los 37 aminoácidos del extremo C-terminal son dispensables. También se construyeron mutaciones puntuales para analizar la importancia funcional del motivo de unión a DNA tipo HTH (**H**elix-**T**urn-**H**elix) localizado en la mitad N-terminal de GrIA. Varias mutantes del motivo HTH abatieron completamente la actividad de GrIA, así como su unión específica a la secuencia corriente debajo de la posición -54 de la región reguladora de *ler*. Algunas de esas mutantes aunque inactivas, fueron capaces de interactuar con el regulador negativo GrIR indicando que la pérdida de actividad no fue consecuencia de un plegamiento proteico anormal. En resumen GrIA consiste de al menos dos dominios funcionales, uno involucrado en la activación y la unión al DNA y otro en la heterodimerización con GrIR.



## Abstract

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infections are characterized by the formation of attaching and effacing (A/E) lesions on the surface of infected epithelial cells. The genes required for the formation of A/E lesions are encoded within a pathogenicity island called the Locus of Enterocyte Effacement (LEE). The key regulatory factor controlling the expression of LEE genes is the LEE-encoded regulator, Ler. Expression of the *ler* gene is positively regulated by GrIA, which is also encoded within the LEE. Here we analyzed the mechanism by which GrIA positively regulates *ler* expression. Analysis of LEE gene expression in wild type EPEC and its  $\Delta$ *grIA*,  $\Delta$ *hns* and  $\Delta$ *grIA*/ $\Delta$ *hns* derivatives showed that in the absence of H-NS, GrIA is not longer essential for *ler* activation, as well as for expression or secretion of LEE-encoded proteins, further confirming that GrIA acts in part as an H-NS antagonist on the *ler* promoter. Single amino acid mutants were constructed to test the functional significance of the putative Helix-Turn-Helix (HTH) DNA binding motif found at the N-terminal half of GrIA, as well as at the C-terminal domain of the protein. Several mutations within the HTH motif, but not all, completely abolished GrIA activity, as well as specific binding to its target sequence downstream from position -54. Interestingly, some of these mutants, albeit inactive, were still able to interact with GrIR, indicating that lost of activity was not a consequence of protein misfolding. Additional residues in the vicinity of the HTH domain, as well as at the end of the protein, were also shown to be important for GrIA activity as a transcriptional regulator, but not for its interaction with GrIR. In addition, by generating a series of GrIA deletion derivatives lacking tracks of 20 amino acids, we found that the complete protein was required to activate the *ler* promoter, but that only the first 100 aa were sufficient to form a complex with GrIR. In summary, GrIA consists of at least two functional domains, one involved in transcriptional activation and DNA binding, and the other in heterodimerization with GrIR.

## 1.- Introducción

### 1.1.- Familia de enteropatógenos A/E

*Escherichia coli* es una bacteria que normalmente coloniza el tracto gastrointestinal de humanos unas pocas horas después del nacimiento, y se establece como parte de la flora intestinal sin causar enfermedad. El nicho de *E. coli* comensal es la mucosa del colon donde es una de las especies predominantes de la flora intestinal. Sin embargo, durante el curso evolutivo han surgido variantes de *E. coli* que han adquirido la capacidad de producir diferentes factores de virulencia que les han dado la posibilidad de colonizar diversos nichos y causar enfermedades que se presentan con diferentes cuadros clínicos (Kaper *et al.*, 2004). Dichos factores de virulencia son frecuentemente codificados en elementos móviles que al ser adquiridos por diferentes cepas crean nuevas combinaciones de factores de virulencia, dando lugar a la generación de patotipos (Kaper *et al.*, 2004).

*E. coli* enteropatógena (EPEC) es uno de los agentes causales más comunes de diarrea infantil en países en desarrollo (Clarke *et al.*, 2003), la cual junto con *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y el patógeno de roedores *Citrobacter rodentium*, además de otros patógenos de animales, forman la familia causante de la lesión de adherencia y destrucción o lesión A/E (por sus siglas en inglés de “Attaching and Effacing”). La característica principal de estos organismos entéricos Gram negativos es que se adhieren íntimamente a la membrana de las células epiteliales del intestino, conduciendo a la destrucción localizada de las microvellosidades bajo la bacteria adherente por la inducción de cambios en la

organización de proteínas del citoesqueleto de la célula hospedera. La reorganización del citoesqueleto de actina da lugar a la formación de una estructura parecida a un pedestal sobre la cual se encuentra la bacteria adherida íntimamente (Wales *et al.*, 2005). La adherencia íntima es inducida por la interacción de una proteína bacteriana de membrana externa llamada Intimina con Tir (“**T**ranslocated **I**ntimin **R**eceptor”), una proteína de origen bacteriano que es translocada e insertada en la membrana del enterocito. La interacción Tir-Intimina es clave para que se forme la estructura tipo pedestal (Hayward *et al.*, 2006).

### **1.2.- Isla de patogenicidad LEE**

A diferencia de la *E. coli* comensal encontrada en el intestino humano, los patógenos que causan la lesión A/E tienen en su genoma una isla de patogenicidad llamada LEE (“**L**ocus of **E**nterocyte **E**ffacement”), la cual es requerida para que se desarrolle la lesión A/E (McDaniel *et al.*, 1995). Desde el punto de vista evolutivo se considera que el LEE fue adquirido por transferencia horizontal por una *E. coli* comensal transformándose en patógena, además el hecho que su conservación, tamaño, organización y cantidad de genes, así como el contenido de GC son muy similares, se ha propuesto que la isla completa se ha transferido en distintos eventos lo que ha dado origen a las variantes en los patógenos A/E (Reid *et al.*, 2000). Además diversos estudios han mostrado que el contenido de G+C del LEE (~38%) difiere considerablemente con el promedio del genoma de *E. coli* (~50%) sugiriendo que su origen es diferente a *E. coli* (Castillo *et al.*, 2005; Elliott *et al.*, 1998). Además de acuerdo a las características generales

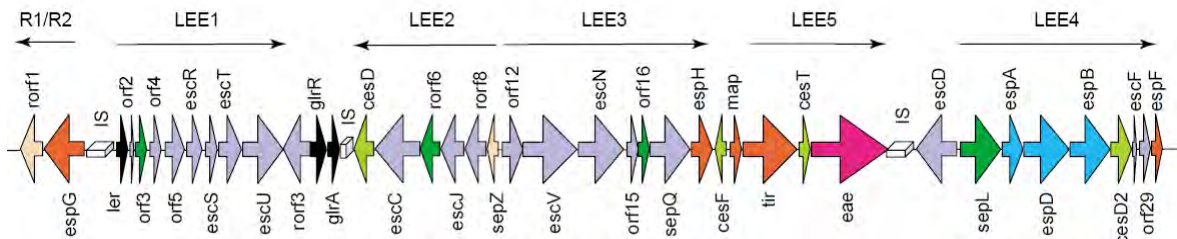
de las islas de otros organismos el LEE se encuentra localizado en un locus del RNAt *se/C* (Elliott *et al.*, 1998; McDaniel and Kaper, 1997).

La organización del LEE está muy conservada en los patógenos A/E. Consta de 41 genes que se encuentran organizados en cinco operones policistrónicos denominados LEE1 a LEE5, así como en otras unidades transcripcionales más pequeñas (Elliott *et al.*, 1998). Funcionalmente la isla se puede dividir en tres regiones principales, los operones LEE1 a LEE3 codifican para los componentes de un sistema de secreción tipo III (SST3), un complejo macromolecular también llamado inyectisoma responsable de transportar las proteínas efectoras desde el citoplasma bacteriano hasta el interior del enterocito (Clarke *et al.*, 2003; Garmendia *et al.*, 2005). El operón LEE4 codifica principalmente para las proteínas llamadas translocadoras que forman un filamento asociado al SST3 y un poro en la membrana de la célula epitelial del intestino y del cual depende la translocación de proteínas efectoras a la célula hospedera, las cuales alteran diferentes vías de señalización dentro de la célula, dando lugar a la destrucción de las microvellosidades y en su conjunto a la enfermedad. El operón LEE5 codifica para la Intimina y su receptor, Tir, necesarios para la adherencia íntima y la reorganización de actina para formar el pedestal al cual se mantiene unida la bacteria. Las proteínas efectoras están codificadas a lo largo del LEE (**Figura 1**) o en otras regiones del cromosoma.

### **1.3.- Sistema de secreción tipo III (SST3)**

A través de la evolución las bacterias han adquirido diversas vías para secretar proteínas desde el citoplasma al exterior de la célula o incluso inyectarlas

directamente al interior de las células hospederas. A la fecha, se han descrito varios sistemas involucrados en la secreción de proteínas del interior de la célula al medio extracelular (Tseng *et al.*, 2009).



**Figura 1.-** Organización de los genes del LEE de EPEC. El esquema muestra los 5 operones descritos en el texto (LEE1 a LEE5), así como otras unidades transcripcionales (Dean *et al.*, 2005).

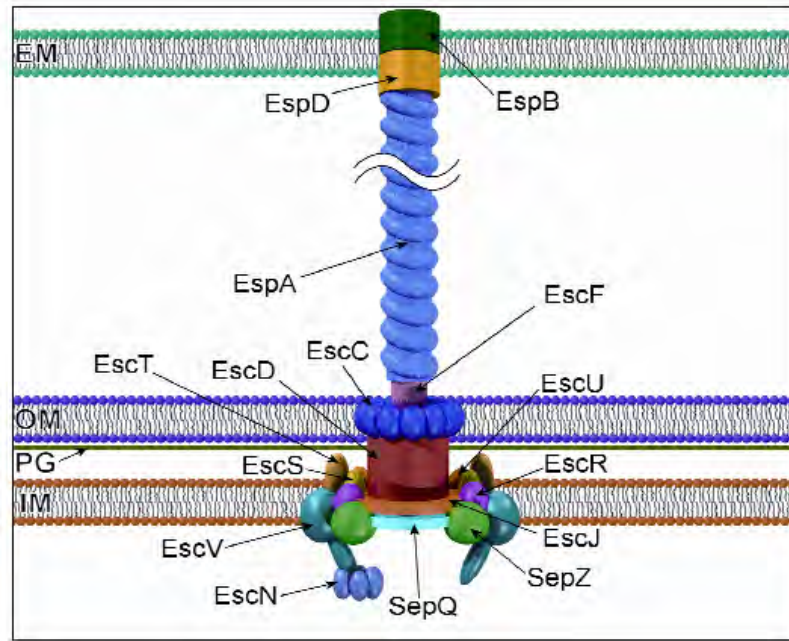
Uno de estos sistemas es el SST3 muy ampliamente distribuido en bacterias Gram negativas, principalmente patógenas que infectan animales, plantas y humanos, en las cuales los componentes del SST3 están muy conservados entre sí. Los SST3 funcionan como jeringas moleculares que transportan proteínas a través de la membrana interna, el espacio periplásmico, membrana externa y membrana del hospedero y que habilitan a las bacterias para inyectar proteínas desde el citoplasma bacteriano hasta el interior de la célula hospedera usando como fuente de energía la hidrólisis de ATP (Abe *et al.*, 2005; Cornelis, 2006). La relevancia y participación del SST3 en el proceso de

patogénesis de varias bacterias patógenas ha sido ampliamente documentada (Coburn *et al.*, 2007; Ghosh, 2004; Hueck, 1998). Muchos de los componentes del SST3 presentan identidad con proteínas del aparato basal flagelar, por lo que se ha sugerido que estos dos sistemas tienen un origen evolutivo común, aunque también basados en análisis filogenéticos se ha sugerido que el SST3 evolucionó a partir del sistema flagelar (Blocker *et al.*, 2003; Cornelis, 2006; Gophna *et al.*, 2003; Hueck, 1998).

El SST3 es un complejo multiproteico formado por alrededor de 20 proteínas diferentes, que consiste de dos anillos localizados en la membrana interna y externa que forman un conducto continuo entre ellos atravesando el periplasma. Asociada al anillo de la membrana externa se encuentra una estructura parecida a una aguja que se proyecta al exterior de la célula (Ghosh, 2004; Moraes *et al.*, 2008; Yip and Strynadka, 2006). En el caso de los patógenos A/E la aguja tiene una extensión denominada filamento formada por la polimerización de la proteína EspA, que facilita la interacción con la célula hospedera (Daniell *et al.*, 2001; Knutton *et al.*, 1998; Sekiya *et al.*, 2001). Finalmente en la punta de la aguja o del filamento se asocian unas proteínas denominadas translocadores, las cuales están muy conservadas en los SST3, éstas se insertan en la membrana de la célula hospedera y forman un poro a través del cual pasan las proteínas efectoras (**Figura 2**) (Kresse *et al.*, 1999; Wachter *et al.*, 1999).

#### **1.4.- Proteínas efectoras de los patógenos A/E**

La característica distintiva de EPEC, EHEC y *C. rodentium* es la lesión de adherencia y destrucción (A/E) que producen, consecuencia de la destrucción



**Figura 2.-** Representación esquemática de la estructura del SST3 de los patógenos A/E. Tomada de (Pallen *et al.*, 2005).

localizada de las microvellosidades, la adherencia íntima y la alteración del citoesqueleto de actina bajo la bacteria adherente, fenómenos que son producidos por la subversión de vías de transducción de señales en el interior de la célula hospedera mediada por las proteínas efectoras inyectadas por el SST3 (Dean and Kenny, 2009; Garmendia *et al.*, 2005; Hayward *et al.*, 2006). Algunos de los efectores tienen funciones redundantes dentro de la célula; sin embargo, se ha observado que en algunos casos se requiere co-operatividad entre efectores para

subvertir los procesos celulares. Dentro de las alteraciones más notables inducidas por las proteínas efectoras se encuentran la ruptura de las uniones estrechas, destrucción de las microvellosidades, alteración en la absorción de iones y nutrimentos, procesos que en su conjunto conducen a la diarrea (Dean and Kenny, 2009; Garmendia *et al.*, 2005; Guttman and Finlay, 2008; Viswanathan *et al.*, 2009).

A la fecha, se conocen siete proteínas efectoras codificadas en el LEE que son: Tir, Map, EspB, EspF, EspG, EspH y EspZ (Dean and Kenny, 2009; Garmendia *et al.*, 2005), siendo estos efectores los más ampliamente estudiados funcionalmente. Sin embargo, en el proceso de patogénesis también intervienen otras proteínas efectoras codificadas fuera de la isla LEE, denominadas en su conjunto Nle's (**N**on-**L**ee-encoded **e**ffectors). Para algunas Nle's se ha demostrado su contribución en el proceso de patogénesis bacteriana, aunque dado que la mayoría de Nle's fueron identificadas recientemente se desconoce su función celular (Dean and Kenny, 2009). Sin embargo, la participación en virulencia de algunos de estos efectores como NleA, NleH1, NleH2, NleE2, NleE1 y EspJ está siendo estudiada (Dean and Kenny, 2009). Mediante análisis funcionales y bioinformáticos de la secuencia del genoma de EHEC O157:H7 se identificaron 39 proteínas efectoras (Tobe *et al.*, 2006), mientras que en el genoma de EPEC O127:H7 E2348/69 se identificaron 21 posibles efectores (Iguchi *et al.*, 2009). Una característica distintiva de estos efectores es que se encuentran codificados en profagos que están dispersos en el genoma bacteriano.

### **1.5.- Regulación de la isla de patogenicidad LEE**



La regulación de los genes de virulencia en respuesta a cambios ambientales es clave durante el proceso de patogénesis de prácticamente todas las bacterias. Su expresión inapropiada en tiempo y espacio, puede ser metabólicamente desventajoso para la bacteria; además de alertar al sistema de defensa al desplegar factores de virulencia antes de que la bacteria se encuentre en el sitio o nicho principal donde se favorece el proceso de colonización e infección (Clarke *et al.*, 2003; Mekalanos, 1992).

La regulación del LEE es compleja y en general es muy conservada en todos los miembros de la familia de patógenos A/E. Sus genes se expresan o se reprimen en respuesta a las condiciones fisiológicas y diferentes señales físico-químicas ambientales como el pH, temperatura, bicarbonato, sales de amonio, autoinductores, daño celular y estrés nutricional (Kenny *et al.*, 1997; Mellies *et al.*, 2007). Por otro lado, en la regulación interviene una compleja red de reguladores transcripcionales que modulan la expresión positiva o negativamente. Ha sido ampliamente documentado que Ler (“LEE-encoded regulator”), codificado por el primer gen del operón LEE1, es el principal regulador positivo del resto de los genes del LEE. Ler actúa como un anti-represor, aliviando el efecto negativo que ejerce el regulador global H-NS, el cual es el principal represor de toda la isla (Barba *et al.*, 2005; Bustamante *et al.*, 2001; Elliott *et al.*, 2000; Haack *et al.*, 2003; Mellies *et al.*, 1999; Sanchez-SanMartin *et al.*, 2001; Umanski *et al.*, 2002). Otros reportes han demostrado que Ler regula positiva y negativamente genes localizados fuera del LEE, algunos de ellos comunes con *E. coli* K12 comensal (Abe *et al.*, 2008; Shifrin *et al.*, 2008; Torres *et al.*, 2007). También hay evidencias

de que *Ler* actúa como un auto-represor dependiendo de su concentración (Berdichevsky *et al.*, 2005).

Además, se han identificado varios reguladores codificados fuera del LEE cuyo blanco principal es modular la expresión de *Ler* y, por tanto, la del resto de los genes del LEE. Uno de estos reguladores es la proteína PerC, que regula positivamente a *ler* y está codificada en el tercer gen del locus *perABC* del plásmido EAF presente en las cepas típicas de EPEC (Gomez-Duarte and Kaper, 1995; Mellies *et al.*, 1999; Porter *et al.*, 2004; Porter *et al.*, 2005). Recientemente, en el laboratorio se encontró que PerC regula la expresión de *ler* cuando la bacteria se crece en cultivos estáticos a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> (Bustamante *et al.*, sometido). También se ha documentado el efecto positivo de varios reguladores como IHF (*Integration Host Factor*) (Friedberg *et al.*, 1999); BipA, un regulador de la familia de GTPasas de unión al ribosoma (Grant *et al.*, 2003); Fis, una proteína asociada con el nucleoide (Goldberg *et al.*, 2001); y QseA, un activador vía censo del quórum (Sircili *et al.*, 2004), entre otros (Mellies *et al.*, 2007). En EHEC se identificó a los reguladores positivos homólogos a PerC a los que se denominó PchABC (Iyoda and Watanabe, 2004); así como también se ha demostrado el efecto negativo de los reguladores H-NS y Hha (Sharma and Zuerner, 2004; Umanski *et al.*, 2002).

Se ha demostrado que la expresión de los genes de virulencia de los patógenos A/E también se regula a nivel post-transcripcional. De acuerdo con esto en EPEC y EHEC se han identificado varios reguladores entre ellos el RNA no codificante DsrA de EHEC, el cual al ser sobre-expresado afecta positivamente la expresión de *ler* (Laaberki *et al.*, 2006). También se demostró que la proteína de

unión a RNA CsrA en EPEC regula negativamente la expresión del operón LEE4 uniéndose directamente al RNAm, mientras que su sobre-expresión afecta negativamente la expresión de los genes que codifican los reguladores positivos Ler y GrIA y por ende se reprime la expresión del resto de la isla (Bhatt *et al.*, 2009). Recientemente se encontró que Hfq una proteína de unión a RNA, regula negativamente la expresión del LEE, a través de modular la traducción del RNAm de *ler* (Shakhnovich *et al.*, 2009), mientras que otro reporte indica que en fase exponencial de crecimiento Hfq afecta la estabilidad del RNAm del operon *grlRA*, en el que se codifican los reguladores GrIR y GrIA, además en fase estacionaria Hfq regula negativamente la expresión del LEE de manera independiente de GrIR y GrIA (Hansen and Kaper, 2009).

## 2.- Antecedentes

En el 2004 Deng y colaboradores, encontraron que GrlA (Global regulador of LEE-activator), previamente nombrado Orf11, es necesario para la expresión de *ler* y, por tanto, para la expresión de los genes regulados por Ler. GrlA es funcionalmente equivalente entre los patógenos A/E, ya que GrlA de *C. rodentium* es capaz de complementar cepas de *C. rodentium*, EPEC y EHEC mutantes en *grlA* (Deng *et al.*, 2004).

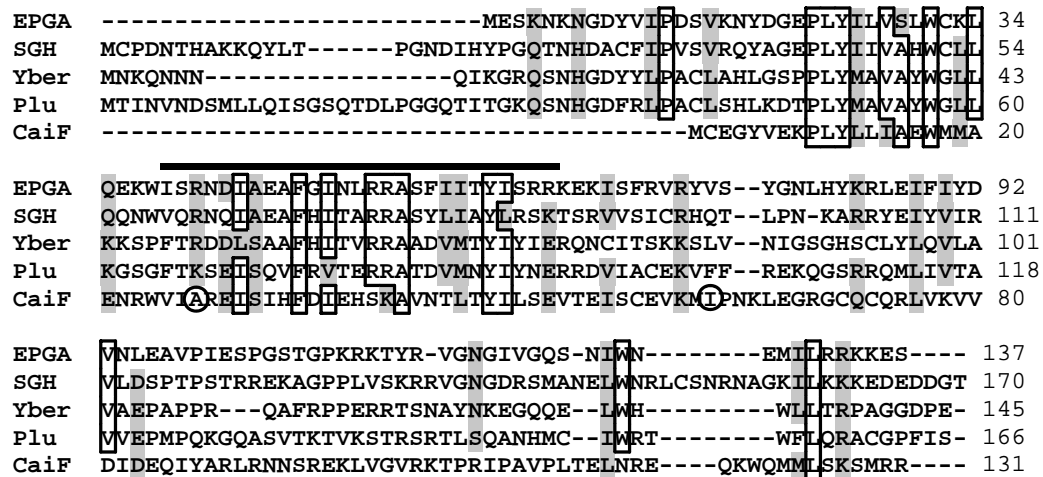
GrlA pertenece a una familia de proteínas no caracterizadas que se encuentra muy conservada dentro de los organismos que contienen la isla LEE (91 a 100% de identidad). Fuera de estas bacterias sólo se han encontrado genes que codifican para proteínas hipotéticas en unos cuantos organismos, tales como *Salmonella enterica* donde se encuentra el gen denominado *sgh* (*Salmonella* GrlA homologue, NP\_945169.1), el cual codifica para una proteína de 170 aminoácidos presente en prácticamente todas las serovariedades de *S. enterica*, con la que GrlA comparte 37% de identidad. También GrlA presenta 29% de identidad con una probable proteína de 145 aminoácidos de *Yersinia bercovieri* (Yber, ZP\_04627362.1), 25% de identidad con una proteína hipotética de 166 aminoácidos de *Photorhabdus luminicens* (Plu, NP\_927633.1) y 23% con CaiF (NP\_414576.4), la única proteína de esta familia que ha sido parcialmente caracterizada. CaiF está ampliamente distribuida en toda la familia *Enterobacteriaceae* y es el activador transcripcional de los operones *cai* y *fix* involucrados en la utilización de carnitina (Buchet *et al.*, 1998; Buchet *et al.*, 1999; Eichler *et al.*, 1996). De acuerdo al alineamiento múltiple de las secuencias de

aminoácidos de estas proteínas mediante Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), se puede observar que presentan mayor identidad principalmente en la mitad amino, en la que se encuentran varios aminoácidos conservados (**Figura 3**). Además, el análisis de la secuencia de aminoácidos de GrlA ha revelado que en esta región de la proteína se predice la presencia de un probable motivo de unión a DNA del tipo HTH (“Helix-Turn-Helix”), característico de proteínas de unión a DNA (Deng *et al.*, 2004) (**Figura 3**).

Además, se ha determinado que el producto del gen *grlR* (Global regulador of LEE-repressor), antes llamado *orf10*, regula negativamente la expresión del LEE cuando está presente en multicopia (Deng *et al.*, 2004)(Lara *et al.*, en preparación); sin embargo, su mecanismo molecular específico está aún siendo establecido. Esta observación también se confirmó en EHEC, donde GrlR ejerce un efecto negativo sobre la expresión de *ler* (Lio and Syu, 2004).

Con el propósito de definir la región de *ler* requerida por GrlA para activar su expresión, haciendo uso de fusiones transcripcionales de su región reguladora al gen reportero *cat*, se determinó que la región requerida para la activación de *ler* mediada por GrlA, está comprendida entre las posiciones -40 y +216 respecto al inicio de la transcripción en *C. rodentium* y de -50 al +217 en EPEC, ya que fusiones conteniendo estas regiones aún requieren de GrlA para su expresión (Barba *et al.*, 2005)(Bustamante *et al.*, sometido). También se encontró que *grlR* y *grlA* forman un operón que es regulado positivamente por Ler y negativamente por H-NS (Barba *et al.*, 2005), y que el efecto positivo de Ler es debido a que alivia la represión ejercida por el regulador negativo H-NS, ya que se ha demostrado que funciona como un anti-represor (Bustamante *et al.*, 2001). La observación de que

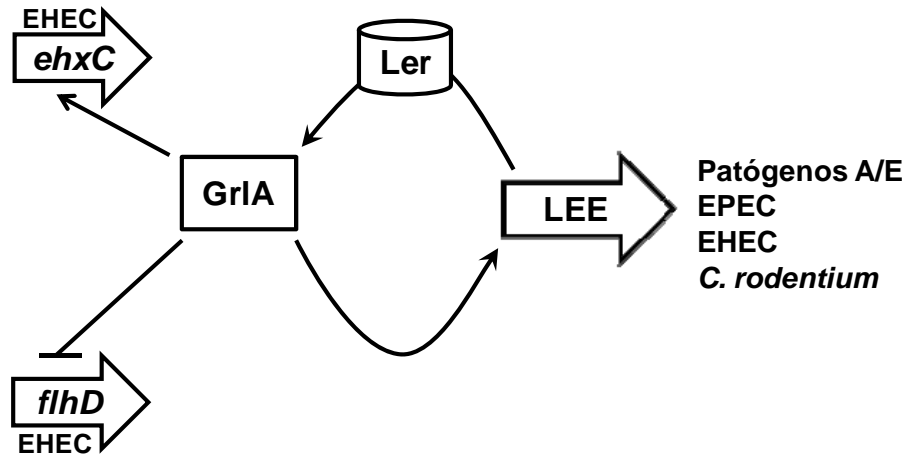
GrlA de *C. rodentium* se requiere para la expresión de *ler* y, a su vez, que *Ler* regula la expresión de *grlA*, permitió proponer que estos dos reguladores forman un circuito de regulación positiva (**Figura 4**) (Barba *et al.*, 2005). Sin embargo, no está claro aún cuál de los dos reguladores es el responsable de iniciar la expresión del circuito.



**Figura 3.** Alineamiento de la secuencia de GrlA y sus homólogos. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de GrlA de EPEC (EPGA), SGH de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 (NP\_945169.1), Yber de *Yersinia bercovieri* ATCC 43970 (ZP\_04627362.1), Plu de *Photobacterium luminescens* subespecie laumondii TTO1 (NP\_927633.1) y CaiF de *E. coli* MG1655 (NP\_414576.4) generado por Clustal W. Encerrados en recuadros se muestran los aminoácidos conservados en al menos cuatro secuencias y sombreados en gris los aminoácidos similares. La línea representa la región de GrlA en la que se predice el HTH.

Otros reportes indican que GrIA no solamente está involucrado en la regulación de genes codificados dentro del LEE. Se ha encontrado que GrIA de EHEC regula negativamente la expresión de los genes flagelares reprimiendo la expresión del operón *flhDC*, que codifica para el regulador maestro positivo de los genes flagelares (**Figura 4**) (Iyoda *et al.*, 2006), aunque el mecanismo por el que reprime dichos genes no es conocido a la fecha. Otro reporte indica que GrIA regula positivamente la expresión del operón *ehxCABD* del plásmido pO157 de EHEC, que codifica para una enterohemolisina, mediante un mecanismo aún desconocido (**Figura 4**). Sin embargo, estos genes son regulados negativamente por H-NS y aunque no pudieron detectar unión de GrIA-His<sub>6</sub> a su región reguladora, se propuso que GrIA puede estar contrarrestando el efecto represor de H-NS (Saitoh *et al.*, 2008).

Por otro lado, utilizando un sistema de dos híbridos de levaduras, se encontró que GrIR de EPEC forma homodímeros, así como heterodímeros con GrIA, interacción que también ha sido demostrada con GrIA de *C. rodentium* y EHEC mediante experimentos tipo “pull down” (Huang and Syu, 2008)(Lara *et al.*, en preparación). Sin embargo, la relevancia de esta interacción en la regulación del LEE no ha sido definida, pero se ha sugerido que GrIR a través de esta interacción proteína-proteína podría inactivar a GrIA, y por tanto reprimir la expresión de *ler* indirectamente (Huang and Syu, 2008; Iyoda *et al.*, 2006; Jobichen *et al.*, 2007). Aunque evidencias recientes obtenidas en nuestro laboratorio sugieren que el mecanismo de acción de GrIR es más complejo, ya que GrIR es capaz de reprimir la expresión de varios operones de la isla en ausencia de GrIA e incluso de H-NS, indicando que su papel como represor es



**Figura 4.** GrIA regula la expresión de genes dentro y fuera del LEE. Ler regula positivamente a *grIA* y el producto de este gen incrementa la expresión de *ler*. El incremento en la concentración de Ler permite la des-represión de los genes del LEE. Además, GrIA es capaz de inducir la expresión del operón *ehxCABD* que codifica una enterohemolisina localizada en el plásmido pO157 de EHEC. También modula negativamente la expresión de los genes flagelares reprimiendo la expresión del operón *flhDC* que codifica para el regulador flagelar central.

independiente de la interacción con GrIA (Lara *et al.*, en preparación).

A pesar de la relevancia que tiene GrIA en la regulación de *ler* y, por tanto, del resto de los genes de LEE, así como de *flhD* y *ehxCABD*, el mecanismo molecular por el cual GrIA activa o reprime la expresión de sus genes blanco no ha sido definido. El propósito de este trabajo es aportar información que nos permita definir el mecanismo por el cual GrIA promueve la transcripción de *ler*, definiendo regiones funcionales de la proteína, así como sus posibles interacciones con otras proteínas tales como la RNA polimerasa o GrIR. Para esto se plantean desarrollar los siguientes objetivos.



### **3.- Objetivos**

#### **3.1.- General:**

Estudiar la regulación de los genes que codifican para factores de virulencia de organismos enteropatógenos que desarrollan la lesión de Adherencia y Destrucción.

#### **3.2.- Particular:**

Caracterizar funcionalmente a la proteína GrIA, un regulador positivo específico de genes de virulencia de EPEC.

#### **3.3.- Específicos:**

**3.3.1.-** Identificar residuos y regiones discretas importantes para la función de GrIA.

**3.3.2.-** Analizar la interacción de GrIA con la región reguladora de *Ier*.

**3.3.3.-** Caracterizar la interacción de GrIA con el regulador negativo GrIR.

## **4.- Materiales y métodos**

### **4.1.- Cepas, medios de cultivo y plásmidos usados en este trabajo**

Las características principales de las cepas y plásmidos usados en este trabajo se describen en la **Tabla 1**. Los medios de cultivo usados para el crecimiento de las bacterias fueron: medio líquido LB (Luria-Bertani; NaCl 10 g/l, peptona de caseína 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l); agar LB, al medio líquido LB se adicionaron 15 g/l de agar y; medio DMEM (GIBCO, Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado con 160  $\mu$ l/l de piridoxal (25 mg/ml) y 3.7 g/l de bicarbonato de sodio. Los antibióticos cuando fueron requeridos se usaron en las siguientes concentraciones para los cultivos bacterianos crecidos en LB: Ampicilina 200  $\mu$ g/ml; Kanamicina 25  $\mu$ g/ml; Tetraciclina 12  $\mu$ g/ml; Estreptomina 100  $\mu$ g/ml. Para los cultivos crecidos en DMEM se usó la mitad de la concentración usada en LB.

### **4.2.- Manipulaciones de DNA**

Las manipulaciones de DNA se hicieron de acuerdo a protocolos estándar (Sambrook and Russell, 2001). Las enzimas de restricción y ligasa fueron obtenidas de Invitrogen y usadas de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los oligonucleótidos usados en este trabajo se sintetizaron en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología/UNAM. La secuencia de los oligonucleótidos y algunas características relevantes se enlistan en la **Tabla 2**. La purificación de DNA plasmídico se hizo con el estuche comercial de Roche con las instrucciones del fabricante.

#### 4.3.- Construcción de mutantes de *GrlA*

Las mutaciones puntuales de *GrlA* se generaron mediante PCR sobrelapado (Ho *et al.*, 1989), como se describe a continuación. Para cada mutación se diseñó un par de oligonucleótidos complementarios en los que se insertaron cambios en el codón deseado para sustituirlo por el codón que codifica para Alanina. Con estos oligonucleótidos y usando como templado al plásmido pTEPGrlA1 (**Tabla 1**) se hicieron amplificaciones por reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Una primera ronda de PCR se hizo con los oligonucleótidos PMPMT3 FW que flanquea a *grlA* y cada uno de los oligonucleótidos mutagénicos directos (FW), a los productos resultantes se les denominó PCRs directos. De igual forma se hizo con los oligonucleótidos PMPMT3 RV y cada uno de los oligonucleótidos mutagénicos reversos (RV), generando los productos de PCR reversos. Los fragmentos de DNA de cada reacción se purificaron a partir de un gel de agarosa con el estuche de purificación comercial de Axygen siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificados se mezclaron cantidades iguales de cada uno de ellos y las mezclas se usaron como molde para una segunda ronda de PCR con los oligonucleótidos EPGAXhoIF y EPCiorf11H3R, los cuales amplifican al gen *grlA* incluyendo la región intergénica con *grlR* e insertan los sitios de restricción XhoI y HindIII, respectivamente. Los fragmentos de DNA de estas reacciones se purificaron como se mencionó anteriormente y posteriormente se digirieron con las enzimas de restricción XhoI y HindIII para ser ligados en el plásmido pMPM-T3 (Mayer, 1995) digerido con las mismas enzimas. De esta forma se generaron los plásmidos derivados de pTEPGrlA1 silvestre, y pTEPGrlA1 con las siguientes mutaciones; P23A, L24A, Y25A, W31A, N42A, I44A, E46A,

F48A, I50A, L52A, R54A, S56A, I44S, F48S, I50S y R54S. La integridad de *grlA*, así como la presencia de la mutación deseada, se verificó por secuenciación de DNA en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

La construcción de las eliminaciones sistemáticas de *grlA* se hizo por PCR sobrelapado como se describió para las mutaciones puntuales, excepto la primera y la última. Además la segunda ronda de PCR se hizo con los oligonucleótidos XhxbgrlAF-HigrIAR, los cuales contienen sitios de corte para XhoI-XbaI y HindIII, respectivamente. La eliminación GrIA/ $\Delta$ E2-D20 se construyó con los oligonucleótidos 1-20delgrlAF y HigrIAR, el oligo 1-20delgrlAF tiene un sitio de restricción para XhoI y un codón de inicio (ATG) seguido del codón 21 de *grlA*. Mientras que para la eliminación GrIA/ $\Delta$ G121-S137 se utilizaron los oligonucleótidos XhxbgrlAF y 121-137delgrIAR, éste último diseñado con un codón de paro en el codón 121 de *grlA* seguido por un sitio de restricción para HindIII. Los fragmentos de DNA resultantes se purificaron y digirieron para ser ligados en el plásmido pMPM-T3. A partir de los plásmidos resultantes pTEPGrIA1/ $\Delta$ 2-20, pTEPGrIA1/ $\Delta$ 21-40, pTEPGrIA1/ $\Delta$ 41-60, pTEPGrIA1/ $\Delta$ 61-80, pTEPGrIA1/ $\Delta$ 81-100, pTEPGrIA1/ $\Delta$ 101-120 y pTEPGrIA1/ $\Delta$ 121-137, se verificó la eliminación deseada por secuenciación.

#### **4.4.- Generación de las fusiones a MBP**

Para la generación de los plásmidos que expresan las proteínas de fusión MBP-GrIA silvestre y MBP-GrIA mutantes, el gen *grlA* silvestre, así como sus mutantes puntuales se amplificaron por PCR usando como molde DNA del plásmido pTEPGrIA1 y de sus derivados portando las diferentes mutaciones y los

oligonucleótidos MBPCrgrIAF y EPCiOrf11H3R, los cuales amplifican la región codificante de *grIA* e insertan sitios de restricción para XbaI y HindIII. Las construcciones que expresan a MBP-GrIA con las eliminaciones se generaron subclonando el fragmento XbaI-HindIII, obtenido a partir de los plásmidos pTEPGrIA1/Δ2-20, pTEPGrIA1/Δ21-40, pTEPGrIA1/Δ41-60, pTEPGrIA1/Δ61-80, pTEPGrIA1/Δ81-100, pTEPGrIA1/Δ101-120 y pTEPGrIA1/Δ121-137, en el plásmido pMAL-c2X (Biolabs) cortado con las mismas enzimas y en fase con el extremo 3' del gen *malE*. Para la construcción de los plásmidos pMBP-GrIA70, pMBP-GrIA80 y pMBP-GrIA100, el gen *grIA* se amplificó parcialmente a partir del plásmido pTEPGrIA1 con el oligonucleótido directo MBPCrgrIAF y los oligonucleótidos reversos EPGA-S70PstRV, EPGA-N80RV y EPGA-I100RV, respectivamente. Los productos de PCR se purificaron y digirieron con las enzimas XbaI y PstI para *grIA70*; XbaI y HindIII para *grIA80* y *grIA100* y ligados al pMAL-c2X. El gen *grIA* de estas construcciones se secuenció para comprobar que se conservara el marco de lectura entre *malE* y *grIA*, así como la presencia de la mutación y la integridad de *grIA*.

#### **4.5.- Purificación de MBP-GrIA**

Para la purificación de MBP-GrIA silvestre y algunas de sus versiones mutantes, los plásmidos pMBP-GrIA silvestre, pMBP-GrIA/L24A, pMBP-GrIA/Y25A, pMBP-GrIA/W31A, pMBP-GrIA/I44A, pMBP-GrIA/F48A, pMBP-GrIA/I50A y pMBP-GrIA/R54A se transformaron en *E. coli* BL21. Para la sobre-expresión de las proteínas recombinantes las bacterias se cultivaron en 100 ml de medio LB adicionado con 0.2% de glucosa y 200 µg/ml de ampicilina, e incubadas

a 37°C con agitación hasta una densidad óptica ( $DO_{600}$ ) de 1.0. En este punto se inició la inducción de las proteínas adicionando al medio de cultivo 0.3 mM de IPTG (Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido) y se continuó el crecimiento por 4 horas más. Posteriormente, las células se colectaron por centrifugación a 8000 rpm/10 min/4°C, las pastillas celulares se lavaron con 30 ml de amortiguador de columna (20 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 1mM EDTA, 10 mM 2-Mercaptoetanol), las células obtenidas se resuspendieron en 10 ml de amortiguador de columna y se hicieron alícuotas de 1 ml para sonicarse por 10 min con pulsos de sonicación de 9.9 seg y descansos de 5 seg. Los restos celulares se separaron por centrifugación a 13000 rpm/10min/4°C, el sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo. En una columna desechable de 15 ml se empacaron 2 ml de resina de Amilosa (Biolabs), se lavó con 40 ml de agua mQ estéril y después se equilibró con 30 ml de amortiguador de columna. Se adicionaron los extractos conteniendo las proteínas fusionadas a MBP y las proteínas unidas inespecíficamente se lavaron con 100 ml de amortiguador de columna. Finalmente las proteínas unidas a la resina se eluyeron con amortiguador de columna adicionado con 10 mM de maltosa y se colectaron fracciones de 1 ml a las cuales se adicionó 10% de glicerol. Las fracciones colectadas se separaron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12% para determinar las fracciones que contenían la proteína purificada, así como para estimar su grado de pureza. Finalmente, a partir de las fracciones seleccionadas se cuantificó la concentración de proteína por el método de Bradford usando el estuche comercial Quick Start Bradford Protein Assay (Bio-Rad).

#### 4.6.- Ensayos de retardamiento en gel de la movilidad electroforética (EMSAs)

Una vez que se obtuvieron las proteínas purificadas y cuantificadas se analizó su capacidad para unirse a la región reguladora de *ler* mediante ensayos de retardamiento de la movilidad electroforética (EMSAs, por sus siglas en ingles). Fragmentos de DNA de la región reguladora de *ler*, que abarcan de las posiciones -260 a +217 (*ler*-260/+217), -260/-50 (*ler*-260/-50), -50/+217 (*ler*-50/+217), así como de un segmento de la región codificante del gen *dnaJ*, se amplificaron por PCR a partir de la fusión *pler*-260 (*ler*-*cat*) (**Tabla 1**) y del DNA cromosomal de EPEC. Aproximadamente 100 ng de cada uno de los fragmentos se incubaron con concentraciones crecientes de las proteínas purificadas en amortiguador de unión (10 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM KCl, 1 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 10 µg/ml de BSA y 5% glicerol). La interacción se hizo a temperatura ambiente por 20 minutos y posteriormente los complejos DNA-proteína se separaron en un gel de poliacrilamida al 5% en amortiguador de corrida Tris-Boratos-EDTA 0.5X. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio 0.5 µg/ml y se visualizó en un transiluminador con luz UV de onda corta (AlphaImager-Alpha Innotech Corp.).

Para la interacción de H-NS con la región reguladora de *ler*, la proteína H-NS etiquetada en el C-terminal con un triple epítotope de FLAG y seis histidinas (H-NS-FLAGHis<sub>6</sub>) expresada bajo el control de un promotor inducible por arabinosa (Bustamante *et al.*, datos no publicados) se purificó como se describe en (De la Cruz *et al.*, 2007). Los fragmentos *ler*-260/-50 y *ler*-50/+217 se incubaron con concentraciones crecientes de H-NS-FLAGHis<sub>6</sub> purificada en amortiguador de

unión (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 75 mM NaCl, 10 mM 2-mercaptoetanol, 1 mM DTT y 6.5% de Glicerol). La separación y visualización de los complejos se hizo como se describe arriba.

Para los EMSAs competitivos, primero 100 ng de ler-50/+217 se incubaron con una concentración constante de 0.45  $\mu$ M de H-NS-FLAGHis<sub>6</sub> por 15 min a temperatura ambiente en amortiguador de unión usado en los EMSAs de H-NS. Posteriormente, a la mezcla se adicionaron concentraciones crecientes de MBP-GrlA y se dejaron 15 minutos más a temperatura ambiente. Las mezclas se separaron en un gel de poliacrilamida al 5% y visualizó como se describe arriba.

#### **4.7.- Ensayo de CAT**

La actividad específica de CAT (Cloranfenicol Acetil Transferasa) se cuantificó como se reportó previamente (Martinez-Laguna *et al.*, 1999). Para esto los cultivos bacterianos deseados se cultivaron en matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de DMEM suplementados con 1% de LB o en 50 ml de LB y los antibióticos correspondientes. Se crecieron a 37°C en agitación hasta una DO<sub>600</sub> de 1 o sin agitación (cultivo estático) por 6 horas y en este punto se colectó 1 ml de cada cultivo. Se centrifugaron a 13 000 rpm/5 min a temperatura ambiente, la pastilla celular se lavó con 1 ml de TDTT (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.03 mM 1,4-Ditiotreitol), posteriormente se resuspendieron en 1 ml de TDTT y se sonicaron por 3 minutos con pulsos de 9.9 seg y descansos de 5 seg. Los restos celulares se separaron por centrifugación a 13000 rpm/4°C/10 min.



Para la determinación de la concentración de proteína se colocaron 10  $\mu$ l por duplicado en una placa de Elisa de 96 pozos, se agregaron 200  $\mu$ l de la mezcla de reacción (25 ml solución A y 0.5 ml solución B) del estuche comercial BCA (Pierce), la placa se incubó a 37°C por 30 minutos y posteriormente se midió la absorbancia a 562 nm en un lector automatizado para placas de ELISA modelo CERES 900C con el paquete computacional KC3 jr.

La cuantificación de la actividad enzimática de CAT se determinó de la siguiente manera: Se colocaron 5  $\mu$ l de cada muestra por duplicado en una placa de Elisa de 96 pozos. Se adicionaron 200  $\mu$ l de la mezcla de reacción [100 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM DTNB (5,5-ditio-bis-(2-ácido nitrobenzoico)), 0.1 M Acetil coenzima A, 0.1 M, cloranfenicol]. La cinética de actividad se determinó a una absorbancia de 410 nm con lecturas cada 5 segundos durante 5 minutos, utilizando el paquete computacional KC3 jr en el CERES 900C. La actividad específica de CAT se determinó dividiendo la actividad enzimática de CAT entre la concentración de proteína de cada muestra.

#### **4.8.- Ensayos de “Pull down”**

La interacción entre GST-GrlR y MBP-GrlA silvestre y las versiones de MBP-GrlA/mutante se analizó mediante experimentos tipo “pull down” como se describe a continuación. Se usó la proteína recombinante GST-GrlR, GrlR fusionada a GST (Glutación-S-transferasa), expresada a partir del plásmido pGEX-4T1 bajo el control de un promotor inducible por IPTG. Los plásmidos pGEX-4T1, pGST-GrlR, pMBP-GrlA silvestre y pMBP-GrlA/mutante se transformaron en *E. coli*

BL21. Para la inducción de las proteínas, las bacterias se cultivaron en 50 ml de LB adicionado con 0.2% de glucosa, se crecieron hasta un  $DO_{600}$  de 0.6 y en este punto los cultivos se indujeron con 0.5 mM de IPTG para los plásmidos derivados de pGEX-4T1 y 0.3 mM para los plásmidos derivados de pMAL-c2X. Se continuó el crecimiento por 4 hrs más. De los cultivos anteriores se colectaron las células por centrifugación a 8000 rpm/8min/4°C, las pastillas celulares se lavaron con 20 ml de PBS 1X (137 mM NaCl, 2.7mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), finalmente las células se resuspendieron en 4 ml de PBS 1X y se sonicaron por 10 min con pulsos de sonicación de 9.9 seg y descansos de 5 seg.

500 µl de resina de Glutation Sefarosa 4B (Amersham) se centrifugaron a 6000 rpm/4°C/1 min y el sobrenadante se descartó, la resina se lavó 4 veces con 1 ml de PBS 1X. A tubos con 50 µl de resina Glutation Sefarosa previamente lavada se adicionaron 400 µl del extracto de BL21 GST-GrlR y a uno de ellos 150 µl del extracto conteniendo a GST, la interacción se dejó 1 hr/4°C con agitación. Posteriormente, se centrifugaron a 6000 rpm/4°C/1 min y se lavaron 5 veces con 1 ml de PBS 1X frío para remover las proteínas unidas inespecíficamente. Al complejo resina-GST y a uno de resina-GST-GrlR se adicionaron 800 µl del extracto de BL21 con MBP-GrlA silvestre, mientras que al resto de los tubos con resina-GST-GrlR se adicionaron 800 µl de los extractos de MBP-GrlA/mutante. La interacción se dejó por 2 hrs/4°C con agitación, transcurrido este tiempo las proteínas unidas inespecíficamente se eliminaron lavando 5 veces con PBS 1X frío. Los complejos proteicos resultantes se separaron en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes y teñió con azul de Coomassie.

#### **4.9.- Construcción de las mutantes EPEC $\Delta grlA$ y EPEC $\Delta grlA\Delta hns$**

La mutante de EPEC en *grlA* (EPEC  $\Delta grlA$ ) se generó a partir de EPEC silvestre (cepa E2348/69) por el método de intercambio alélico basado en el uso de un vector suicida portando el gen *sacB* y una eliminación del gen *grlA* de EPEC como se describió previamente (Deng *et al.*, 2004). La doble mutante EPEC  $\Delta grlA\Delta hns$  se generó a partir de la mutante sencilla de EPEC  $\Delta grlA$  mediante el método de mutagénesis en un solo paso con el sistema de recombinasa del fago lambda red (Datsenko and Wanner, 2000) como se describe a continuación. La técnica consiste en reemplazar la secuencia de interés por un casete de resistencia a kanamicina utilizando un fragmento de PCR que contiene el gen de resistencia flanqueado por secuencias homólogas (alrededor de 50 pb) al gen que se va interrumpir. Los oligonucleótidos Ehns H1P1 y EhnsH2P2 se usaron para generar el producto de PCR conteniendo el casete con el gen de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4 (Datsenko and Wanner, 2000). EPEC  $\Delta grlA$  se transformó con el plásmido termosensible pKD46 (Datsenko and Wanner, 2000), el cual lleva el gen de la recombinasa red del fago  $\lambda$  bajo el control de un promotor inducible por arabinosa y que confiere resistencia a ampicilina. A partir de EPEC  $\Delta grlA$  (pKD46) se prepararon células electrocompetentes y se transformaron con el producto de PCR descrito anteriormente. La selección de posibles mutantes se hizo sembrando las transformantes en agar LB adicionado con kanamicina a 42°C, temperatura a la cual se elimina el plásmido termosensible pKD46. Las cepas que perdieron el pKD46 entre las posibles mutantes se seleccionaron por su sensibilidad a ampicilina mediante sembrado en

réplica en presencia o ausencia del antibiótico. De las candidatas se extrajo DNA cromosomal para determinar por PCR la eliminación de H-NS con los oligos EhnsF/K1 y EhnsR/K2.

#### **4.10.- Perfil de proteínas secretadas**

Para el ensayo de secreción de proteínas efectoras dependiente del SST3 por EPEC, los cultivos bacterianos se crecieron toda la noche a 37°C con agitación en 5 ml de LB con los antibióticos correspondientes, al día siguiente se diluyeron 1:100 en 50 ml de DMEM suplementado con 1% de LB y crecidos a 37°C en agitación hasta una DO<sub>600</sub> de 1. En este punto se tomó 1.5 ml de cada cultivo y se centrifugaron a 13000 rpm/5 min. A partir de 1.3 ml de sobrenadante se precipitaron las proteínas secretadas con 10% de ácido tricloroacético a 4°C toda la noche y se colectaron por centrifugación a 14000 rpm/30 min a temperatura ambiente. Las proteínas precipitadas se suspendieron en amortiguador de carga de proteínas, separadas en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 12% y teñidas con una solución de azul brillante de Coomassie.

#### **4.11.- Dominancia negativa**

Para el ensayo de dominancia negativa se utilizó una proteína derivada de H-NS que tiene una mutación puntual en la Glicina 113 por Ácido Glutámico en el dominio de unión a DNA. Este cambio hace que H-NS pierda su capacidad de unirse al DNA pero conserva la propiedad de formar dímeros con la proteína silvestre inactivándola (Ueguchi *et al.*, 1996). La expresión de la mutante H-NS<sup>G113D</sup> se encuentra bajo el control de un promotor inducible por L-(+)-arabinosa

en el plásmido pT6-HNS/G113D, derivado del pMPM-T6 (Bustamante *et al.*, datos no publicados). EPEC WT, EPEC  $\Delta ler$  y EPEC  $\Delta grlA$  transformadas con la fusión *ler-cat* y el plásmido pT6-HNS/G113D se crecieron toda la noche en 5 ml de LB, al día siguiente cada uno de los cultivos se diluyó 1:100 en 50 ml de DMEM suplementado con 1% de LB por duplicado, a uno de los matraces se le adicionó 0.2% de L-(+)-arabinosa (cultivo inducido). Se dejaron crecer a 37°C en agitación hasta que alcanzaron una  $DO_{600}$  de 1.0, en este punto se tomó 1.5 ml de cada cultivo y se centrifugó a 13000 rpm por 5 min. A 1.3 ml de sobrenadante se adicionó 10% de Ácido tricloroacético para precipitar las proteínas secretadas (EspA, EspB y EspD) y a partir de la pastilla celular se analizó la expresión de la fusión transcripcional *ler-cat*, así como la expresión de otros genes del LEE mediante la determinación por “Western blot” de la producción de las proteínas Tir, EspA, EscJ y como control de carga de la proteína DnaK.

#### **4.12.- Inmunodetección de proteínas por “Western blot”**

Las proteínas a analizar se separaron en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 12% usando como amortiguador de corrida Tris-Glicina-SDS (25 mM Tris-HCl, 250 mM Glicina, 0.1% SDS). A partir del gel de poliacrilamida las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore) en una cámara de transferencia semi-seca (Biorad) usando amortiguador de transferencia (48 mM Tris, 39 mM Glicina, 20% metanol, 0.0375% SDS) por 1 hr a 15 V, después la membrana se bloqueó con leche sin grasa al 5% en PBST (PBS 1X, 0.03% Tween 20) por una hora. Posteriormente, la membrana se incubó por 4 hrs con cualquiera de los siguientes anticuerpos

primarios diluidos 1:10000 en PBST; anti-Tir monoclonal (donado por el Dr. BB. Finlay, University of British Columbia), anti-EspA policlonal (donado por el Dr. J. Kaper, University of Maryland), anti-EscJ policlonal (donado por la Dra. B. González, UNAM), anti-DnaK monoclonal (Invitrogen) y monoclonal anti-MBP (Biolabs). Posteriormente, se adicionaron los anticuerpos secundarios anti-conejo (Pierce) y anti-ratón (Pierce) a una dilución de 1:10000 cada uno. Las señales positivas se visualizaron con el estuche comercial Western Lightning Chemiluminiscense Reagent Plus (Perkin Elmer) y reveladas en una placa fotográfica Kodak-Omat-LS-film.

#### **4.13.- Far western**

Para analizar la interacción entre GrIA y la RNA polimerasa (RNAP) pura de *E. coli* se hicieron experimentos tipo far western, para esto se utilizó la proteína GrIA-MycHis<sub>6</sub> parcialmente purificada como se describe a continuación. GrIA-MycHis<sub>6</sub> se sobre-expresó con 0.2% de arabinosa a partir del plásmido pBAD-grIA en *E. coli* BL21, se purificó parcialmente por afinidad a níquel (Ni-NTA agarosa, Quiagen) en condiciones nativas usando como amortiguador de unión (50 mM de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O pH 8, 300 mM NaCl y 10 mM imidazol). Las proteínas unidas inespecíficamente se removieron por lavados con el mismo amortiguador y concentraciones crecientes de imidazol, finalmente las proteínas se eluyeron con amortiguador de unión adicionado de 300 mM de imidazol y visualizaron en SDS-PAGE. Las fracciones enriquecidas con GrIA-MycHis<sub>6</sub> se dializaron en PBS con 10% de glicerol. Para la interacción proteína-proteína GrIA-MycHis<sub>6</sub>, la RNAP, GST-GrIR y MBP-GrIA se separaron en un gel de poliacrilamida al 12% en

condiciones desnaturizantes y posteriormente se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, la cual se bloqueó con leche sin grasa al 5% en PBST. Después se adicionó GrIA-MycHis<sub>6</sub> (100 ng aproximadamente en PBS 1X) y se dejó interactuar toda la noche a 4°C, posteriormente se adicionó el anticuerpo monoclonal anti-Myc (Sigma), se dejó interactuar por 2 horas a temperatura ambiente, se lavó tres veces con PBS 1X y se adicionó el anticuerpo secundario por una hora. Las señales positivas se visualizaron con el estuche comercial Western Lightning Chemiluminiscense Reagent Plus (Perkin Elmer) y reveladas en una placa fotográfica Kodak-Omat-LS-film.





|                     |  |                                     |
|---------------------|--|-------------------------------------|
| pTEPGriA1/ Δ41-60   | Derivado de pTEPGriA1 que expresa a GriA/ΔR41-T60  | Este estudio                        |
| pTEPGriA1/ Δ61-80   | Derivado de pTEPGriA1 que expresa a GriA/ΔY61-N80  | Este estudio                        |
| pTEPGriA1/ Δ81-100  | Derivado de pTEPGriA1 que expresa a GriA/ΔL81-I100   | Este estudio                        |
| pTEPGriA1/ Δ101-120 | Derivado de pTEPGriA1 que expresa a GriA/ΔE101-V120  | Este estudio                        |
| pTEPGriA1/ Δ121-137 | Derivado de pTEPGriA1 que expresa a GriA/ΔG121-S137  | Este estudio                        |
| pGEX-4T1            | Vector de clonación para construir fusiones a GST; Ap <sup>r</sup>   | Amersham Biosciences                |
| pGST-GriR           | Derivado de pGEX-4T1 que expresa GST-GriR bajo el control del promotor P <sub>tac</sub> inducible por IPTG   | Lara <i>et al.</i> , en preparación |
| pMAL-c2X            | Vector de clonación para construir fusiones a MBP; Ap <sup>r</sup>   | New England Biolabs                 |
| pMBP-GriA           | Derivado de pMAL-c2X que expresa a MBP-GriA bajo el control del promotor P <sub>tac</sub> inducible por IPTG | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/P23A      | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/P23A  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/L24A      | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/L24A  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/Y25A      | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/Y25A  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/W31A      | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/W31A  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/N42A      | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/N42A  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/I44A      | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/I44A  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/I44S      | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/I44S  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/E46A      | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/E46A  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/F48A      | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/F48A  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/F48S      | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/F48S  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/I50A      | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/I50A  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/I50S      | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/I50S  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/L52A      | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/L52A  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/R54A      | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/R54A  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/R54S      | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/R54S  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/S56A      | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/S56A  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/ Δ2-20    | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/ΔE2-D20   | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/ Δ21-40   | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/ΔG21-S40  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/ Δ41-60   | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/ΔR41-T60  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/ Δ61-80   | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/ΔY61-N80  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/ Δ81-100  | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/ΔL81-I100   | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/ Δ101-120 | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/ΔE101-V120  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA/ Δ121-137 | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA/ΔG121-S137  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA70         | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA1-70   | Este estudio                        |
| pMBP-GriA80         | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA 1-80  | Este estudio                        |
| pMBP-GriA100        | Derivado de pMBP-GriA que expresa a GriA 1-100   | Este estudio                        |

**Tabla 2.** Lista de oligonucleótidos utilizados en este estudio

| Oligonucleótido | Secuencia*                             |
|-----------------|--|
| ler260F         | CTCCTGGggatccACTCGCT                   |
| Orf1-H3-R       | GCTCTATAagcttAATGTATG                  |
| ler50BHIFW      | ATCATggatccTAAATGGATTTTAAAAA           |
| ler-50 RV       | AAATCCATTTAAAATCAATG                   |
| dnaJ FW         | GGCGGCGGTTTTGGCGGCGGC                  |
| dnaJ RV         | AGTCTGCGGCTGTGTACCTGG                  |
| EPCiOrf11R      | TACTAAGAAagcttCGTCTAACTCTCC            |
| EPGA-XI         | GCCAAATTTctcgagCCATTAATTAT             |
| MBPCrgrlAF      | ATAAAAAGAACAAtctagaATGGAATCTAAA        |
| EPAP23A-F       | ACGATGGTGAAGCTCTGTATATCTTGG            |
| EPAP23A-R       | CCAAGATATACAGAGcTTCACCATCGT            |
| EPAL24A-F       | CGATGGTGAACCTgcGTATATCTTGGTT           |
| EPAL24A-R       | AACCAAGATATACgcAGGTTACCATCG            |
| EPAY25A-F       | GGTGAACCTCTGgcTATCTTGGTTTCTC           |
| EPAY25A-R       | GAGAAACCAAGATAgcCAGAGGTTACCC           |
| EPAW31A-F       | CTTGGTTTCTCTTgcGTGTAAATTGCAGG          |
| EPAW31A-R       | CCTGCAATTTACACGgcAAGAGAAACCAAG         |
| EPAN42A-F       | TGGATTTCTCGCgcTGATATTGCCGAAG           |
| EPAN42A-R       | CTTCGGCAATATCAgcGCGAGAAATCCA           |
| EPAI44A-F       | TCTCGCAATGATgcTGCCGAAGCATTCC           |
| EPAI44A-R       | GAATGCTTCGGCgcATCATTGCGAGA             |
| EPAI44S-F       | TCTCGCAATGATAgcGCCGAAGCATTCC           |
| EPAI44S-R       | GAATGCTTCGGCgcTATCATTGCGAGA            |
| EPAE46A-F       | GCAATGATATTGCCgcAGCATTCCGGTATA         |
| EPAE46A-R       | TATACCGAATGCTgcGGCAATATCATTGC          |
| EPAF48A-F       | ATTGCCGAAGCAgcCGGTATAAACCTG            |
| EPAF48A-R       | CAGGTTTATACCGgcTGCTTCGGCAAT            |
| EPAF48S-F       | ATTGCCGAAGCAagCGGTATAAACCTG            |
| EPAF48S-R       | CAGGTTTATACCGctTGCTTCGGCAAT            |
| EPAI50A-F       | GAAGCATTCCGGTgcAAACCTGAGGAGA           |
| EPAI50A-R       | TCTCCTCAGGTTTgcACCGAATGCTTC            |
| EPAI50S-F       | GAAGCATTCCGGTAgcAACCTGAGGAGA           |
| EPAI50S-R       | TCTCCTCAGGTTgcTACCGAATGCTTC            |
| EPAL52A-F       | TTCGGTATAAACgcGAGGAGAGCATCA            |
| EPAL52A-R       | TGATGCTCTCCTCgcGTTTATACCGAA            |
| EPAR54A-F       | ATAAACCTGAGGgcAGCATCATTTATT            |
| EPAR54A-R       | AATAAATGATGCTgcCCTCAGGTTTAT            |
| EPAR54S-F       | ATAAACCTGAGGagcGCATCATTTATT            |
| EPAR54S-R       | AATAAATGATGCgctCCTCAGGTTTAT            |
| EPAS56A-F       | CCTGAGGAGAGCAgcATTTATTATAAC            |
| EPAS56A-R       | GTTATAATAAATgcTGCTCTCCTCAGG            |
| XhxbgrlAF       | CGCGGctcgagGAGGAtctagaATGGAATCTAAAA    |
| HigrIAR         | ACCCGGGgaagcttCGTCTAACTCTCCTT          |
| 1-20delgrlAF    | CGCGGctcgagGAGGAtctagaATGGGTGAACCTCTGT |
| 21-40delgrlAF   | GAATTACGATCGCAATGATATTGCCGAAGC         |
| 21-40delgrlAR   | TATCATTGCGATCGTAATTTACTGAGT            |
| 41-60delgrlAF   | ATGGATTTCTTATATATCGAGAAGAAAAGA         |

|                 |  |
|-----------------|--|
| 41-60delgrIAR   | TCGATATATAAGAAATCCATTTCTCCTGCA                                 |
| 61-80delgrIAF   | TATTATAACTTTGCATTATAAGCGCCTTGA                                 |
| 61-80delgrIAR   | TATAATGCAAAGTTATAATAAATGATGC                                   |
| 81-100delgrIAF  | TTATGGTAATGAAAGTCCTGGATCAACCGG                                 |
| 81-100delgrIAR  | CAGGACTTTCATTACCATAACTAACATATC                                 |
| 101-120delgrIAF | GGTCCGATAGGACAGTCTAATATCTGGAA                                  |
| 101-120delgrIAR | TAGACTGTCCTATCGGAACCGCCTCAAGGT                                 |
| 121-137delgrIAR | CCCGGgaagcttCTACACAATACCATTA                                   |
| EPGA-S70PstRV   | TCTGACctgcagTGAAATTTTTCTTT                                     |
| EPGA-N80RV      | CGCTTaagcttAAATTACCATAACTAACA                                  |
| EPGA-I100RV     | GATCCaagcttTTCTATCGGAACCGCCTCA                                 |
| PMPM3 FW1       | GTGCCGTAAAGCACTAAATCGG   |
| PMPM3 RV1       | GCGTTATCCCCTGATTCTGTGG   |
| Ehns H1P1       | CACCCAATATAAGTTTGAGATTACTACAATGAGCGAAGCtntag<br>gctggagctgctcg |
| Ehns H2P2       | GATTTTAAGCAAGTGCAATCTACAAAAGATTATTGCTTcatatgaat<br>atcctccttag |

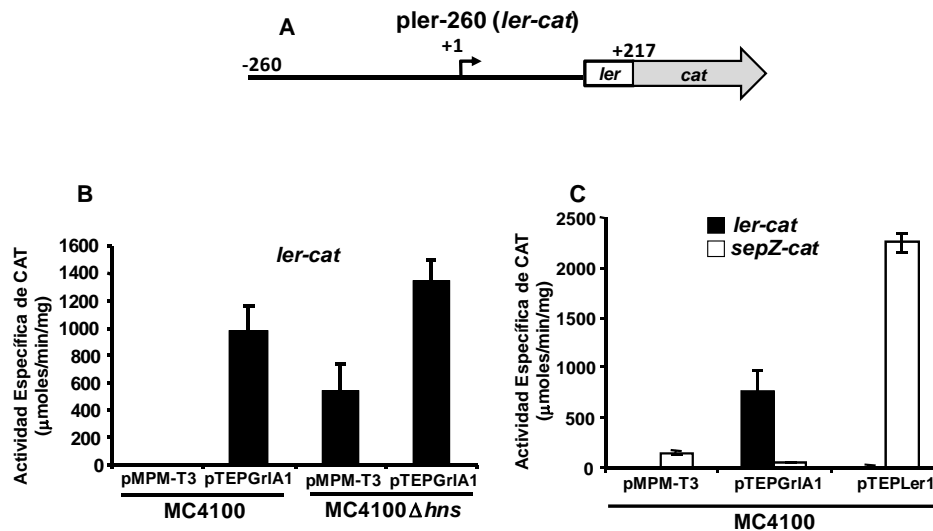
\*En minúsculas se indican los cambios respecto a la secuencia silvestre

## 5.- Resultados

### 5.1.- GrIA sólo activa la expresión de *ler*

Previamente se demostró que GrIA de EPEC, EHEC y *C. rodentium* es muy importante para la expresión de los genes de virulencia codificados en el LEE y se encontró que su efecto es regulando positivamente la expresión del regulador maestro de la isla, Ler (Barba *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2004). De acuerdo a los datos generados en nuestro laboratorio sabemos que en una *E. coli* de laboratorio (cepa MC4100 silvestre), una fusión transcripcional de la región reguladora del operón LEE1 (*ler*) de EPEC al gen reportero *cat* (*ler-cat*), que abarca de la posición -260 a +217 respecto al inicio de la transcripción (**Figura 5A**), contiene todos los elementos de regulación de *ler* (Bustamante *et al.*, sometido). La fusión *ler-cat* sólo se expresa en niveles basales en MC4100; sin embargo, en presencia de GrIA expresada a partir del plásmido pTEPGrIA1, la fusión *ler-cat* incrementa su expresión considerablemente (**Figura 5B**), pero no así una fusión transcripcional del promotor del operón LEE2 (*sepZ-cat*), el cual sólo es activado por Ler (**Figura 5C**). Estos datos indican que GrIA sólo es capaz de activar la expresión del operón LEE1 (*ler*) específicamente y no tiene efecto directo en la expresión de otros operones de la isla, como también lo demuestra el hecho de que la expresión de las proteínas Tir y EspB sólo puede ser complementada por Ler y no por GrIA en una doble mutante *ler grIA* (Barba *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2004). Por otro lado, en *E. coli* MC4100  $\Delta$ *hns* se ha observado que la fusión *ler-cat* se expresa aun en ausencia de GrIA, pero en este fondo genético mutante la presencia de GrIA aumenta la expresión de la fusión aproximadamente 2 veces

(Figura 5B). Estos resultados sugieren que el mecanismo por el cual GrlA promueve la expresión de *ler* puede ser primero contrarrestando el efecto negativo de H-NS, y en su ausencia funcionando como activador clásico promoviendo el reclutamiento de la RNA polimerasa o tal vez contrarrestando a otro regulador negativo, por tanto GrlA podría estar funcionando como un regulador con actividad dual, anti-represor y activador.



**Figura 5.** GrlA activa la expresión de *ler* directamente en *E. coli* K12. (A) Representación esquemática de la fusión transcripcional *ler-cat*, el +1 indica el inicio de la transcripción. (B) La expresión de la fusión transcripcional *ler-cat* se analizó en *E. coli* MC4100 silvestre y en la mutante en el gen *hns*, en presencia del vector solo o de pTEPGrlA1. (C) La expresión de *ler-cat* y *sepZ-cat* se analizó en MC4100 en presencia del vector pMPM-T3, de pTEPGrlA1 o pTEPLer1. Se cuantificó la actividad específica de CAT en muestras tomadas de cultivos crecidos a 37°C en 50 ml de DMEM a una DO<sub>600</sub> de 1.0. Se muestra el promedio de tres repeticiones y se indica la desviación estándar.

## 5.2.- GrlA contrarresta el efecto negativo de H-NS en el promotor de *ler*

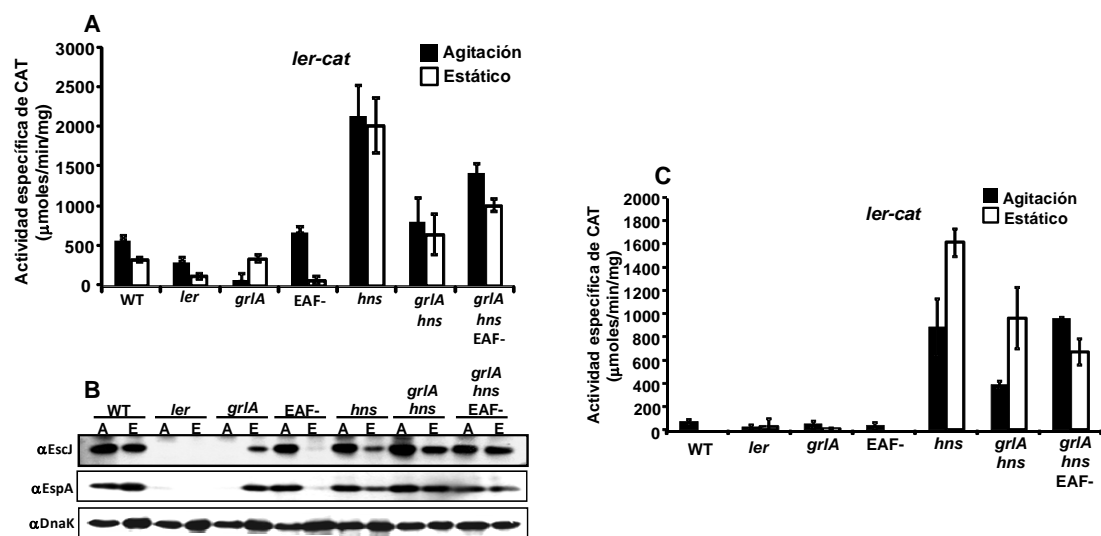
Para analizar directamente en EPEC la hipótesis de que GrlA actúa como un anti-represor contrarrestando la acción represora de H-NS sobre el promotor de *ler*, en una primera aproximación se construyeron mutantes de EPEC en las que se eliminaron por separado los genes *grlA* y *hns*, así como ambos, generando así las cepas  $\Delta grlA$ ,  $\Delta hns$ ,  $\Delta grlA\Delta hns$ . Por otro lado, previamente se propuso que el regulador positivo PerC codificado por el plásmido EAF, contrarresta la represión ejercida por H-NS en la región reguladora de *ler*, cuando EPEC se crece en cultivos estáticos (Bustamante *et al.*, sometido), por lo que para obtener más información acerca de su mecanismo de acción la mutante de EPEC  $\Delta grlA\Delta hns$  se curó del plásmido EAF para dar origen a la cepa mutante EPEC  $\Delta grlA\Delta hns$  EAF-.

La expresión de la fusión transcripcional *ler-cat* se analizó en EPEC silvestre y en las mutantes en *ler*, *grlA*, EAF-, *hns*, *grlAhns* y *grlAhns* EAF- a partir de muestras tomadas de cultivos agitados y estáticos crecidos en DMEM, condiciones en las que GrlA y PerC son funcionales, respectivamente (Bustamante *et al.*, sometido). Como era de esperarse dado que son las condiciones de inducción de los genes de virulencia de EPEC, en la cepa silvestre la fusión de *ler* se expresó en agitación y estático dado que tiene los dos reguladores, GrlA y PerC, mientras que en la mutante en *ler* la expresión de *ler-cat* disminuye en ambas condiciones de crecimiento, ya que *ler* no activa su propio promotor directamente, sino a través de GrlA cuya expresión depende de *ler*. En EPEC  $\Delta grlA$ , la expresión de la fusión transcripcional sólo se observó cuando la bacteria se creció en cultivo estático donde PerC induce la expresión de *ler* y lo opuesto se observó en la cepa carente del plásmido EAF, donde *ler* sólo se

expresó en el cultivo en agitación condición en la que GrlA es activa. En la EPEC mutante en *hns* la expresión de *ler-cat* aumentó alrededor de 4 veces respecto a la actividad obtenida en la cepa silvestre en ambas condiciones de crecimiento, debido a que en ausencia de este regulador negativo todos los genes de la isla se encuentran des-reprimidos, incluyendo a Ler y GrlA. Interesantemente, se encontró que en EPEC  $\Delta$ *grlA* $\Delta$ *hns* el nivel de expresión de la fusión *ler-cat* fue similar a la cepa silvestre tanto en agitación como en estático; mientras que en EPEC  $\Delta$ *grlA* $\Delta$ *hns* EAF- la expresión de la fusión *ler-cat* se incrementó 2 veces respecto a EPEC silvestre en ambas condiciones de crecimiento (**Figura 6A**). Con el fin de analizar la expresión de otros operones de la isla, se monitoreó por ensayos tipo “Western blot” la producción de las proteínas EscJ y EspA codificadas en los operones LEE2 y LEE4, respectivamente (**Figura 6B**). La producción diferencial de estas proteínas en las diferentes cepas fue consistente con lo observado con la fusión transcripcional *ler-cat*. En conjunto estos resultados confirman que en ausencia de H-NS ya no se requiere de GrlA en agitación o de PerC en estático para la expresión de *ler* y por tanto para la expresión del resto del LEE, confirmando que el papel principal de estos reguladores es contrarrestar la represión de H-NS.

Por otro lado, se ha reportado que en medio rico como el LB la expresión de los genes de virulencia es muy baja o prácticamente nula (Kenny *et al.*, 1997) (Lara *et al.*, en preparación), en este trabajo decidimos evaluar la expresión de *ler* en LB en agitación y estático en EPEC WT,  $\Delta$ *ler*,  $\Delta$ *grlA*, EAF-,  $\Delta$ *hns*,  $\Delta$ *grlA* $\Delta$ *hns* y  $\Delta$ *grlA* $\Delta$ *hns* EAF-. De acuerdo con lo previamente observado encontramos que en EPEC WT,  $\Delta$ *ler*,  $\Delta$ *grlA* y EAF- la fusión transcripcional *ler-cat* prácticamente no se

expresa en ambas condiciones de crecimiento. Mientras que en las mutantes en *hns*, *grIAhns* y *grIAhns* EAF- la expresión de *ler* incrementa considerablemente tanto en agitación como en estático, aunque no alcanza los niveles logrados en DMEM (**Figura 6C**). Estos datos sugieren que aun en condiciones que se han descrito como de represión, en ausencia de H-NS, la expresión de *ler* se vuelve prácticamente independiente de GrlA y PerC, respaldando los resultados obtenidos a la fecha en los que hemos encontrado que estos reguladores funcionan principalmente como antagonistas de H-NS.



**Figura 6.** En ausencia de H-NS la expresión de *ler* es independiente de GrlA y PerC. (A) La expresión de *ler-cat* se cuantificó en EPEC silvestre y las mutantes en *ler*, *grIA*, EAF-, *hns*, *grIAhns* y *grIAhns* EAF-. Las bacterias se crecieron en agitación a una DO<sub>600</sub> de 1 (barras negras) o en estático con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 6 horas (barras blancas). (B) La expresión de las proteínas EscJ y EspA se analizó por “Western blot” a partir de extractos tomados de las cepas usadas para el ensayo de CAT y como control de carga se inmunodetectó a DnaK. (C) La expresión de *ler-cat* se analizó en LB en las mismas condiciones y fondos genéticos que en (A).

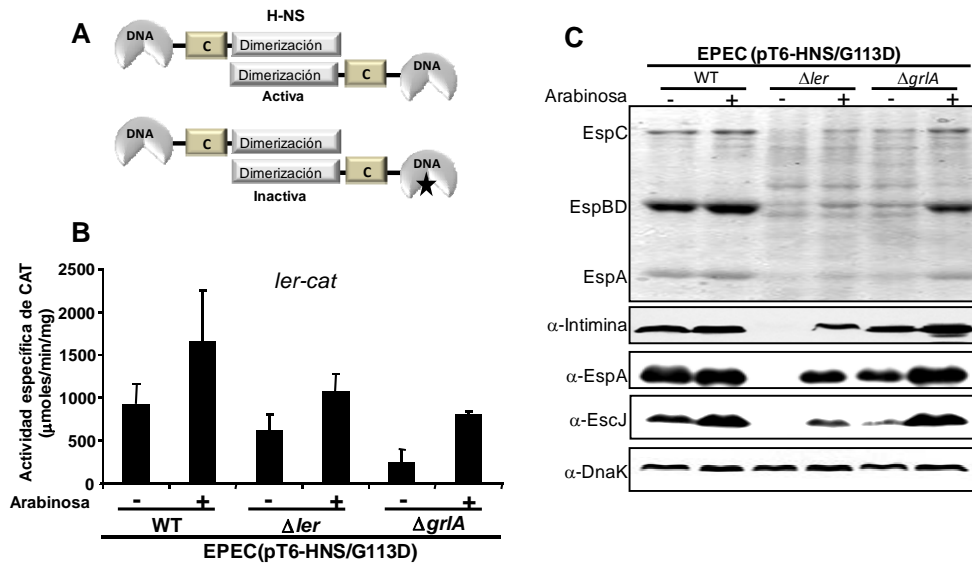


Para confirmar los datos anteriores, también hicimos uso de una versión mutante de H-NS la cual tiene un cambio puntual en la Glicina 133 por un Ácido aspártico en el dominio de unión a DNA (H-NS<sup>G113D</sup>). Esta proteína mutante es incapaz de unirse al DNA pero conserva la capacidad de formar heterodímeros con H-NS silvestre inactivándola (**Figura 7A**). La expresión de la dominante negativa se encuentra bajo el control de un promotor inducible por arabinosa en el plásmido pT6-H-NS/G113D. EPEC silvestre,  $\Delta ler$  y  $\Delta grlA$  se transformaron con la fusión *ler-cat* y con el plásmido pT6-H-NS/G113D y las bacterias se crecieron en presencia o ausencia de 0.2% de arabinosa como inductor. Como se puede ver en la **Figura 7B**, en EPEC silvestre con y sin sobre-expresión de la dominante negativa se observó expresión de *ler*, sin embargo, en EPEC  $\Delta ler$  la expresión de la fusión *ler-cat* sólo disminuyó un 30% respecto a la bacteria silvestre y cuando H-NS<sup>G113D</sup> se indujo la expresión de *ler-cat* se incrementa al nivel de la EPEC silvestre que contiene la dominante negativa sin inducir. En EPEC  $\Delta grlA$  sin inducción de la dominante negativa se observó, como se esperaba, que la expresión de la fusión *ler-cat* es aproximadamente 4 veces menor que la obtenida en EPEC silvestre, mientras que al sobre-expresar H-NS<sup>G113D</sup> en EPEC  $\Delta grlA$  se restaura el nivel de expresión de la fusión *ler-cat* (**Figura 7B**). Además, se analizó mediante el perfil de proteínas secretadas el efecto de la dominante negativa sobre la expresión del SST3 y de proteínas efectoras codificadas en el LEE y por “Western blot” se monitoreó la expresión de los operones LEE5, LEE4 y LEE2 mediante la producción de las proteínas Intimina (LEE5), EspA (LEE4) y EscJ (LEE2), respectivamente. De acuerdo con los resultados obtenidos con la fusión transcripcional, en EPEC silvestre se observó secreción de las proteínas EspABD

y la inmuno-detección de las proteínas Intimina, EspA y EscJ con y sin inducción de la dominante negativa. En EPEC  $\Delta/er$  no se observó el perfil de secreción característico en ninguna de las dos condiciones y sólo se detectaron las proteínas Intimina, EspA y EscJ cuando se sobre-expresó H-NS<sup>G113D</sup>, aunque a niveles más bajos que la EPEC silvestre. En EPEC  $\Delta grlA$  sin la inducción de H-NS<sup>G113D</sup> no se observó secreción de proteínas por la bacteria y la producción de Intimina, EspA y EscJ fue a niveles inferiores a los detectados en la cepa silvestre, mientras que cuando se sobre-expresó la dominante negativa se restauró el perfil de secreción y los niveles de Intimina, EspA y EscJ fueron comparables a los de EPEC silvestre (**Figura 7C**). Estos resultados indican que en ausencia de H-NS (en este caso inactivada por dominancia negativa), GrlA ya no es indispensable para la expresión de *ler* y, por tanto, para la del resto de los genes de la isla, sugiriendo que GrlA actúa principalmente como un anti-represor. Sin embargo, el mecanismo molecular específico por el que actúan estos reguladores no es claro aún y se están realizando experimentos con el objetivo de analizar con mayor detalle el funcionamiento de GrlA y PerC.

### **5.3.- GrlA no dimeriza ni interactúa con la RNAP o con los reguladores Ler y H-NS**

Los resultados obtenidos a la fecha indican que el mecanismo por el que GrlA ejerce su efecto positivo en la expresión de *ler* es contrarrestando a H-NS. También, previamente se propuso que en ausencia de H-NS, GrlA podría actuar como activador clásico y por tanto interactuar con la RNAP (Barba *et al.*, 2005). Además en la literatura se han descrito reguladores que contrarrestan a H-NS y



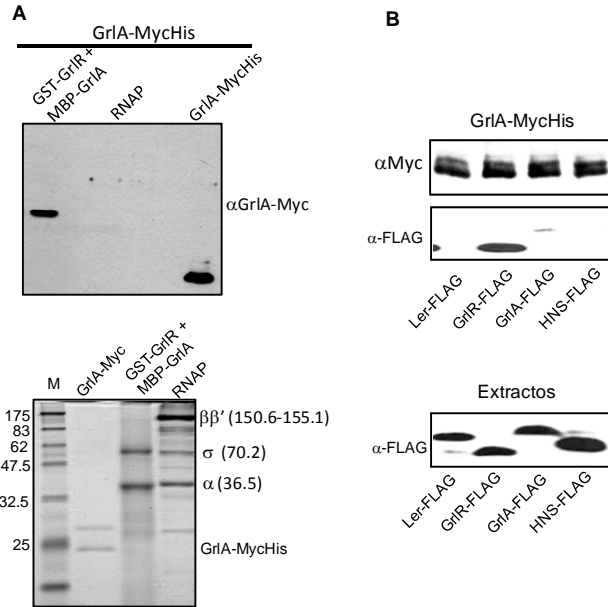
**Figura 7.-** Ensayo de dominancia negativa. (A) Representación esquemática de un homodímero de H-NS silvestre (activa) y un heterodímero entre H-NS silvestre y la mutante H-NS<sup>G113D</sup> (inactiva). EPEC silvestre (WT), EPEC  $\Delta ler$  y EPEC  $\Delta grlA$  conteniendo la fusión *ler-cat* y el plásmido pT6-HNS/G113D, se crecieron en presencia (+) o ausencia (-) de 0.2% de arabinosa como inductor en DMEM, hasta una DO<sub>600</sub> de 1 y en este punto se tomaron muestras para el ensayo de actividad enzimática de CAT (B), perfil de proteínas secretadas y Western blot contra las proteínas Intimina, EspA, EscJ, incluyendo como control de carga a la proteína DnaK (C).

también actúan como activadores clásicos, tal es el caso de ToxT de *Vibrio cholerae* (Yu and DiRita, 2002). Por esto, en este trabajo analizamos mediante experimentos tipo “far western” si GrIA-MycHis<sub>6</sub> purificada parcialmente era capaz de interactuar con la RNAP pura de *E. coli* o consigo misma, utilizando como control positivo de interacción a GrIR. Sin embargo, no se observó interacción con ninguna de las subunidades de la RNAP, ni con MBP-GrIA, mientras que de acuerdo con lo reportado previamente sí fue capaz de interactuar con GST-GrIR, como control del “Western blot” se usó la proteína GrIA-MycHis<sub>6</sub> (**Figura 8A**).

Aunque estas observaciones tienen que ser confirmadas por otras estrategias, al momento sugieren que GrlA no interactúa con la RNAP y por tanto no actúa como activador clásico y que su actividad no involucra la formación de homodímeros. También se muestra un SDS-PAGE de las proteínas usadas en el “far-western”, GrlA-MycHis<sub>6</sub> usada como proteína de interacción, GST-GrlR, MBP-GrlA y la RNAP usadas en el experimento de “far western” (**Figura 8A**). Por otro lado, mediante “pull down” usando como carnada a la proteína GrlA-MycHis<sub>6</sub>, exploramos la posibilidad de interacción con algunas de las proteínas involucradas en la regulación del LEE como son Ler, H-NS, GrlR y GrlA etiquetadas en el C-terminal con 3XFLAG. De acuerdo a lo previamente reportado en la literatura GrlA sólo fue capaz de interactuar con GrlR, además de acuerdo con lo observado en el “far western” no se observó interacción consigo misma, ni con Ler o H-NS. Como control se inmunodetectaron las proteínas GrlA-MycHis<sub>6</sub> y la expresión de las proteínas con la etiqueta de FLAG a partir de los extractos usados en el “pull down”, todas se expresaron a nivel similar (**Figura 8B**). En conjunto estos datos sugieren que el mecanismo por el que GrlA activa la expresión de *ler* en EPEC no parece involucrar interacción con la RNAP, ni con Ler y H-NS, además también indican que GrlA actúa en forma monomérica.

#### **5.4.- GrlA se une específicamente a la región reguladora de *ler***

Una de las características principales de los reguladores transcripcionales es la presencia de motivos de unión a DNA, siendo uno de los más comunes en los reguladores transcripcionales de bacterias el motivo tipo HTH (Helix-Turn-Helix), el cual es esencial para que los reguladores que lo contienen se unan



**Figura 8.** GrIA no interactúa con proteínas involucradas en la regulación del LEE. (A) Análisis de la interacción de GrIA-MycHis<sub>6</sub> con GST-GrIR, MBP-GrIA y la RNAP pura de *E. coli* mediante “far western”; el carril de la derecha fue usado como control positivo del “Western blot”. Panel inferior SDS-PAGE de las proteínas usadas en el “far western”. (B) La interacción de GrIA-MycHis<sub>6</sub> con Ler, H-NS, GrIR y GrIA etiquetadas con 3XFLAG se probó mediante ensayos tipo “pull down” con GrIA-MycHis<sub>6</sub>. En la parte superior se muestra la inmuno-detección de GrIA-MycHis<sub>6</sub> usada como carnada en la interacción, en medio la detección de proteínas etiquetadas con 3XFLAG recuperadas de la interacción con GrIA-MycHis<sub>6</sub> y en la parte inferior se muestra el “Western blot” de las proteínas etiquetadas con FLAG presentes en los extractos usados para el “pull down”.

específicamente al DNA y activen o repriman sus genes blanco (Aravind *et al.*, 2005). La predicción de un motivo de unión a DNA de tipo HTH en la secuencia de aminoácidos de GrIA, así como las evidencias que confirman que GrIA activa la expresión de la fusión *ler-cat* directamente, sugieren que su mecanismo de acción involucra interacción directa con la región reguladora de *ler*. Sin embargo, previamente no se pudo detectar interacción de la proteína MBP-GrIA de *C. rodentium* con el DNA de la región reguladora de *ler* (Barba *et al.*, 2005). Un

estudio reciente reportó que la proteína recombinante GST-GrlA de EHEC es capaz de unirse al DNA de la región reguladora de *ler* de esa bacteria; sin embargo, los resultados no fueron concluyentes, ya que una versión mutante a la que se le eliminó el HTH también fue capaz de formar complejos DNA-proteína y la proteína silvestre se unió inespecíficamente al DNA del control negativo (Huang and Syu, 2008). Con el objetivo de explorar si GrlA de EPEC interactúa específicamente con la región reguladora de *ler in vitro*, la proteína recombinante MBP-GrlA se purificó en condiciones nativas por afinidad usando resina de amilosa como se describe en materiales y métodos. Las fracciones colectadas se separaron en SDS-PAGE al 12% para determinar su grado de pureza (**Figura 9A**). Sabemos que la proteína recombinante MBP-GrlA es funcional en EPEC ya que cuando se expresó a partir del plásmido pMBP-GrlA fue capaz de complementar la expresión de los genes del LEE en la cepa EPEC  $\Delta$ *grlA*, indicando que conserva todas sus propiedades funcionales aun fusionada a MBP. Para analizar la interacción de MBP-GrlA con la región reguladora de *ler*, se amplificó por PCR un fragmento con los oligonucleótidos ler260F y Orf1-H3-R que abarca de la posición -260 a la +217 (ler-260/+217) respecto al inicio de la transcripción de *ler*. La secuencia contenida en este fragmento, ler-260/+217, es equivalente a la región contenida en la fusión *ler-cat* usada en los ensayos de expresión de *ler*. Como control negativo se usó un fragmento de DNA de la región codificante del gen *dnaJ* obtenido por PCR con los oligonucleótidos dnaJ FW y dnaJ RV. Con la proteína purificada los fragmentos ler-260/+217 y *dnaJ* se hicieron ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA, por sus siglas en inglés). Aproximadamente 100 ng de DNA de ler-260/+217 y *dnaJ* se incubaron con concentraciones crecientes

de MBP-GrlA (0, 0.3, 0.4, 0.6, 0.7, 0.8 y 1  $\mu$ M) en amortiguador de unión (Tris-HCl 10 mM pH 8, KCl 50 mM, DTT 1 mM, EDTA 0.5 mM, BSA 10  $\mu$ g y glicerol 5%). De acuerdo a lo observado con la fusión transcripcional *ler-cat*, los resultados obtenidos en los ensayos tipo EMSA indican que GrlA se une específicamente al fragmento de DNA ler-260/+217 que contiene la región reguladora de *ler* a partir de la concentración de 0.4  $\mu$ M, mientras que no lo hace con el fragmento de *dnaJ* aun a la concentración más alta, 1  $\mu$ M (**Figura 9B**).

Sin embargo, se ha observado que una fusión transcripcional de *ler* que abarca de la posición -50 a +217 todavía responde positivamente a GrlA (Bustamante *et al.*, sometido), indicando que esta región contiene la secuencia requerida por GrlA para unirse al DNA. Para analizar esta posibilidad, el fragmento de ler-260/+217 fue dividido en dos partes mediante PCR con los pares de oligos ler260F-ler-50 RV y ler50BH1 FW-Orf1-H3-R, dando como resultado los fragmentos correspondientes a las regiones ler-260/-50 y ler-50/+217, respectivamente. Con aproximadamente 100 ng de cada uno de estos fragmentos se hicieron ensayos tipo EMSA adicionando concentraciones crecientes de MBP-GrlA en las mismas condiciones descritas arriba. Como se puede observar en la **Figura 9C**, MBP-GrlA interactúa específicamente con el fragmento de ler-50/+217 a partir de 0.6  $\mu$ M de proteína, ya que no se observó unión al fragmento de ler-260/-50 aun con 1  $\mu$ M de MBP-GrlA (**Figura 9C**).

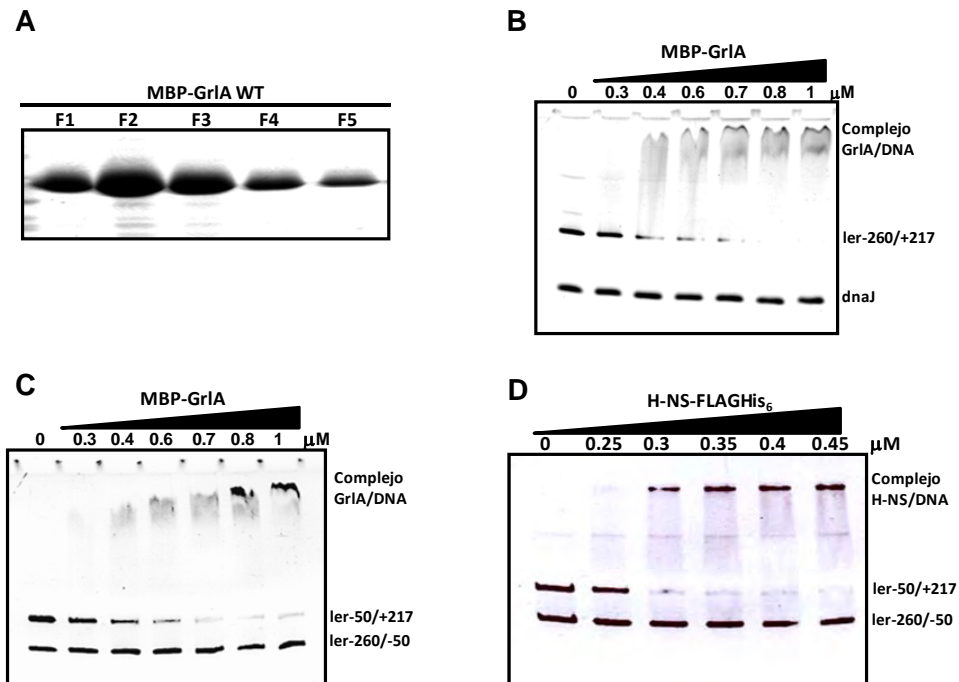
También se ha demostrado que fusiones transcripcionales de *ler* que abarcan de la posición -50 a +217 en EPEC y -40 a +217 en *C. rodentium* son reprimidas por H-NS (Barba *et al.*, 2005) (Bustamante *et al.*, sometido), indicando

que en esta zona también se encuentra el sitio de unión para dicho represor. Para analizar esta posibilidad la proteína H-NS etiquetada en el C-terminal con un triple epítoto de FLAG y seis histidinas (H-NS-FLAGHis<sub>6</sub>) expresada bajo el control de un promotor inducible por arabinosa (Bustamante *et al.*, datos no publicados) se purificó como se describe en (De la Cruz *et al.*, 2007). Se encontró que H-NS-FLAGHis<sub>6</sub> se une específicamente al DNA de la región reguladora de *ler* que comprende del -50 al +217 (*ler*-50/+217) a partir de 0.3  $\mu$ M, mientras que no interactúa con el fragmento de *ler*-260/+217 incluso a la concentración más alta usada en el experimento, 0.45  $\mu$ M (**Figura 9D**). Estos datos en conjunto indican que tanto GrlA como H-NS se unen en la misma zona de *ler* localizada cerca de su promotor.

### **5.5.- GrlA desplaza a H-NS**

A la fecha, en la literatura se han descrito varios reguladores transcripcionales positivos de genes de virulencia de bacterias Gram negativas cuya principal o única función es contrarrestar a H-NS. Para lograr esto algunos compiten con H-NS por el sitio de unión al DNA, mientras que otros se unen a una región adyacente y modifican la arquitectura del DNA alterando la unión de H-NS (Stoebel *et al.*, 2008). Con el objetivo de ahondar en el mecanismo por el que GrlA contrarresta la represión de H-NS en la región reguladora de *ler*, se hicieron ensayos tipo EMSA competitivos con el fragmento de *ler*-50/+217, el cual contiene la secuencia de unión requerida tanto por GrlA como H-NS. Primero se formó el complejo H-NS-DNA adicionando una concentración constante de proteína (0.45





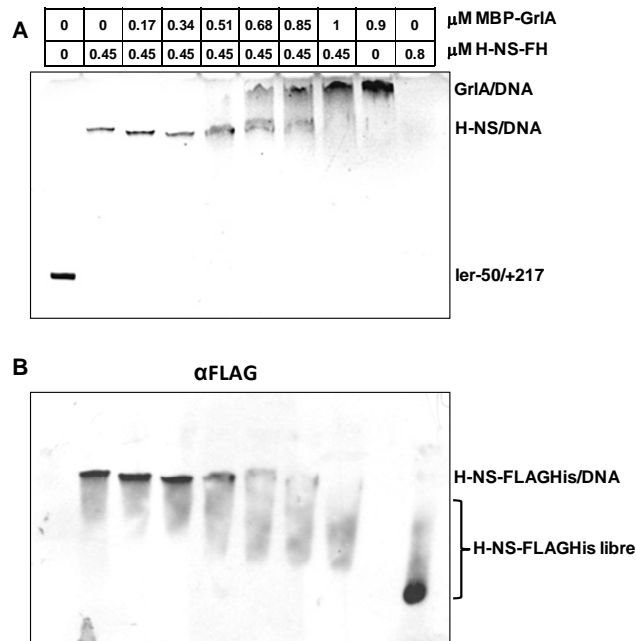
**Figura 9.** MBP-GrlA se une específicamente a la región reguladora de *ler*. (A) Las 5 fracciones colectadas de MBP-GrlA se separaron en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes. (B) EMSA utilizando aproximadamente 100 ng de los fragmentos de PCR que abarcan la región reguladora de *ler* comprendida entre -260 y +217 y una parte de la región codificante de *dnaJ* utilizado como control negativo, se incubaron con concentraciones crecientes de MBP-GrlA purificada (0, 0.3, 0.4, 0.6, 0.7, 0.8 y 1  $\mu$ M). (C) *ler-260/+217* fue dividido en *ler-50/+217* y *ler-260/-50* por PCR e incubados con MBP-GrlA purificada como en (B). (D) Los fragmentos de *ler-50/+217* y *ler-260/-50* se incubaron con concentraciones crecientes de H-NS-FLAGHis<sub>6</sub> (0, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, 0.45  $\mu$ M).

$\mu$ M) y posteriormente se adicionaron concentraciones crecientes de MBP-GrlA. Como se puede observar en la **Figura 10A**, al incrementar la concentración de MBP-GrlA el complejo H-NS-DNA se modifica hasta desaparecer completamente a 1  $\mu$ M de MBP-GrlA, mientras que a medida que el complejo H-NS-DNA va

desapareciendo se va formando el complejo DNA-GrlA. Para analizar si H-NS está siendo desplazada del DNA, el gel de poliacrimamida de la **Figura 10A** se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para detectar la localización de H-NS-FLAGHis<sub>6</sub> con anticuerpos anti-FLAG. A medida que el complejo H-NS-DNA se va deshaciendo, H-NS se libera del DNA y no se detectó señal a la altura del complejo de MBP-GrlA-DNA, indicando que es desplazada y no queda unida al DNA una vez que lo hace GrlA (**Figura 10B**). Por el contrario, H-NS no fue capaz de deshacer o alterar el complejo MBP-GrlA. Estos datos apoyan la hipótesis de que el mecanismo molecular por el que GrlA induce la expresión de *ler* es desplazando a H-NS de la región reguladora de *ler*, como se sugirió antes con base en los resultados ilustrados en las **Figuras 6 y 7**.

#### **5.6.- GrlA completa es requerida para activar la expresión de *ler*, pero no para la interacción con GrlR**

Una gran cantidad de reguladores transcripcionales contienen dominios con funciones separables involucrados en la interacción con el DNA, interacción consigo mismos, con otras proteínas o con moléculas pequeñas que modulan su actividad (Balleza *et al.*, 2009). Con el fin de identificar regiones discretas importantes para la función de GrlA, por un lado involucradas en la activación de *ler* y, por el otro, en la interacción con GrlR, se construyeron eliminaciones sistemáticas de 20 aminoácidos a lo largo de la secuencia de GrlA, como se describe en materiales y métodos. Las eliminaciones construidas fueron GrlA $\Delta$ E2-D20, GrlA $\Delta$ G21-S40, GrlA $\Delta$ R41-T60, GrlA $\Delta$ Y61-N80, GrlA $\Delta$ L81-I100, GrlA $\Delta$ E101-V120 y GrlA $\Delta$ G121-S137 (**Figura 11A**). El efecto de cada una de las eliminaciones

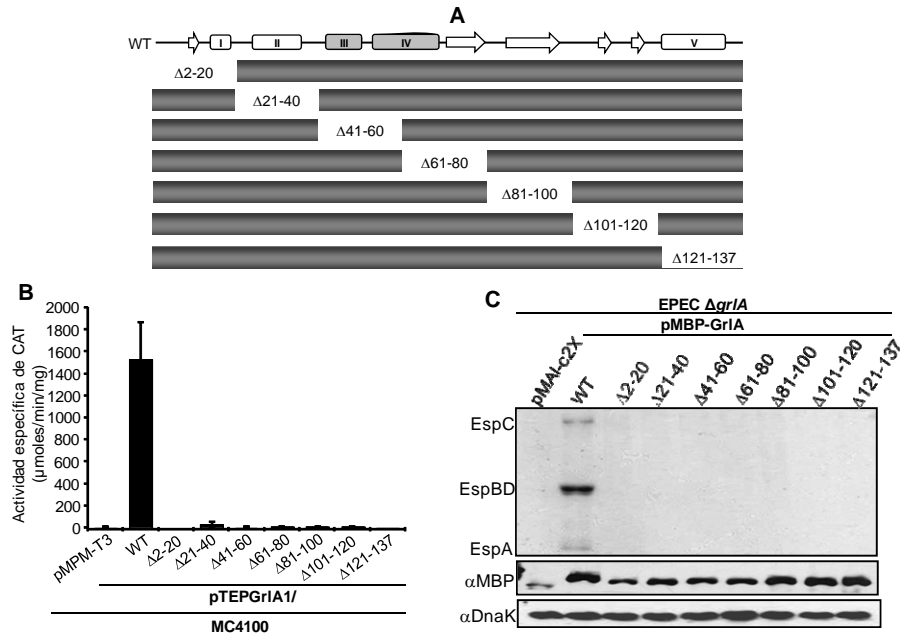


**Figura 10.** GrIA desplaza a H-NS del DNA. (A) El fragmento de ler-50/+217 se incubó con una concentración fija de H-NS y posteriormente se adicionaron concentraciones crecientes de MBP-GrIA; último carril H-NS-FLAGHis<sub>6</sub> sin DNA. (B) La localización de H-NS-FLAGHis<sub>6</sub> se analizó por “Western blot” con anticuerpos anti-FLAG.

en la función de GrIA se analizó por su capacidad para activar la expresión de la fusión transcripcional *ler-cat*. Como se puede observar en la **Figura 11B**, encontramos que ninguna de las eliminaciones fue capaz de promover la expresión de *ler* en *E. coli* MC4100, lo cual sugiere que se requiere de la proteína completa para ser funcional. Sin embargo, dado que a la fecha no se cuenta con anticuerpos que reconozcan específicamente a GrIA y para asegurar que los recortes de GrIA son estables y expresados en niveles similares a la proteína

silvestre durante los ensayos de activación de *ler*. Las versiones de *grlA* silvestre y *grlA* que contienen las eliminaciones se fusionaron en fase al extremo 3' del gen *malE*, para dar origen a las proteínas recombinantes MBP-GrlA silvestre, MBP-GrlA $\Delta$ E2-D20, MBP-GrlA $\Delta$ G21-S40, MBP-GrlA $\Delta$ R41-T60, MBP-GrlA $\Delta$ Y61-N80, MBP-GrlA $\Delta$ L81-I100, MBP-GrlA $\Delta$ E101-V120 y MBP-GrlA $\Delta$ G121-S137 cuya expresión está bajo el control de un promotor inducible con IPTG (Isopropil-B-D-tiogalactopiranosido) en el plásmido pMAL-c2X. La capacidad de las proteínas recombinantes de complementar la cepa EPEC  $\Delta$ *grlA* se evaluó mediante el análisis del perfil de proteínas secretadas en condiciones de inducción (**Figura 11C**). De acuerdo con los resultados obtenidos con la fusión transcripcional *ler-cat* ninguna de las versiones incompletas de GrlA fue capaz de restaurar el perfil de proteínas secretadas como lo hace la proteína MBP-GrlA silvestre, aun cuando su producción es similar a la MBP-GrlA silvestre, como lo muestra su análisis por "Western blot" con anticuerpos anti-MBP (**Figura 11C**). Estos resultados indican que GrlA no soporta la eliminación de regiones de 20 aa sin afectar su función como activador y sugieren que, además del HTH localizado hacia el amino-terminal, el extremo carboxilo terminal es esencial para su actividad como regulador positivo de *ler*.

Previamente usando un sistema de dos híbridos en levadura se encontró que GrlR, además de formar homodímeros puede heterodimerizar con GrlA (Creasey *et al.*, 2003), interacción que también ha sido analizada mediante experimentos tipo "Pull down" (Huang and Syu, 2008; Jobichen *et al.*, 2007). Aunque la relevancia de dicha interacción en la regulación de *ler* apenas está siendo analizada, se ha propuesto que el mecanismo a través del cual GrlR



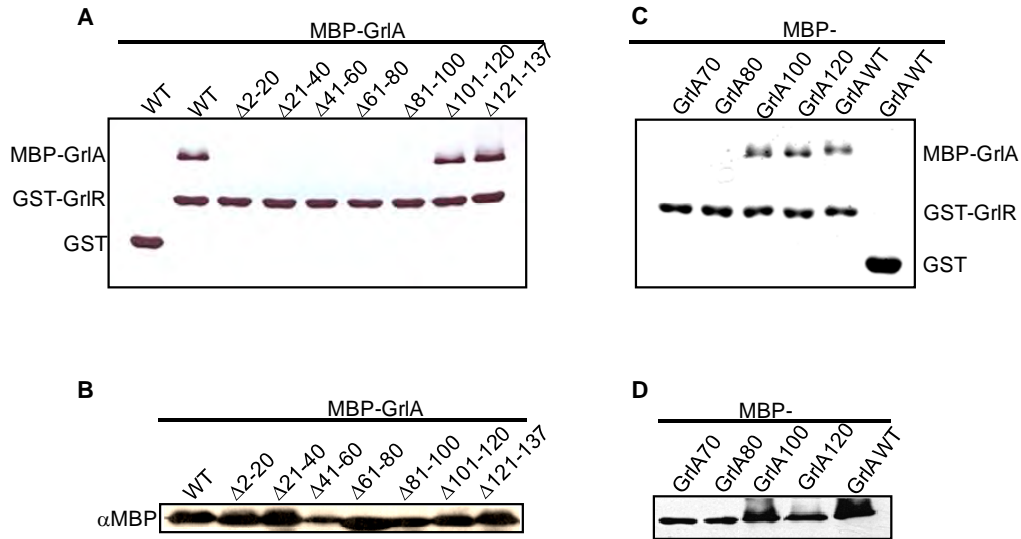
**Figura 11.-** Análisis de eliminaciones sistemáticas de GrlA. (A) Representación esquemática de la estructura secundaria de GrlA silvestre y las eliminaciones consecutivas de 20 aa a lo largo de su secuencia. (B) El efecto de las eliminaciones se determinó por su capacidad para activar la fusión transcripcional *ler-cat* y (C) por su capacidad de complementar a EPEC  $\Delta grlA$  mediante el perfil de proteínas secretadas. Paneles inferiores se muestra la inmuno-detección de MBP-GrlA silvestre y MBP-GrlA con las eliminaciones, como control de carga se inmuno-detectó a DnaK.

reprime la expresión de los genes del LEE es atrapando a GrlA (Barba *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2004; Huang and Syu, 2008; Iyoda and Watanabe, 2005). Por lo anterior, con el propósito de identificar la región de GrlA involucrada en la interacción con GrlR, la proteína MBP-GrlA silvestre y las versiones de MBP-GrlA con las eliminaciones fueron sobre-expresadas en *E. coli* BL21, al igual que las proteínas GST y GST-GrlR para realizar experimentos tipo “pull down” como se describe en materiales y métodos.

El análisis de los complejos proteicos confirmó que MBP-GrlA interactúa con GST-GrlR pero no con GST, mientras que en el caso de las eliminaciones sólo las proteínas mutantes GrlA $\Delta$ E101-V120 y GrlA $\Delta$ 121-137 fueron capaces de interactuar con GST-GrlR como la proteína silvestre (**Figura 12A**), aun cuando todas las proteínas de fusión se encontraron a una concentración similar en el extracto (**Figura 12B**). Lo anterior sugiere que los primeros 100 aminoácidos de GrlA contienen el motivo de interacción con GrlR y que éste se estructura correctamente aun en ausencia de los 37 aminoácidos del extremo carboxilo terminal. Este dato también fue confirmado con proteínas recortadas en el carboxilo terminal que van del aminoácido 1 al 70, 80, 100 y 120 fusionadas a MBP. Se encontró que sólo las proteínas que contienen la región del aminoácido 1 a 100 fueron capaces de interactuar con GrlR (**Figura 12C**), aunque consistentemente con los resultados descritos anteriormente (**Figura 11**), ninguna de estas proteínas trucas fue capaz de complementar la cepa EPEC  $\Delta$ grlA (datos no mostrados).

### **5.7.- Identificación de aminoácidos importantes para la función de GrlA**

GrlA es una proteína de 137 aminoácidos que pertenece a una familia de reguladores transcripcionales de la cual no existen homólogos caracterizados ni funcional ni estructuralmente. Sin embargo, mediante el análisis bioinformático de su secuencia de aminoácidos se hizo la predicción de su estructura secundaria utilizando el programa de computo PSIPRED (McGuffin *et al.*, 2000). Los resultados obtenidos de dicha predicción indican que la mitad amino terminal contiene 4 hélices alfa, siendo las hélices III y IV las que forman el núcleo básico



**Figura 12.** Los primeros 100 aminoácidos de GrIA contienen el motivo de interacción con GrIR. (A y C) Análisis del efecto de las eliminaciones de GrIA fusionadas a MBP en la interacción con GrIR mediante ensayos tipo “Pull down”. Se indican las bandas correspondientes a las proteínas MBP-GrIA, GST-GrIR y GST. (B) Inmuno-detección con anticuerpos anti-MBP de las proteínas MBP-GrIA silvestre y mutantes en los extractos utilizados en estos experimentos.

del HTH. Mientras que la mitad C-terminal de GrIA presenta plegamiento de láminas beta y estructura irregular con una hélice alfa en el extremo (**Figura 13**).

Como se mencionó anteriormente, a la fecha sólo se encuentran en las bases de datos unas cuantas proteínas hipotéticas que presentan identidad con GrIA y el alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de GrIA con dichas proteínas mediante Clustal W (Thompson *et al.*, 1994), reveló la presencia de varios aminoácidos conservados entre ellas, los cuales pueden ser importantes para su función, siendo así buenos candidatos para analizar su papel en la función de GrIA (**Figura 3A**). Con el objetivo de analizar la relevancia en la función de GrIA de algunos aminoácidos tanto conservados como no conservados localizados en



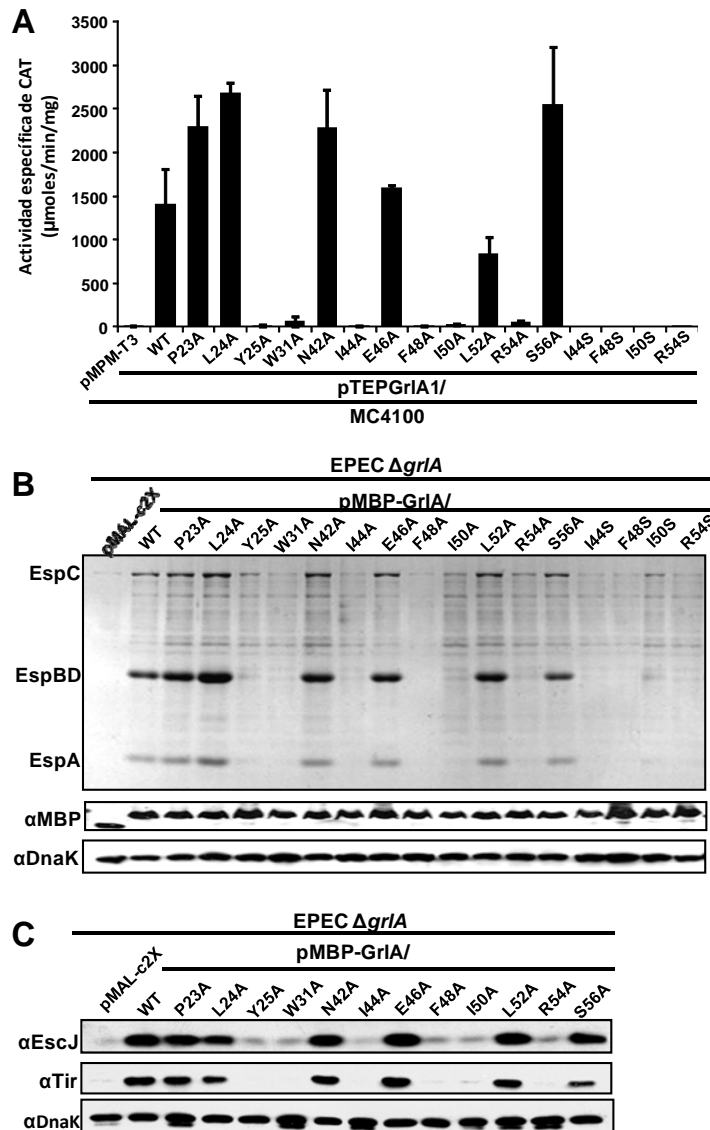


conservados entre los homólogos de GrlA (**Figura 13**), no afectaron su función ya que todas fueron capaces de activar la expresión de la fusión transcripcional *ler-cat*, indicando que dichos residuos no tienen participación en la función de la proteína. Sin embargo, las mutaciones realizadas en los aminoácidos conservados Y25, W31, I44, F48, I50 y R54 produjeron proteínas que no fueron capaces de promover la expresión de la fusión transcripcional *ler-cat*. Por su parte, las mutaciones por Serina en las posiciones I44, F48, I50 y R54 se comportaron de acuerdo a lo observado con sus respectivas mutantes por Alanina, es decir ninguna de ellas fue capaz de inducir la expresión de *ler* (**Figura 14A**), confirmando que esos aminoácidos son importantes para la función de GrlA.

Para confirmar que el fenotipo observado para las proteínas GrlA mutantes es debido a la mutación introducida y no a un problema de expresión, cada una de las mutantes se fusionó a la proteína de unión a maltosa (MBP) en el plásmido pMAL-c2X para poder analizar su expresión por inmuno-detección con anticuerpos anti-MBP, así como para facilitar su purificación. La capacidad de las proteínas mutantes fusionadas a MBP de complementar la cepa de EPEC  $\Delta$ *grlA*, se determinó mediante el análisis del perfil de proteínas secretadas, así como por “Western blot” monitoreando la producción de las proteínas EscJ y Tir codificadas en los operones LEE2 y LEE5, respectivamente. Los resultados obtenidos confirmaron las observaciones reportadas en la **Figura 14A**, ya que las proteínas mutantes que activaron la expresión de la fusión *ler-cat* (P23, L24, N42, E46, L52 y S56), también restauraron el perfil de secreción de proteínas de virulencia de EPEC  $\Delta$ *grlA* (**Figura 14B**). Por su parte, ninguna de las proteínas mutantes deficientes en activar la expresión de *ler-cat* (Y25, W31, I44, F48, I50 y R54), fue

capaz de restaurar la secreción de proteínas de virulencia (**Figura 14B**). Un resultado similar se encontró cuando se analizó la producción de EscJ y Tir por “Western blot”, aunque sólo se hizo con las mutantes por Alanina (**Figura 14C**). El análisis de la producción mediante “Western blot” de las mutantes de GrlA fusionadas a MBP, reveló que se expresaron a un nivel similar al de la proteína silvestre y como control de carga se inmuno-detectó la proteína DnaK (**Figura 14B**, paneles inferiores).

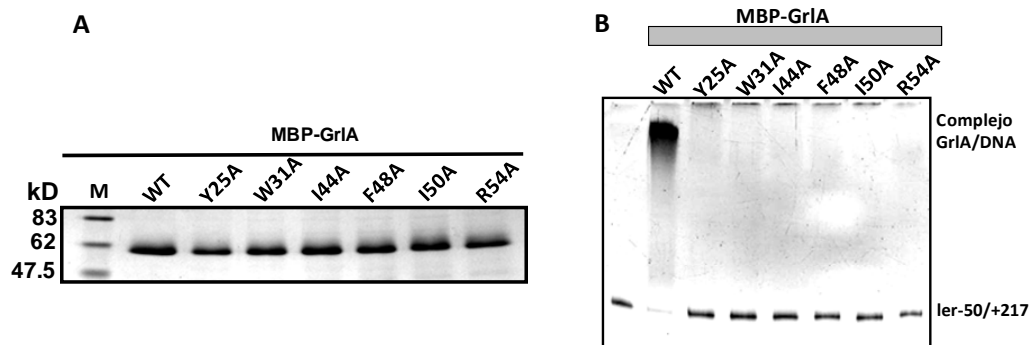
Como se mencionó previamente, GrlA se une directamente a la región reguladora de *ler* (**Figura 9**), sugiriendo que la activación está mediada por esta interacción. Más aún, la sustitución por Alanina de residuos localizados en el motivo HTH predicho de GrlA genera mutantes inactivas probablemente debido a que esas proteínas perdieron la capacidad de interactuar con el DNA de la región reguladora de *ler*. Para analizar esta posibilidad las versiones de GrlA inactivas se purificaron como proteínas de fusión a MBP en las mismas condiciones que la proteína silvestre (**Figura 15A**). Ensayos tipo EMSA, usando una concentración de 1.2  $\mu\text{M}$  de cada proteína y el fragmento de *ler*-50/+217, confirmaron que la inactividad de dichas mutantes se debió a que la mutación afectó su capacidad de unirse a la región reguladora de *ler* (**Figura 15B**). En su conjunto estos resultados revelan residuos del HTH que son críticos para la interacción con el DNA o la correcta estructuración del motivo de unión. El que no todos los residuos de esa región sean esenciales para las funciones de GrlA, indica también que el motivo HTH tolera cambios puntuales sin alterar drásticamente la estructura global de la proteína.



**Figura 14.-** Aminoácidos importantes para la función de GrIA. (A) La capacidad de las mutantes puntuales de activar la expresión de la fusión transcripcional *ler-cat* se analizó en *E. coli* MC4100 transformada con el vector pMPM-T3, con pTEPGrIA1 silvestre (WT) o con cada una de las mutantes puntuales pTEPGrIA1/P23A, L24A, Y25A, W31A, N42A, I44A, E46A, F48A, I50A, L52A, R54A, S56A, I44S, F48S, I50S y R54S. La actividad específica de CAT se cuantificó como se describe en la **Figura 1**. (B) La complementación de EPEC  $\Delta$ *grIA* con pMAL-c2X, pMBP-GrIA y pMBP-GrIA/mutante, se analizó mediante el perfil de proteínas secretadas y “Western blot” con anticuerpos anti-EscJ, anti-Tir, anti-MBP y como control anti-DnaK.

## 5.8.- Aminoácidos del HTH de GrIA participan en la interacción con GrIR

Los resultados de la interacción entre GrIR con cada una de las eliminaciones de GrIA, indican que los primeros 100 aminoácidos de GrIA son suficientes para establecer dicha interacción, pero que se requiere la proteína completa para activar a *ler*. Además, en esta parte de la proteína se localizan



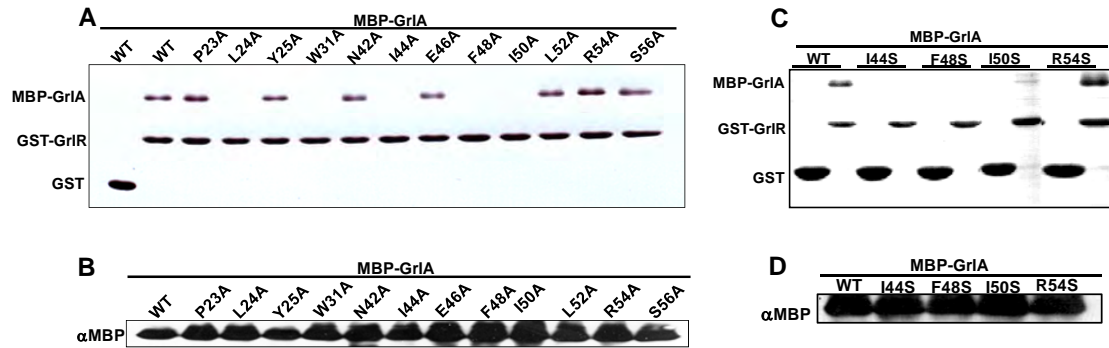
**Figura 15.-** Residuos críticos del motivo HTH de GrIA para la interacción con la región reguladora de *ler*. (A) Las proteínas MBP-GrIA silvestre y MBP-GrIA/Y25, MBP-GrIA/W31A, MBP-GrIA/I44A, MBP-GrIA/F48A, MBP-GrIA/I50A y MBP-GrIA/R54A se purificaron por afinidad con la resina de amilosa en las mismas condiciones que la proteína silvestre. En la figura se muestra la fracción de cada una de ellas que fue usada en los EMSAs. (B) El análisis de la interacción de MBP-GrIA silvestre y las mutantes puntuales inactivas se llevó a cabo en las mismas condiciones que en la **Figura 9**, con una concentración de 1.2  $\mu$ M de cada proteína.

todos los residuos analizados por mutagénesis dirigida en este trabajo (**Figura 13**). Con el objetivo de identificar residuos de GrIA importantes para la interacción proteína-proteína y aprovechando las mutaciones puntuales en el HTH de GrIA, se

analizó la relevancia de cada residuo en la interacción GrIR-GrIA mediante experimentos tipo “Pull down”. Para esto, MBP-GrIA silvestre y las versiones de MBP-GrIA/mutante se sobre-expresaron en *E. coli* BL21, al igual que las proteínas GST y GST-GrIR. Estas últimas se unieron a la resina de glutatión sefarosa, para posteriormente ponerlas a interactuar con cada uno de los extractos que contenían a MBP-GrIA silvestre y cada una de las mutantes. Los complejos proteicos unidos a la resina se separaron en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes.

De acuerdo a lo previamente observado, se encontró que hay interacción entre las proteínas GST-GrIR y MBP-GrIA silvestres, pero no MBP-GrIA y GST (controles positivo y negativo, respectivamente). Mientras que las mutaciones en los aminoácidos P23, N42, E46, L52 y S56 no afectaron la interacción con GrIR (**Figura 16A**), ni su capacidad de activar a *ler* (**Figura 14**), las mutantes inactivas en los aminoácidos W31, I44, F48 e I50 tampoco fueron capaces de interactuar con GST-GrIR (**Figura 16A**). Estos datos sugieren que los residuos W31, I44, F48 e I50 forman parte de una interfase de GrIA que participa tanto en el mecanismo de unión a DNA y activación, como en la interacción proteína-proteína. Sin embargo, la mutante inactiva R54A conserva la interacción con GST-GrIR (**Figura 16A**), lo que indica que este aminoácido es importante para la unión a DNA, pero no para la interacción con GrIR. Interesantemente, la mutante L24A que es aún capaz de activar a *ler*, no lo es de interactuar con GrIR. El resultado obtenido con estas dos mutantes confirma la noción de que los motivos funcionales que permiten a GrIA unirse al DNA e interactuar con GrIR, aunque se empalman no dependen de los mismos residuos en su totalidad. Confirmando los resultados

anteriores, las mutaciones por Serina en las posiciones I44, F48, I50 y R54 se comportaron como los respectivos cambios por Alanina (**Figura 16C y D**).



**Figura 16.** Identificación de aminoácidos de GrIA implicados en la interacción con GrIR. Para analizar la interacción de las proteínas derivadas de MBP-GrIA con las mutaciones puntuales tanto por Alanina (A) como por Serina (C), se hicieron experimentos tipo “Pull down” como se describe en materiales y métodos. A partir de los extractos que contienen las proteínas MBP-GrIA usados en (A) y (C) se realizó un “Western blot” con anticuerpos anti-MBP (B) y (D) para asegurar la correcta expresión de las proteínas.

## 6.- Discusión y conclusiones

Los genomas bacterianos han evolucionado a través de varios procesos que involucran mutaciones, rearrreglos o ganancia de material genético por transferencia horizontal. La mayor parte del DNA adquirido por transferencia horizontal se encuentra agrupado en regiones conocidas como islas genómicas (Juhas *et al.*, 2009). En el caso de las bacterias patógenas algunas de estas regiones codifican para una gran variedad de factores de virulencia, por lo que son llamadas islas de patogenicidad (Hacker and Kaper, 2000; Schmidt and Hensel, 2004). Se ha propuesto que las bacterias desarrollaron mecanismos que les permitieron silenciar preferencialmente el material genético adquirido por transferencia horizontal, evitando así que la expresión descontrolada de los genes contenidos en dichas islas representara una desventaja adaptativa (Dorman, 2007). En bacterias Gram negativas el regulador global H-NS ha tenido un papel central en la evolución de los organismos patógenos al silenciar preferencialmente dicho material genético, el cual posee regularmente un contenido de ATs mayor al del genoma promedio, por lo que se le ha llamado el centinela genómico (Dorman, 2007; Lucchini *et al.*, 2006; Navarre *et al.*, 2006; Oshima *et al.*, 2006). Por otro lado, si el material genético adquirido confiere ventajas selectivas, las bacterias han evolucionado estrategias que les permiten contrarrestar específicamente el silenciamiento ejercido por H-NS en las condiciones apropiadas (Stoebel *et al.*, 2008).

De acuerdo con esta noción, se ha propuesto que la isla LEE de los patógenos A/E fue adquirida horizontalmente por una *E. coli* no patógena y

silenciada inicialmente por H-NS, cuyo papel como principal represor de los genes de la isla ha sido ampliamente documentado (Bustamante *et al.*, 2001; Castillo *et al.*, 2005; Elliott *et al.*, 1998; Mellies *et al.*, 2007). La regulación de los genes de virulencia de los patógenos A/E es muy compleja y en general está muy conservada entre las diferentes bacterias que conforman este grupo. En ella se involucran varios reguladores globales, -presentes también en cepas no patógenas-, como H-NS, Hha, IHF, QseA, BipA, GadX, Fis, LexA, RcsCDB y SdiA, así como específicos codificados dentro (Ler, GrlA y GrlR), o fuera (PerC, GrvA, EivF, EtrA, LrhA, RegA, YhiE y YhiF) de la isla de patogenicidad LEE. El principal blanco de regulación es el operón LEE1 cuyo primer gen codifica para Ler, el regulador maestro de la isla (Mellies *et al.*, 2007; Tree *et al.*, 2009). GrlA y PerC, codificados en los operones *grlRA* del LEE y *per* del plásmido EAF, son reguladores críticos para la expresión de *ler* bajo condiciones particulares de crecimiento en cada caso (Barba *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2004; Huang and Syu, 2008)(Bustamante *et al.*, sometido). Sin embargo, se ha reportado que GrlA también está involucrado en la regulación negativa o positiva de genes codificados fuera del LEE, aunque el mecanismo molecular por el que ejerce su acción es desconocido a la fecha (Huang and Syu, 2008; Iyoda *et al.*, 2006; Saitoh *et al.*, 2008).

De acuerdo a los datos obtenidos en este trabajo, en ausencia de H-NS los reguladores positivos GrlA y PerC ya no se requieren para la expresión de *ler* y, por tanto, para el resto de los genes de la isla (**Figuras 6 y 7**). Sin embargo, en condiciones de represión (crecimiento en LB) (**Figura 6C**), la expresión de *ler* fue menor que la observada en condiciones de inducción (crecimiento en DMEM)



**(Figura 6A)**. Esto sugiere que bajo condiciones de represión la expresión de *ler* pudiera ser regulada por otro factor negativo, siendo un candidato GrIR cuyo efecto represor es más acentuado en estas condiciones de crecimiento (Lio and Syu, 2004)(Lara *et al.*, en preparación). Estos datos, y los experimentos de competencia de unión al DNA, confirmaron que la principal función de GrIA es antagonizar a H-NS desplazándola de la región reguladora de *ler*, evitando así la represión.

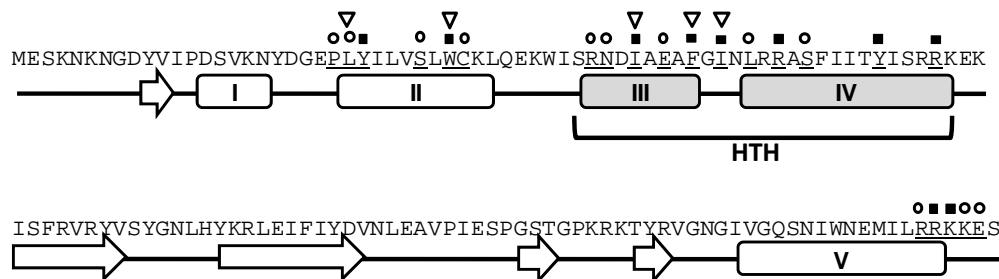
GrIA y PerC, así como H-NS, ejercen su función muy cerca del promotor, ya que una fusión transcripcional que contiene la región reguladora de *ler* comprendida entre -50 y +217, respecto al inicio de la transcripción, es aún activada por GrIA y PerC y reprimida por H-NS (Bustamante *et al.*, sometido). Más aún, tanto GrIA como H-NS son capaces de unirse específicamente al DNA comprendido entre las posiciones -50 y +217 de la región reguladora de *ler* **(Figura 9)**, lo cual sugiere que el sitio de unión de estas proteínas se localiza muy cerca uno de otro, aunque queda aún por delimitar en más detalle cada uno de estos sitios. Datos preliminares sugieren que GrIA no interactúa con la RNA polimerasa **(Figura 8)**, apoyando la idea de que GrIA no actúa como un activador clásico. Sin embargo, el hecho de que en *E. coli* MC4100  $\Delta hns$  la presencia de GrIA aumenta la expresión de *ler-cat* **(Figura 5B)**, sugiere que tiene un efecto positivo adicional en ausencia de H-NS, tal vez contrarrestando a otro regulador negativo global como Hha o StpA.

El hecho de que GrIA actúe como des-represor para los genes de virulencia codificados por el LEE es consistente con lo reportado en la literatura, donde se ha encontrado que los genes de virulencia de bacterias enteropatógenas son

reprimidos por H-NS y su expresión es inducida por reguladores específicos cuya principal función es contrarrestar el efecto represor de H-NS, entre ellos se encuentran HilD de *Salmonella Typhimurium*, VirB de *Shigella flexneri*, Ler de EPEC, RovA de *Yersinia enterocolitica*, ToxT de *Vibrio cholerae*, UreR de *Proteus mirabilis* y HlyU de *Vibrio vulnificus*. Estos reguladores contrarrestan a H-NS desplazándola de su sitio de unión, liberando de esta forma al promotor de los genes silenciados y permitiendo a la RNA polimerasa unirse por sí sola o con ayuda de un activador clásico para iniciar la transcripción (Bustamante *et al.*, 2001; Bustamante *et al.*, 2008; Ellison and Miller, 2006; Poore and Mobley, 2003; Stoebel *et al.*, 2008; Turner and Dorman, 2007; Yu and DiRita, 2002).

GrlA es una proteína muy conservada en los organismos que contienen la isla de patogenicidad LEE (91-100% de identidad); sin embargo, homólogos de GrlA sólo han sido encontrados en todos los serotipos secuenciados de *Salmonella enterica*, en *Yersinia bercovieri*, en *Photobacterium luminescens* y en miembros de la familia *Enterobacteriaceae* que contienen el gen *caiF* (**Figura 3**). Estas proteínas se han anotado como parte de una familia de función desconocida, aunque a la fecha se sabe que GrlA es un regulador positivo de genes de virulencia en los patógenos A/E (Deng *et al.*, 2004), mientras que para *CaiF* se ha demostrado que funciona como un activador de los operones *cai* y *fix* en *E. coli* (Buchet *et al.*, 1999). El alineamiento de estas proteínas reveló varios residuos conservados, principalmente a lo largo de la primera mitad de GrlA, la cual contiene un probable motivo HTH (**Figura 3**). La relevancia del HTH en la función de GrlA se analizó mediante la generación de varias mutaciones puntuales en residuos conservados o no alrededor de esta región. Las posiciones Y25, W31,

I44, 48, I50, R54, Y61 y R65 resultaron ser esenciales para la actividad de GrIA (**Figura 17**), ya que las proteínas mutantes correspondientes fueron incapaces de promover la expresión de la fusión transcripcional *ler-cat* en *E. coli* MC4100 o de complementar la cepa EPEC  $\Delta$ *grIA*. Ensayos de interacción proteína-DNA con las versiones mutantes de GrIA confirmaron la importancia de esta región y, por tanto, del HTH en la interacción con el DNA, ya que ninguna de las mutantes se unió al fragmento de la región reguladora de *ler*. Sin embargo, queda aún por determinar si los aminoácidos analizados están estableciendo contactos directos con el DNA o interacciones entre las hélices que conforman el HTH.



**Figura 17.-** Localización y fenotipo de las mutantes puntuales de GrIA. Se representa la estructura secundaria predicha para GrIA y la localización de las mutaciones puntuales construidas en este trabajo, así como por (Cruz-Migoni, 2010). Círculos, indican las mutaciones que no afectaron la función de GrIA; rectángulos, mutaciones que afectaron su capacidad para activar a *ler* o complementar la cepa EPEC  $\Delta$ *grIA*; triángulos invertidos indican las mutaciones en las que también se afectó la interacción con GrIR.

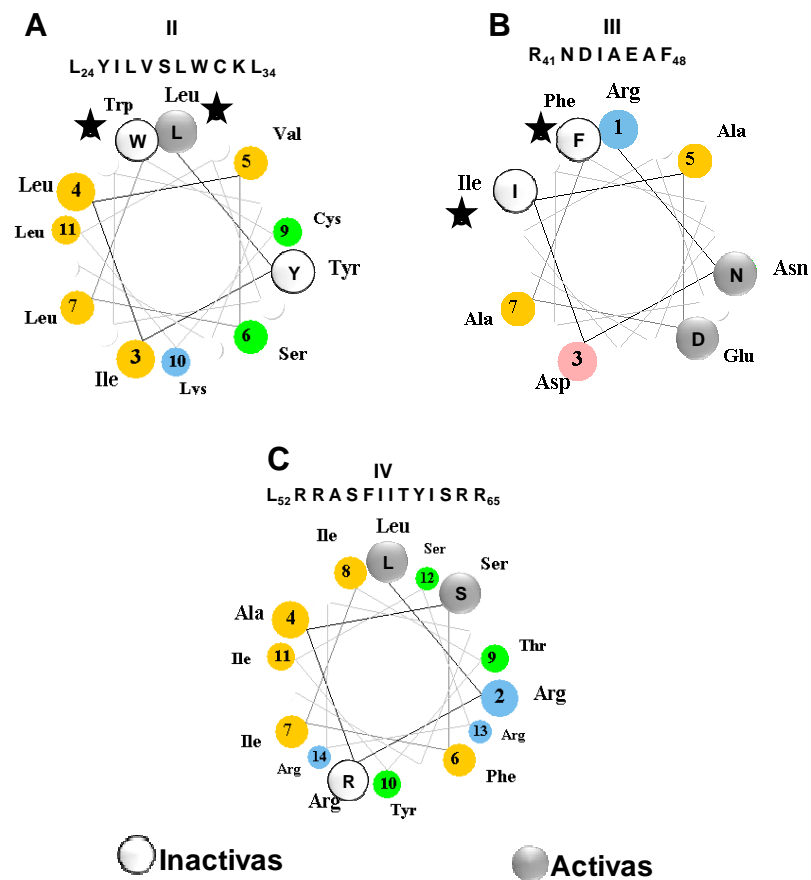
En este sentido, se ha reportado que entre las hélices del HTH se establecen interacciones que son muy importantes para el plegamiento del motivo de unión a DNA y que la pérdida de éstas afecta a su vez dicha interacción

proteína-DNA (Aravind *et al.*, 2005; Joseph *et al.*, 2005). De igual manera, varios de los residuos dentro del HTH pueden ser esenciales para la unión con el DNA interactuando directamente con las bases nitrogenadas o con los grupos fosfato (Aravind *et al.*, 2005).

El análisis de la distribución de los aminoácidos de las hélices que integran el HTH, así como la localización de los residuos que fueron mutados en este trabajo, se muestran en la **Figura 18**. En la hélice II se hicieron tres cambios en las posiciones 24, 25 y 31 localizadas en un mismo lado de la hélice y de las cuales Y25 y W31 fueron inactivas. En la hélice III se hicieron 4 cambios en las posiciones N42, I44, E46 y F48; interesantemente los residuos I44 y F48, cuya mutación produce proteínas inactivas, se localizan en un mismo lado de la hélice y opuesto al de los aminoácidos N42 y E46 cuya mutación no alteró la función de GrIA. Esto sugiere que la cara de la hélice III, donde se localizan los aminoácidos I44 y F48, puede estar estableciendo contactos importantes para la función de GrIA, probablemente estabilizando el plegamiento del HTH. En el caso de la hélice IV se caracterizaron mutantes en las posiciones L52 y S56 localizadas en un mismo lado de la hélice, y en R54 que está en el lado opuesto. De estas tres mutantes sólo el cambio en la posición 54 alteró la función de GrIA, pero no su capacidad de interacción con GrIR (**Figura 18**).

Nuestros resultados sugieren que los aminoácidos conservados entre GrIA y sus homólogos confieren características estructurales esenciales para su función, lo cual no había sido establecido. A la fecha, la única proteína de esta familia de reguladores parcialmente caracterizada era CaiF, la cual tiene la capacidad de unirse al DNA, pero para la que solamente se reportaron dos

mutantes inactivas (A27V e I62N) en posiciones que no están conservadas en GrIA (Buchet *et al.*, 1999). Por otro lado, a la fecha no se sabe si alguna de las otras proteínas homólogas es funcional o cuál es su función para las bacterias donde están presentes.



**Figura 18.** Proyecciones de las hélices que conforman el HTH de GrIA. Distribución helicoidal de los aminoácidos de las hélices II (A), III (B) y IV (C), donde se resalta la localización de los aminoácidos en los que se hicieron las mutaciones puntuales, y se esquematizan los fenotipos encontrados. Las posiciones con una estrella negra corresponden a las mutantes que perdieron la interacción con GrIR.

Evidencias recientes han mostrado que GrIR reprime directamente la expresión de los genes del LEE y que la interacción con GrIA evita dicha represión (Lara *et al.*, datos no publicados), dándole a GrIA la posibilidad de actuar como un antagonista y por tanto como un regulador positivo dual (activando a *ler* mediante su interacción con el DNA e inactivando a GrIR a través de la interacción con la proteína). El dominio de unión a GrIR en GrIA está contenido en los primeros 100 aminoácidos, ya que incluso variantes de GrIA que carecen de los últimos 17 ó 37 residuos del extremo C-terminal no son activas (**Figura 11**), pero sí capaces de interactuar con GrIR (**Figura 12**), noción que es apoyada por el fenotipo inactivo en torno a la activación de *ler* que mostraron mutaciones puntuales en los últimos seis residuos de la proteína, las cuales no afectaron la interacción con GrIR (**Figura 17**) (Cruz-Migoni, 2010). Queda aún por definir si estos residuos son necesarios para la interacción con el DNA. Más aún, el análisis de la interacción de las mutantes puntuales de GrIA con GrIR indicó que varios aminoácidos dentro o alrededor del HTH (por ejemplo, W31, I44, F48 e I50) son necesarios tanto para la interacción entre estas proteínas (**Figura 17**), como para la interacción con la región reguladora de *ler* y, por tanto, para su función como regulador positivo (**Figuras 17**). Sin embargo, mutaciones en otras posiciones como el aminoácido L24 afectan la interacción con GrIR, sin alterar la capacidad de GrIA de activar la expresión de *ler* y, por tanto, de complementar a la cepa EPEC  $\Delta grIA$ , mientras que la posición R54 es importante para la función como regulador de *ler*, pero no para la interacción con GrIR (**Figura 17**). En su conjunto, estas observaciones indican que aunque los motivos funcionales involucrados en la activación de *ler* y

en la interacción con GrIR se sobrelapan compartiendo algunas posiciones, éstos también involucran residuos específicos lo que permite proponer que las hélices II y III, además de participar junto con la hélice IV en la interacción con el DNA, parecen concentrar los residuos importantes para la interacción con GrIR, ya que después de la región denominada “HTH loop”, ningún cambio afectó la interacción con GrIR.

Muchos reguladores transcripcionales están formados por al menos dos dominios funcionales, uno involucrado en la unión al DNA y el otro en la interacción consigo mismo o con otras moléculas (Balleza *et al.*, 2009). GrIA es una proteína que de acuerdo a las evidencias obtenidas a la fecha no forma homodímeros; sin embargo, posee por lo menos tres motivos funcionales que son necesarios para interactuar con el DNA, con GrIR y para funcionar como activador.

## 7.- Perspectivas

» Determinar la secuencia específica requerida por GrIA y H-NS para activar y reprimir la expresión de *ler*.

» Estudiar *in vitro* si GrIA favorece el reclutamiento de la RNAP al promotor de *ler*, así como su capacidad de activar su transcripción en ausencia de H-NS.

» Investigar si en ausencia de H-NS, GrIA contrarresta la represión de otro regulador negativo global.

» Determinar el papel de las hélices II, III y IV en la unión de GrIA al DNA, así como en la interacción con GrIR.

» Analizar la relevancia de la interacción GrIR-GrIA en el pegado de GrIA al DNA.

» Identificar otros genes regulados por GrIA y caracterizar el mecanismo de acción.



## 8.- Bibliografía

- Abe, A., Matsuzawa, T., and Kuwae, A. (2005) Type-III effectors: sophisticated bacterial virulence factors. *C R Biol* **328**: 413-428.
- Abe, H., Miyahara, A., Oshima, T., Tashiro, K., Ogura, Y., Kuhara, S., Ogasawara, N., Hayashi, T., and Tobe, T. (2008) Global regulation by horizontally transferred regulators establishes the pathogenicity of *Escherichia coli*. *DNA Res* **15**: 25-38.
- Aravind, L., Anantharaman, V., Balaji, S., Babu, M.M., and Iyer, L.M. (2005) The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev* **29**: 231-262.
- Balleza, E., Lopez-Bojorquez, L.N., Martinez-Antonio, A., Resendis-Antonio, O., Lozada-Chavez, I., Balderas-Martinez, Y.I., Encarnacion, S., and Collado-Vides, J. (2009) Regulation by transcription factors in bacteria: beyond description. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 133-151.
- Barba, J., Bustamante, V.H., Flores-Valdez, M.A., Deng, W., Finlay, B.B., and Puente, J.L. (2005) A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *J Bacteriol* **187**: 7918-7930.
- Berdichevsky, T., Friedberg, D., Nadler, C., Rokney, A., Oppenheim, A., and Rosenshine, I. (2005) Ler is a negative autoregulator of the LEE1 operon in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 349-357.
- Bhatt, S., Edwards, A.N., Nguyen, H.T., Merlin, D., Romeo, T., and Kalman, D. (2009) The RNA binding protein CsrA is a pleiotropic regulator of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **77**: 3552-3568.
- Blocker, A., Komoriya, K., and Aizawa, S. (2003) Type III secretion systems and bacterial flagella: insights into their function from structural similarities. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 3027-3030.
- Buchet, A., Eichler, K., and Mandrand-Berthelot, M.A. (1998) Regulation of the carnitine pathway in *Escherichia coli*: investigation of the *cai-fix* divergent promoter region. *J Bacteriol* **180**: 2599-2608.
- Buchet, A., Nasser, W., Eichler, K., and Mandrand-Berthelot, M.A. (1999) Positive co-regulation of the *Escherichia coli* carnitine pathway *cai* and *fix* operons by CRP and the CaiF activator. *Mol Microbiol* **34**: 562-575.
- Bustamante, V.H., Santana, F.J., Calva, E., and Puente, J.L. (2001) Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* **39**: 664-678.
- Bustamante, V.H., Martinez, L.C., Santana, F.J., Knodler, L.A., Steele-Mortimer, O., and Puente, J.L. (2008) HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 14591-14596.
- Casadaban, M.J. (1976) Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* **104**: 541-545.
- Castillo, A., Eguiarte, L.E., and Souza, V. (2005) A genomic population genetics analysis of the pathogenic enterocyte effacement island in *Escherichia coli*: the search for the unit of selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 1542-1547.
- Clarke, S.C., Haigh, R.D., Freestone, P.P., and Williams, P.H. (2003) Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* **16**: 365-378.
- Coburn, B., Sekirov, I., and Finlay, B.B. (2007) Type III secretion systems and disease. *Clin Microbiol Rev* **20**: 535-549.
- Cornelis, G.R. (2006) The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**: 811-825.

- Creasey, E.A., Delahay, R.M., Daniell, S.J., and Frankel, G. (2003) Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**: 2093-2106.
- Cruz-Migoni, S.B. (2010) Construcción y caracterización de mutantes sitio dirigidas del regulador positivo GrlA de *Escherichia coli* enteropatógena. *Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.*
- Daniell, S.J., Takahashi, N., Wilson, R., Friedberg, D., Rosenshine, I., Booy, F.P., Shaw, R.K., Knutton, S., Frankel, G., and Aizawa, S. (2001) The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**: 865-871.
- Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (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.
- De la Cruz, M.A., Fernandez-Mora, M., Guadarrama, C., Flores-Valdez, M.A., Bustamante, V.H., Vazquez, A., and Calva, E. (2007) LeuO antagonizes H-NS and StpA-dependent repression in *Salmonella enterica ompS1*. *Mol Microbiol* **66**: 727-743.
- Dean, P., Maresca, M., and Kenny, B. (2005) EPEC's weapons of mass subversion. *Curr Opin Microbiol* **8**: 28-34.
- Dean, P., and Kenny, B. (2009) The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr Opin Microbiol* **12**: 101-109.
- Deng, W., Puente, J.L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B.A., Vazquez, A., Barba, J., Ibarra, J.A., O'Donnell, P., Metalnikov, P., Ashman, K., Lee, S., Goode, D., Pawson, T., and Finlay, B.B. (2004) Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 3597-3602.
- Dorman, C.J. (2007) H-NS, the genome sentinel. *Nat Rev Microbiol* **5**: 157-161.
- Eichler, K., Buchet, A., Lemke, R., Kleber, H.P., and Mandrand-Berthelot, M.A. (1996) Identification and characterization of the *caiF* gene encoding a potential transcriptional activator of carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**: 1248-1257.
- Elliott, S.J., Wainwright, L.A., McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Deng, Y.K., Lai, L.C., McNamara, B.P., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1998) The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* **28**: 1-4.
- Elliott, S.J., Sperandio, V., Giron, J.A., Shin, S., Mellies, J.L., Wainwright, L., Hutcheson, S.W., McDaniel, T.K., and Kaper, J.B. (2000) The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**: 6115-6126.
- Ellison, D.W., and Miller, V.L. (2006) H-NS represses *inv* transcription in *Yersinia enterocolitica* through competition with RovA and interaction with YmoA. *J Bacteriol* **188**: 5101-5112.
- Friedberg, D., Umanski, T., Fang, Y., and Rosenshine, I. (1999) Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **34**: 941-952.
- Garmendia, J., Frankel, G., and Crepin, V.F. (2005) Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* **73**: 2573-2585.
- Ghosh, P. (2004) Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 771-795.

- Goldberg, M.D., Johnson, M., Hinton, J.C., and Williams, P.H. (2001) Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**: 549-559.
- Gomez-Duarte, O.G., and Kaper, J.B. (1995) A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**: 1767-1776.
- Gophna, U., Ron, E.Z., and Graur, D. (2003) Bacterial type III secretion systems are ancient and evolved by multiple horizontal-transfer events. *Gene* **312**: 151-163.
- Grant, A.J., Farris, M., Alefounder, P., Williams, P.H., Woodward, M.J., and O'Connor, C.D. (2003) Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Mol Microbiol* **48**: 507-521.
- Guttman, J.A., and Finlay, B.B. (2008) Subcellular alterations that lead to diarrhea during bacterial pathogenesis. *Trends Microbiol* **16**: 535-542.
- Haack, K.R., Robinson, C.L., Miller, K.J., Fowlkes, J.W., and Mellies, J.L. (2003) Interaction of Ler at the LEE5 (*tir*) operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **71**: 384-392.
- Hacker, J., and Kaper, J.B. (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* **54**: 641-679.
- Hansen, A.M., and Kaper, J.B. (2009) Hfq affects the expression of the LEE pathogenicity island in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **73**: 446-465.
- Hayward, R.D., Leong, J.M., Koronakis, V., and Campellone, K.G. (2006) Exploiting pathogenic *Escherichia coli* to model transmembrane receptor signalling. *Nat Rev Microbiol* **4**: 358-370.
- Ho, S., Hunt, H., Horton, R., Pullen, J., and Pease, L. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**: 51-59.
- Huang, L.H., and Syu, W.J. (2008) GrlA of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 activates LEE1 by binding to the promoter region. *J Microbiol Immunol Infect* **41**: 9-16.
- Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.
- Iguchi, A., Thomson, N.R., Ogura, Y., Saunders, D., Ooka, T., Henderson, I.R., Harris, D., Asadulghani, M., Kurokawa, K., Dean, P., Kenny, B., Quail, M.A., Thurston, S., Dougan, G., Hayashi, T., Parkhill, J., and Frankel, G. (2009) Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *J Bacteriol* **191**: 347-354.
- Iyoda, S., and Watanabe, H. (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.
- Iyoda, S., and Watanabe, H. (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.
- Iyoda, S., Koizumi, N., Satou, H., Lu, Y., Saitoh, T., Ohnishi, M., and Watanabe, H. (2006) The GrlR-GrlA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and LEE-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 5682-5692.
- Jobichen, C., Li, M., Yerushalmi, G., Tan, Y.W., Mok, Y.K., Rosenshine, I., Leung, K.Y., and Sivaraman, J. (2007) Structure of GrlR and the implication of its EDED motif in mediating the regulation of type III secretion system in EHEC. *PLoS Pathog* **3**: e69.
- Joseph, P., Ratnayake-Lecamwasam, M., and Sonenshein, A.L. (2005) A region of *Bacillus subtilis* CodY protein required for interaction with DNA. *J Bacteriol* **187**: 4127-4139.

- Juhas, M., van der Meer, J.R., Gaillard, M., Harding, R.M., Hood, D.W., and Crook, D.W. (2009) Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev* **33**: 376-393.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**: 123-140.
- Kenny, B., Abe, A., Stein, M., and Finlay, B.B. (1997) Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* **65**: 2606-2612.
- Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, M.J., Nisan, I., Neves, B.C., Bain, C., Wolff, C., Dougan, G., and Frankel, G. (1998) A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *Embo J* **17**: 2166-2176.
- Kresse, A.U., Rohde, M., and Guzman, C.A. (1999) The EspD protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells. *Infect Immun* **67**: 4834-4842.
- Laaberki, M.H., Janabi, N., Oswald, E., and Repoila, F. (2006) Concert of regulators to switch on LEE expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: interplay between Ler, GrlA, HNS and RpoS. *Int J Med Microbiol* **296**: 197-210.
- Levine, M.M., Bergquist, E.J., Nalin, D.R., Waterman, D.H., Hornick, R.B., Young, C.R., and Sotman, S. (1978) *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* **1**: 1119-1122.
- Lio, J.C., and Syu, W.J. (2004) Identification of a negative regulator for the pathogenicity island of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Biomed Sci* **11**: 855-863.
- Lucchini, S., Rowley, G., Goldberg, M.D., Hurd, D., Harrison, M., and Hinton, J.C. (2006) H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathog* **2**: e81.
- Martinez-Laguna, Y., Calva, E., and Puente, J.L. (1999) Autoactivation and environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **33**: 153-166.
- Mayer, M.P. (1995) A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**: 41-46.
- McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1664-1668.
- McDaniel, T.K., and Kaper, J.B. (1997) A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* **23**: 399-407.
- McGuffin, L.J., Bryson, K., and Jones, D.T. (2000) The PSIPRED protein structure prediction server. *Bioinformatics* **16**: 404-405.
- Mekalanos, J.J. (1992) Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* **174**: 1-7.
- Mellies, J.L., Elliott, S.J., Sperandio, V., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1999) The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* **33**: 296-306.
- Mellies, J.L., Barron, A.M., and Carmona, A.M. (2007) Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infect Immun* **75**: 4199-4210.

- Moraes, T.F., Spreter, T., and Strynadka, N.C. (2008) Piecing together the type III injectisome of bacterial pathogens. *Curr Opin Struct Biol* **18**: 258-266.
- Navarre, W.W., Porwollik, S., Wang, Y., McClelland, M., Rosen, H., Libby, S.J., and Fang, F.C. (2006) Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* **313**: 236-238.
- Oshima, T., Ishikawa, S., Kurokawa, K., Aiba, H., and Ogasawara, N. (2006) *Escherichia coli* histone-like protein H-NS preferentially binds to horizontally acquired DNA in association with RNA polymerase. *DNA Res* **13**: 141-153.
- Pallen, M.J., Beatson, S.A., and Bailey, C.M. (2005) Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion. *BMC Microbiol* **5**: 9.
- Poore, C.A., and Mobley, H.L. (2003) Differential regulation of the *Proteus mirabilis* urease gene cluster by UreR and H-NS. *Microbiology* **149**: 3383-3394.
- Porter, M.E., Mitchell, P., Roe, A.J., Free, A., Smith, D.G., and Gally, D.L. (2004) Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, PerA from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **54**: 1117-1133.
- Porter, M.E., Mitchell, P., Free, A., Smith, D.G., and Gally, D.L. (2005) The LEE1 promoters from both enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* can be activated by PerC-like proteins from either organism. *J Bacteriol* **187**: 458-472.
- Reid, S.D., Herbelin, C.J., Bumbaugh, A.C., Selander, R.K., and Whittam, T.S. (2000) Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* **406**: 64-67.
- Saitoh, T., Iyoda, S., Yamamoto, S., Lu, Y., Shimuta, K., Ohnishi, M., Terajima, J., and Watanabe, H. (2008) Transcription of the *ehx* enterohemolysin gene is positively regulated by GrlA, a global regulator encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**: 4822-4830.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory press.
- Sanchez-SanMartin, C., Bustamante, V.H., Calva, E., and Puente, J.L. (2001) Transcriptional regulation of the *orf19* gene and the *tir-cesT-eae* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 2823-2833.
- Schmidt, H., and Hensel, M. (2004) Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* **17**: 14-56.
- Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C., and Abe, A. (2001) Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 11638-11643.
- Shakhnovich, E.A., Davis, B.M., and Waldor, M.K. (2009) Hfq negatively regulates type III secretion in EHEC and several other pathogens. *Mol Microbiol* **74**: 347-363.
- Sharma, V.K., and Zuerner, R.L. (2004) Role of *hha* and *ler* in transcriptional regulation of the *esp* operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **186**: 7290-7301.
- Shifrin, Y., Peleg, A., Ilan, O., Nadler, C., Kobi, S., Baruch, K., Yerushalmi, G., Berdichevsky, T., Altuvia, S., Elgrably-Weiss, M., Abe, C., Knutton, S., Sasakawa, C., Ritchie, J.M., Waldor, M.K., and Rosenshine, I. (2008) Transient shielding of intimin and the type III secretion system of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* by a group 4 capsule. *J Bacteriol* **190**: 5063-5074.
- Sircili, M.P., Walters, M., Trabulsi, L.R., and Sperandio, V. (2004) Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. *Infect Immun* **72**: 2329-2337.

- Stoebel, D.M., Free, A., and Dorman, C.J. (2008) Anti-silencing: overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria. *Microbiology* **154**: 2533-2545.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673-4680.
- Tobe, T., Beatson, S.A., Taniguchi, H., Abe, H., Bailey, C.M., Fivian, A., Younis, R., Matthews, S., Marches, O., Frankel, G., Hayashi, T., and Pallen, M.J. (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.
- Torres, A.G., Milflores-Flores, L., Garcia-Gallegos, J.G., Patel, S.D., Best, A., La Ragione, R.M., Martinez-Laguna, Y., and Woodward, M.J. (2007) Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae (LPF) of *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Med Microbiol* **297**: 177-185.
- Tree, J.J., Wolfson, E.B., Wang, D., Roe, A.J., and Gally, D.L. (2009) Controlling injection: regulation of type III secretion in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* **17**: 361-370.
- Tseng, T.T., Tyler, B.M., and Setubal, J.C. (2009) Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC Microbiol* **9 Suppl 1**: S2.
- Turner, E.C., and Dorman, C.J. (2007) H-NS antagonism in *Shigella flexneri* by VirB, a virulence gene transcription regulator that is closely related to plasmid partition factors. *J Bacteriol* **189**: 3403-3413.
- Ueguchi, C., Suzuki, T., Yoshida, T., Tanaka, K., and Mizuno, T. (1996) Systematic mutational analysis revealing the functional domain organization of *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J Mol Biol* **263**: 149-162.
- Umanski, T., Rosenshine, I., and Friedberg, D. (2002) Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**: 2735-2744.
- Viswanathan, V.K., Hodges, K., and Hecht, G. (2009) Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea. *Nat Rev Microbiol* **7**: 110-119.
- Wachter, C., Beinke, C., Mattes, M., and Schmidt, M.A. (1999) Insertion of EspD into epithelial target cell membranes by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **31**: 1695-1707.
- Wales, A.D., Woodward, M.J., and Pearson, G.R. (2005) Attaching-effacing bacteria in animals. *J Comp Pathol* **132**: 1-26.
- Yip, C.K., and Strynadka, N.C. (2006) New structural insights into the bacterial type III secretion system. *Trends Biochem Sci* **31**: 223-230.
- Yu, R.R., and DiRita, V.J. (2002) Regulation of gene expression in *Vibrio cholerae* by ToxT involves both antirepression and RNA polymerase stimulation. *Mol Microbiol* **43**: 119-134.

# Molecular Characterization of GrlA, a Specific Positive Regulator of *ler* Expression in Enteropathogenic *Escherichia coli*<sup>∇</sup>

Rafael Jiménez, Sara B. Cruz-Migoni, Alejandro Huerta-Saquero,  
V́ctor H. Bustamante, and José L. Puente\*

*Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62210, México*

Received 19 March 2010/Accepted 29 June 2010

**Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infections are characterized by the formation of attaching and effacing (A/E) lesions on the surfaces of infected epithelial cells. The genes required for the formation of A/E lesions are located within the locus of enterocyte effacement (LEE). *Ler* is the key regulatory factor controlling the expression of LEE genes. Expression of the *ler* gene is positively regulated by GrlA, which is also within the LEE. Here, we analyze the mechanism by which GrlA positively regulates *ler* expression and show that in the absence of H-NS, GrlA is no longer essential for *ler* activation, further confirming that GrlA acts in part as an H-NS antagonist on the *ler* promoter. Single-amino-acid mutants were constructed to test the functional significance of the putative helix-turn-helix (HTH) DNA binding motif found in the N-terminal half of GrlA, as well as at the C-terminal domain of the protein. Several mutations within the HTH motif, but not all, completely abolished GrlA activity, as well as specific binding to its target sequence downstream from position -54 in the *ler* regulatory region. Some of these mutants, albeit inactive, were still able to interact with the negative regulator GrlR, indicating that loss of activity was not a consequence of protein misfolding. Additional residues in the vicinity of the HTH domain, as well as at the end of the protein, were also shown to be important for GrlA activity as a transcriptional regulator, but not for its interaction with GrlR. In summary, GrlA consists of at least two functional domains, one involved in transcriptional activation and DNA binding and the other in heterodimerization with GrlR.**

AQ: A

Fn1

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is an important human pathogen that causes childhood diarrhea in developing countries. EPEC belongs to the attaching and effacing (A/E) family of bacterial enteropathogens, together with enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) and the mouse pathogen *Citrobacter rodentium* (35). The A/E pathogens intimately adhere to the membranes of epithelial cells, inducing the destruction of the brush border microvilli and the reorganization of the actin cytoskeleton into characteristic pedestal-like protrusions underneath adherent bacteria. Intimate attachment is mediated by the interaction of intimin, an outer membrane protein, with the translocated intimin receptor (Tir), a bacterial effector protein that is injected into the host cells by a specialized type III secretion system (T3SS) and integrated into the cytoplasmic membrane (19, 26).

The genes required for the generation of the A/E lesion are within a pathogenicity island (PAI) known as the locus of enterocyte effacement (LEE), which comprises 41 genes arranged in five polycistronic operons (*LEE1* to *LEE5*) and other transcriptional units (18). The *LEE1* to *LEE3* operons encode proteins necessary for the assembly of the T3SS. *LEE4* encodes proteins called translocators, responsible for forming a conduit and a channel at the eukaryotic plasma membrane through which effector proteins are translocated from the bacterial cytoplasm to the host cell cytosol. The *LEE5* operon

contains the genes coding for the proteins involved in intimate adherence, Tir and intimin. Seven effectors are encoded in the LEE (Tir, Map, EspF, EspG, EspZ, EspH, and EspB). These proteins are responsible for subverting signaling pathways within the enterocyte, resulting in cytoskeletal rearrangements, disruption of the tight junctions, and altered absorption of nutrients and ions, leading to diarrhea (14, 21, 22). Recent studies have shown that several genes encoding putative effectors are scattered along the core genome of A/E pathogens. In EHEC and EPEC, respectively, 43 and 14 functional genes encoding putative type III secreted non-LEE-encoded effectors have been identified (30, 63).

As the LEE is an essential virulence determinant of A/E pathogenesis, the expression of its genes is under the control of a complex assortment of positive and negative transcriptional regulators (47, 52, 66) and a series of posttranscriptional events (5, 25, 36, 41, 58). It has been well documented that the master positive regulator of LEE genes, as well as of genes located outside the LEE, is the LEE-encoded regulator (*Ler*), whose main function is to counteract the repression exerted by H-NS on these genes (1, 3, 9, 17, 23, 39, 48, 57, 62, 65, 69). It has also been reported that *Ler* represses its own expression in a concentration-dependent fashion (4) and that it can also act as a negative regulator for other genes outside the LEE (1, 61). The key role of *Ler* in LEE regulation makes its gene the main direct target of both positive and negative global regulators, such as H-NS, Hha, IHF, and QseA (9, 20, 59, 60, 69). In addition, several other proteins have been shown to regulate the expression of LEE genes by controlling *ler* expression or other LEE promoters directly, as in the cases of BipA, GadX,

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

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 9 July 2010.



GrvA, EivF, EtrA, Fis, LexA, LrhA, RcsCDB, RegA, SdiA, YhiE, and YhiF (28, 47, 66, 71).

Despite the complexity of the network of proteins involved in LEE gene regulation, two proteins, GrlA and PerC/PchABC, have been shown to specifically derepress and enhance *ler* transcription, even in an *E. coli* K-12 laboratory strain (3, 9, 48, 53). PerC is encoded by the *perABC* operon in the EPEC adherence factor plasmid (pEAF), which is autoregulated by PerA (44), the product of the first *per* gene, which in turn also controls the expression of the *bfp* operon (54, 64). PerC-homologous (Pch) proteins have been shown to play a key role in LEE gene expression in EHEC by directly activating *ler* expression (32). In contrast to EPEC *perC*, these genes are found within prophages that are scattered in the EHEC chromosome (32, 53, 71).

GrlA was first identified as a positive regulator of the LEE in *C. rodentium*, where it was also shown to be essential *in vivo* (15), and was further shown to do so by controlling the expression of *Ler*, which in turn also controls the expression of the *grlRA* operon, forming a positive regulatory loop (3). The role of GrlA in the transcriptional activation of the LEE has also been demonstrated in EPEC and EHEC (29, 36, 40). In addition, GrlA regulates the expression of genes located outside the LEE in EHEC, negatively, as in the case of the flagellar master operon *flhDC* (31), and positively, as in the case of the enterohemolysin *ehxCABD* operon (55). In all cases, the specific mechanism through which GrlA activates its target genes is unknown, but it has been proposed that GrlA could counteract the negative regulation exerted by H-NS upon binding to the regulatory region (V. H. Bustamante, ●, submitted for publication).

The gene encoding GrlA is found in all the LEE sequences currently reported, and homologues are present in a few other genomes, such as in *Salmonella enterica*, *Yersinia bercovieri*, and *Photobacterium luminescens*, sharing approximately 37%, 29%, and 25% identity, respectively, mainly in the N-terminal half of the protein, where a helix-turn-helix (HTH) putative DNA binding motif is found (15). In addition, GrlA shares 23% identity with CaiF, a partially characterized positive transcriptional regulator of the *cai* and *fix* operons that are involved in anaerobic carnitine metabolism in *E. coli* and other *Enterobacteriaceae* (7).

*grlA* is cotranscribed with *grlR*, a gene coding for a negative regulator of LEE gene expression (3, 15, 29, 31, 33, 40). Using a yeast two-hybrid system, it was reported earlier that these two proteins interact with each other, although their functions were unknown at the time (12). This interaction has been confirmed experimentally using biochemical techniques (29, 33, 37). Based on this feature, it has been proposed that GrlR represses LEE gene expression by binding to GrlA, thus preventing its interaction with the *ler* promoter.

Due to its important role in A/E pathogenesis, in this work, we analyzed the mechanism by which GrlA activates *ler* expression in EPEC and further substantiated the notion that GrlA acts in part as an H-NS antagonist by binding specifically in the vicinity of the *ler* promoter. Several amino acids from the putative HTH motif of GrlA were identified as essential for *ler* activation and DNA binding, while some of them were also needed to interact with GrlR. Furthermore, we found that the first 100 amino acids of the protein are sufficient for GrlA-

GrlR heterodimerization, but not for *ler* expression. In addition, charged residues at the C-terminal end of GrlA, as well as at the second predicted helix at the N terminus of the HTH motif, were also important for gene expression. In summary, we have characterized single point mutations that produced GrlA mutants showing diverse phenotypes. This study represents the first systematic study providing evidence of the functional and structural organization of GrlA and the differential roles of different amino acid residues in DNA binding/transcriptional activation and protein-protein interactions.

## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains, plasmids, media, and growth conditions.** The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Bacteria were grown in Luria-Bertani (LB) broth or agar or in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 1% LB. When antibiotics were necessary, they were used at the following concentrations in LB and at half the indicated concentrations in DMEM: ampicillin, 200  $\mu$ g/ml; streptomycin, 100  $\mu$ g/ml; kanamycin, 30  $\mu$ g/ml; tetracycline, 12.5  $\mu$ g/ml. For chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity or Western blot assays, bacterial samples were collected from shaken or static (5% CO<sub>2</sub> atmosphere) cultures grown at 37°C in 50 ml of DMEM supplemented with 1% LB.

**DNA manipulations.** DNA manipulations were performed according to standard protocols (56). Restriction enzymes were obtained from Invitrogen and used according to the manufacturer's instructions. The oligonucleotides used in this work are listed in Table 2 and were synthesized at the oligonucleotide synthesis facility of the Instituto de Biotecnología/UNAM.

**Construction of an EPEC *grlA* and *hns* double mutant.** The EPEC  $\Delta$ *grlA*  $\Delta$ *hns* double mutant was constructed by replacing the *hns* gene with a kanamycin cassette from a  $\Delta$ *grlA* EPEC strain by the one-step method using the lambda red recombinase system (13). The PCR fragment used was amplified with the oligonucleotides Ehns H1P1 and Ehns H2P2 (Table 2) using as a template DNA from plasmid pKD4. The replacement of the *hns* gene was confirmed by PCR.

**Construction of GrlA site-directed mutants and deletions.** Site-specific mutations in *grlA* were introduced by overlapping PCR as previously described (27). Briefly, pairs of complementary oligonucleotides were designed with the desired changes (Table 2). Forward and reverse mutagenic primers were combined in parallel PCRs with primers PMPM3 FW1 and PMPM3 RV1, respectively, using pTEPGrlA1 plasmid DNA as a template. The resulting PCR products were purified and mixed for a second PCR round with primers EPGA-XI and EPCiOrf11R, which allow the amplification of the entire *grlA* gene. Mutations at the GrlA C terminus were introduced in a single PCR using the forward primer EPGA-XI and the corresponding mutagenic reverse primers, which carry the desired changes and a restriction site (Table 2).

Sequential in-frame deletions in *grlA* were generated by overlapping PCR, as described above, except for the second PCR, for which primers XhxbgrlAF and Higr1AR were used. Deletions  $\Delta$ E2-D20,  $\Delta$ G121-S137,  $\Delta$ G125-S137, and  $\Delta$ G131-S137 were generated in a single PCR using the following pairs of primers, respectively: 1-20delgrlAF/Higr1AR, XhxbgrlAF/121-137delgrlAR, EPGA-XI/EPGA $\Delta$ 125R, and EPGA-XI/EPGA $\Delta$ 131R. The resulting PCR products were purified and digested with XhoI and HindIII and cloned into pMPM-T3 digested with the same enzymes. Each construct was verified by DNA sequencing.

**Protein secretion assay.** Fifty milliliters of DMEM supplemented with 1% LB was inoculated with 500  $\mu$ l of an LB overnight culture of each strain and incubated at 37°C with agitation. Samples were collected when the cultures reached an optical density (OD) of 1.0. Culture supernatants were recovered after centrifugation of 1.5 ml of each culture for 5 min at 18,000  $\times$  g. The secreted proteins were precipitated from the culture supernatant with 10% trichloroacetic acid (TCA) at 4°C overnight and concentrated by centrifugation at 20,000  $\times$  g at room temperature. The resulting precipitated proteins were analyzed by 12% SDS-PAGE.

**CAT assay.** Samples from shaken or static cultures were collected at an OD of 1 or after 6 h, respectively. CAT assays and protein quantification to determine CAT specific activities were performed as described previously (44).

**Western blotting.** Whole-cell extracts were prepared by resuspending bacterial pellets from culture samples of the strains tested. Proteins were separated by 12% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (Millipore) using a semidry transfer apparatus (Bio-Rad). The membranes were blocked in 5% nonfat milk and incubated with a 1:10,000 dilution of polyclonal anti-maltose binding protein (MBP) (New England Biolabs), a 1:10,000 dilution of monoclo-

AQC:B

TI/AQC:C

T2



TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study

| Strain                        | Relevant characteristics  | Reference or source            |
|-------------------------------|---|--------------------------------|
| <b>EPEC</b>                   |   |                                |
| E2348/69                      | WT  | 38                             |
| JPEP24                        | E2348/69 $\Delta$ ler::Km   | Bustamante et al., submitted   |
| JPEP35                        | E2348/69 carrying an in-frame deletion of <i>grlA</i>   | A. Huerta, unpublished         |
| JPEP36                        | E2348/69 $\Delta$ hns::Km   | A. Vázquez, unpublished        |
| JPEP37                        | E2348/69 carrying mutants in $\Delta$ grlA and $\Delta$ hns::Km   | This study                     |
| JPEP38                        | $\Delta$ grlA $\Delta$ hns lacking the EAF plasmid  | This study                     |
| JPEP30                        | E2348/69 lacking the EAF plasmid  | Bustamante et al., submitted   |
| <b>E. coli</b>                |   |                                |
| MC4100                        | F <sup>-</sup> <i>araD139</i> D( <i>argF-lac</i> )U169 <i>rpsL150</i> (Strr) <i>relA1</i> <i>flbB5301</i> <i>deoC1</i> <i>ptsf25</i> <i>rbsR</i>                                  | 10                             |
| JPMC1                         | MC4100 carrying an in-frame deletion of $\Delta$ hns  |                                |
| BL21 pLys                     | F <sup>-</sup> <i>ompT</i> ( <i>lon</i> ) <i>hsdS<sub>B</sub></i> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) <i>gal</i> <i>dcm</i> (IDE3) pLysS(Cm <sup>r</sup> ) | Invitrogen                     |
| <b>Plasmids</b>               |   |                                |
| pKD46                         | Plasmid expressing the lambda Red recombinase; Ap <sup>r</sup>  | 13                             |
| pKD4                          | Template plasmid containing the Km cassette   | 13                             |
| pler-260                      | pKK232-8 derivative containing a <i>ler-cat</i> transcriptional fusion from nucleotides -260 to +217 with respect to the transcriptional start site                               | Bustamante et al., submitted   |
| pT6-HNS                       | pMPM-T6 $\Omega$ derivative expressing WT H-NS  | 8                              |
| pT6-HNS/G113D                 | pMPM-T6 $\Omega$ derivative expressing H-NS <sup>G113D</sup>  | 8                              |
| pMPM-T3                       | Low-copy-number cloning vector; Tc <sup>r</sup>   | 45                             |
| pTEPGrlA1                     | pMPM-T3 derivative containing the structural <i>grlA</i> gene including its ribosomal binding site (RBS) expressed under the <i>lac</i> promoter                                  | Bustamante et al., submitted   |
| pTEPGrlA1/P23A                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA P23A   | This study                     |
| pTEPGrlA1/L24A                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA L24A   | This study                     |
| pTEPGrlA1/Y25A                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA Y25A   | This study                     |
| pTEPGrlA1/S29A                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA S29A   | This study                     |
| pTEPGrlA1/W31A                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA W31A   | This study                     |
| pTEPGrlA1/C32A                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA C32A   | This study                     |
| pTEPGrlA1/R41A                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA R41A   | This study                     |
| pTEPGrlA1/N42A                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA N42A   | This study                     |
| pTEPGrlA1/I44A                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA I44A   | This study                     |
| pTEPGrlA1/I44S                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA I44S   | This study                     |
| pTEPGrlA1/E46A                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA E46A   | This study                     |
| pTEPGrlA1/F48A                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA F48A   | This study                     |
| pTEPGrlA1/F48S                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA F48S   | This study                     |
| pTEPGrlA1/I50A                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA I50A   | This study                     |
| pTEPGrlA1/I50S                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA I50S   | This study                     |
| pTEPGrlA1/L52A                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA L52A   | This study                     |
| pTEPGrlA1/R54A                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA R54A   | This study                     |
| pTEPGrlA1/R54S                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA R54S   | This study                     |
| pTEPGrlA1/S56A                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA S56A   | This study                     |
| pTEPGrlA1/Y61A                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA Y61A   | This study                     |
| pTEPGrlA1/R65A                | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA R65A   | This study                     |
| pTEPGrlA1/R132A               | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA R132A  | This study                     |
| pTEPGrlA1/R133A               | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA R133A  | This study                     |
| pTEPGrlA1/K134A               | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA K134A  | This study                     |
| pTEPGrlA1/K135A               | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA K135A  | This study                     |
| pTEPGrlA1/E136A               | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA E136A  | This study                     |
| pTEPGrlA1/ $\Delta$ 2-20      | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA $\Delta$ E2-D20  | This study                     |
| pTEPGrlA1/ $\Delta$ 21-40     | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA $\Delta$ G21-S40   | This study                     |
| pTEPGrlA1/ $\Delta$ 41-60     | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA $\Delta$ R41-T60   | This study                     |
| pTEPGrlA1/ $\Delta$ 61-80     | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA $\Delta$ Y61-N80   | This study                     |
| pTEPGrlA1/ $\Delta$ 81-100    | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA $\Delta$ L81-I100  | This study                     |
| pTEPGrlA1/ $\Delta$ 101-120   | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA $\Delta$ E101-V120   | This study                     |
| pTEPGrlA1/ $\Delta$ 121-137   | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA $\Delta$ G121-S137   | This study                     |
| pTEPGrlA1/ $\Delta$ 125-137   | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA $\Delta$ I125-S137   | This study                     |
| pTEPGrlA1/ $\Delta$ 131-137   | pTEPGrlA1 derivative expressing GrIA $\Delta$ L131-S137   | This study                     |
| pGEX-4T1                      | Cloning vector for constructing GST fusions   | Amersham Bioscience            |
| pGST-GrlR                     | pGEX-4T1 derivative expressing GST-GrlR under the control of the IPTG-inducible promoter <i>ptac</i>  | Lara et al., unpublished data  |
| pBAD-HNS-FLAGHis <sub>6</sub> | pBADMycHis derivative expressing H-NS-FLAGHis <sub>6</sub> under the control of the arabinose-inducible pBAD promoter   | Bustamante et al., unpublished |
| pMAL-c2X                      | Cloning vector for constructing MBP fusions   | New England Biolabs            |
| pMBP-GrlA                     | pMAL-c2X derivative expressing MBP-GrlA under the control of IPTG-inducible promoter <i>ptac</i>  | This study                     |
| pMBP-GrlA/P23A                | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA P23A   | This study                     |

Continued on following page

TABLE 1—Continued

| Strain                      | Relevant characteristics                                    | Reference or source |
|-----------------------------|---|---------------------|
| pMBP-GrlA/L24A              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA L24A               | This study          |
| pMBP-GrlA/Y25A              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA Y25A               | This study          |
| pMBP-GrlA/S29A              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA S29A               | This study          |
| pMBP-GrlA/W31A              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA W31A               | This study          |
| pMBP-GrlA/C32A              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA C32A               | This study          |
| pMBP-GrlA/R41A              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA R41A               | This study          |
| pMBP-GrlA/N42A              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA N42A               | This study          |
| pMBP-GrlA/I44A              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA I44A               | This study          |
| pMBP-GrlA/I44S              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA I44S               | This study          |
| pMBP-GrlA/E46A              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA E46A               | This study          |
| pMBP-GrlA/F48A              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA F48A               | This study          |
| pMBP-GrlA/F48S              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA F48S               | This study          |
| pMBP-GrlA/I50A              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA I50A               | This study          |
| pMBP-GrlA/I50S              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA I50S               | This study          |
| pMBP-GrlA/L52A              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA L52A               | This study          |
| pMBP-GrlA/R54A              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA R54 A              | This study          |
| pMBP-GrlA/R54S              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA R54S               | This study          |
| pMBP-GrlA/S56A              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA S56A               | This study          |
| pMBP-GrlA/Y61A              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA Y61A               | This study          |
| pMBP-GrlA/R65A              | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA R65A               | This study          |
| pMBP-GrlA/R132A             | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA R132A              | This study          |
| pMBP-GrlA/R133A             | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA R133A              | This study          |
| pMBP-GrlA/K134A             | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA K134A              | This study          |
| pMBP-GrlA/K135A             | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA K135A              | This study          |
| pMBP-GrlA/E136A             | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA E136A              | This study          |
| pMBP-GrlA/ $\Delta$ 2-20    | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA $\Delta$ E2-D20    | This study          |
| pMBP-GrlA/ $\Delta$ 21-40   | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA $\Delta$ G21-S40   | This study          |
| pMBP-GrlA/ $\Delta$ 41-60   | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA $\Delta$ R41-T60   | This study          |
| pMBP-GrlA/ $\Delta$ 61-80   | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA $\Delta$ Y61-N80   | This study          |
| pMBP-GrlA/ $\Delta$ 81-100  | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA $\Delta$ L81-I100  | This study          |
| pMBP-GrlA/ $\Delta$ 101-120 | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA $\Delta$ E101-V120 | This study          |
| pMBP-GrlA/ $\Delta$ 121-137 | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA $\Delta$ G121-S137 | This study          |
| pMBP-GrlA/ $\Delta$ 125-137 | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA $\Delta$ I125-S137 | This study          |
| pMBP-GrlA/ $\Delta$ 131-137 | pMBP-GrlA derivative expressing MBP-GrlA $\Delta$ L131-S137 | This study          |

nal anti-Tir (kindly provided by B. B. Finlay), a 1:10,000 dilution of anti-EscJ (kindly provided B. González-Pedrajo), a 1:10,000 dilution of anti-EspA (kindly provided by J. B. Kaper), and a 1:10,000 dilution of anti-DnaK (Invitrogen). The goat anti-rabbit immunoglobulin G (Pierce) and rabbit anti-mouse immunoglobulin G (Pierce) secondary antibodies were used at a 1:10,000 dilution. Positive signals were visualized using the Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin-Elmer), following the manufacturer's instructions, and scientific imaging films (Kodak).

**Pulldown assays.** Pulldown assays to analyze the interaction between GrlR and GrlA were carried out using as bait the GrlR protein fused to glutathione-S-transferase (GST-GrlR), whose expression is under the control of the *tac* promoter in plasmid pGEX-4T1 (Amersham Biosciences), and as prey the wild-type (WT) GrlA and its different mutants fused to MBP-GrlA, also expressed from the *tac* promoter in plasmid pMAL-c2x (New England Biolabs). Expression of the GST-GrlR and MBP-GrlA proteins was induced for 4 h at 30°C with 0.5 and 0.3 mM isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG), respectively, in *E. coli* BL21 pLys grown in 50 ml of LB after reaching an OD of 0.6. Cells were collected by centrifugation at 10,000  $\times$  g at 4°C and resuspended in 4 ml of PBS (140 mM NaCl, 4.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.3 mM KCl). Total cell extracts were prepared by sonication and centrifugation at 18,000  $\times$  g at 4°C. Three hundred microliters of the extract containing GST-GrlR was mixed with 50  $\mu$ l of glutathione-Sepharose 4B beads (Amersham Biosciences) and incubated at 4°C for 1 h with agitation; unbound proteins were removed by washing them five times with 1 ml of cold PBS. One milliliter of the bacterial extracts containing MBP-GrlA proteins was added to the glutathione-Sepharose-GST-GrlR beads and incubated at 4°C for 2 h. Unbound proteins were removed by washing them five times with 1 ml of cold phosphate-buffered saline (PBS), and the resultant protein complexes were subjected to 12% SDS-PAGE.

**Construction and purification of MBP-GrlA fusion proteins.** For constructing MBP-GrlA recombinant proteins, WT and mutant *grlA* genes were amplified by PCR using as templates DNA of the pTEPGrlA1-derived plasmids (Table 1) and primers MBPCgrlAF and EPCOrf11R. The PCR products were purified from

agarose gels, digested with XbaI-HindIII, and cloned in frame at the 3' end of the *malE* gene in pMAL-c2x (New England Biolabs). The correct in-frame cloning of *grlA*, as well as the presence of each mutation, was verified by DNA sequencing.

MBP-GrlA proteins were overexpressed in *E. coli* BL21 grown in 100 ml of LB with 0.2% glucose, when the culture reached an OD of 1.0, by adding 0.3 mM IPTG for 4 h at 30°C. Cells were harvested by centrifugation at 10,000  $\times$  g at 4°C and then washed once with column buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM 2-mercaptoethanol), resuspended in 10 ml of the same buffer, and broken by sonication. Cellular debris was eliminated from the cell extracts by centrifugation. MBP-GrlA proteins were bound to amylose resin (New England Biolabs), washed with 100 ml of column buffer to remove nonspecific bound proteins, and eluted with column buffer containing 10 mM maltose.

**EMSA.** Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs) were performed by mixing approximately 100 ng of each DNA fragment with increasing concentrations of purified WT or mutant MBP-GrlA proteins in binding buffer containing 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.5 mM EDTA, 10  $\mu$ g/ml bovine serum albumin (BSA), and 5% glycerol. These reaction mixtures were incubated for 20 min at room temperature and then separated by electrophoresis in 5% polyacrylamide gels in 0.5 $\times$  Tris-borate-EDTA buffer. DNA bands were stained with ethidium bromide and visualized with an Alpha-Imager UV transilluminator (Alpha Innotech Corp.).

For competitive EMSAs, the *ler*-50/+217 fragment was first incubated with 0.45  $\mu$ M H-NS-FLAGHis<sub>6</sub> (H-NS-FH) for 15 min, and then increasing concentrations of MBP-GrlA were added (0, 0.17, 0.34, 0.51, 0.68, 0.85, and 1  $\mu$ M) and incubated for an additional 15 min at room temperature. The complexes were visualized as described above. To detect free H-NS-FH and H-NS-FH-DNA complexes, Western blotting was performed with  $\alpha$ -FLAG M2 antibodies (Sigma) as described above. H-NS-FH was purified from *E. coli* BL21 carrying plasmid pBAD-HNS-FLAGHis<sub>6</sub> (Table 1) as described previously (3).

Specific binding of GrlA to the *ler* regulatory region was confirmed by com-

TABLE 2. Oligonucleotides used in this study

| Oligonucleotide      | Sequence <sup>a</sup>  |
|----------------------|--|
| ler260F.....         | CTCCTGGgatccACTCGCT  |
| Orf1-H3-R.....       | GCTCTATaagcttAATGTATG  |
| ler50BHIFW.....      | ATCATggatccTAAATGGATTTTAAAAA                                 |
| ler-50 RV.....       | AAATCCATTTAAAAATCAATG  |
| dnaJ FW.....         | GGCGGCGGTTTTGGCGGCGCG  |
| dnaJ RV.....         | AGTCTGCGGCTGTGTACCTGG  |
| EPCiOrf11R.....      | TACTAAGAaagcttCGTCTAACTCTCC                                  |
| EPGA-XI.....         | GCCAAATTTctcgagCCATTAATTAT                                   |
| MBPCrgrlAF.....      | ATAAAAAAGAACAtctagaATGGAATCTAAA                              |
| EPAP23A-F.....       | ACGATGGTGAAgCTCTGTATATCTTGG                                  |
| EPAP23A-R.....       | CCAAGATATACAGAGcTTCACCATCGT                                  |
| EPAL24A-F.....       | CGATGGTGAAcCTgcGTATATCTTGGTT                                 |
| EPAL24A-R.....       | AACCAAGATATACgcAGGTTCCACCATCG                                |
| EPAY25A-F.....       | GGTGAAcCTCTGgcTATCTTGGTTTTCTC                                |
| EPAY25A-R.....       | GAGAAACCAAGATAgcCAGAGGTTCCACC                                |
| EPGAS29AF.....       | TATATCTTGGTTgCTCTTTGGTGTAATA                                 |
| EPGAS29AR.....       | TTTACACCAAAGAGcAACCAAGATATA                                  |
| EPAW31A-F.....       | CTTGGTTTTCTCTTgcGTGTAATTCAGG                                 |
| EPAW31A-R.....       | CCTGCAATTTACACgcAAGAGAAACCAAG                                |
| EPGAC32AF.....       | GTTTCTCTTTGGgcTAAATTGCAGGAG                                  |
| EPGAC32AR.....       | CTCCTGCAATTTAgcCCAAAGAGAAAC                                  |
| EPGAR41AF.....       | AAATGGATTTCTgctAATGATATTGCC                                  |
| EPGAR41AR.....       | GGCAATATCATTagcAGAAATCCATTT                                  |
| EPAN42A-F.....       | TGGATTTCTCGCgcTGATATTGCCGAAG                                 |
| EPAN42A-R.....       | CTTCGGCAATATCAgcGCGAGAAATCCA                                 |
| EPAI44A-F.....       | TCTCGCAATGATgcTGCCGAAGCATTC                                  |
| EPAI44A-R.....       | GAATGCTTCGGCgcATCATTGCGAGA                                   |
| EPAE46A-F.....       | GCAATGATATTGCCgcAGCATTCCGGTATA                               |
| EPAE46A-R.....       | TATACCGAATGCTgcGGCAATATCATTGC                                |
| EPAF48A-F.....       | ATTGCCGAAGCgcCGGTATAAACCTG                                   |
| EPAF48A-R.....       | CAGGTTTATAACCGgcTGCTTCGGCAAT                                 |
| EPAI50A-F.....       | GAAGCATTCGGTgcAAACCTGAGGAGA                                  |
| EPAI50A-R.....       | TCTCCTCAGGTTTgcACCGAATGCTTC                                  |
| EPAL52A-F.....       | TTCCGGTATAAACgcGAGGAGAGCATCA                                 |
| EPAL52A-R.....       | TGATGCTCTCCTCgcGTTTATAACCGAA                                 |
| EPAR54A-F.....       | ATAAACCTGAGGgcAGCATCATTTATT                                  |
| EPAR54A-R.....       | AATAAATGATGCTgcCCTCAGGTTTAT                                  |
| EPAR56S-F.....       | CCTGAGGAGAGCgcATTTATTATAAC                                   |
| EPAR56S-R.....       | GTTATAATAAATgcTGCTCTCCTCAGG                                  |
| EPGAY61AF.....       | TTTATTATAACTgctATATCGAGAAGA                                  |
| EPGAY61AR.....       | TCTTCTCGATATagcAGTTATAATAAA                                  |
| EPGAR65AF.....       | TATATATCGAGAgctAAAAGAAAAAATT                                 |
| EPGAR65AR.....       | AATTTTTTCTTTAgcTCTCGATATATA                                  |
| XhxbgrlAF.....       | CGCGGctcgagGAGGAtctagaATGGAATCTAAAA                          |
| HigrIAR.....         | ACCCGGGgagcttCGTCTAACTCTCCTT                                 |
| 1-20delgrlAF.....    | CGCGGctcgagGAGGAtctagaATGGGTGAACCTCTGT                       |
| 21-40delgrlAF.....   | GAATTACGATCGCAATGATATTGCCGAAGC                               |
| 21-40delgrlAR.....   | TATCATTGCGATCGTAATTTCTTACTGAGT                               |
| 41-60delgrlAF.....   | ATGGATTTCTTATATATCGAGAAGAAAAGA                               |
| 41-60delgrlAR.....   | TCGATATATAAGAAATCCATTTCTCCTGCA                               |
| 61-80delgrlAF.....   | TATTATAACTTTGCATTATAAGCGCCTTGA                               |
| 61-80delgrlAR.....   | TATAATGCAAAGTTATAATAAATGATGC                                 |
| 81-100delgrlAF.....  | TTATGGTAATGAAAGTCCTGGATCAACCGG                               |
| 81-100delgrlAR.....  | CAGGACTTTTCATTACCATAACTAACATATC                              |
| 101-120delgrlAF..... | GGTTCCGATAGGACAGTCTAATATCTGGAA                               |
| 101-120delgrlAR..... | TAGACTGTCTATCGGAACCGCCTCAAGGT                                |
| 121-137delgrlAR..... | CCCGGGaagcttCTACACAATACCATTA                                 |
| EPGAΔ125R.....       | TCATaagcttctaGATATTGAGCTGTCC                                 |
| EPGAΔ131R.....       | CCTTaaagcttctaCAAGATCATTTCGTT                                |
| EPGAR132AR.....      | CCTTaaagcttctaACTCTCCTTTTTCCGCGCCAAGATCAT                    |
| EPGAR133AR.....      | CCTTaaagcttctaACTCTCCTTTTTCCGCCCTCAAGAT                      |
| EPGAK134AR.....      | CCTTaaagcttctaACTCTCCTTTTCCCGCCTCAA                          |
| EPGAK135AR.....      | CCTTaaagcttctaACTCTCCGCTTTCCGCTT                             |
| EPGAE136AR.....      | CCTTaaagcttctaACTCGCCTTTTTCCG                                |
| PMPM3 FW1.....       | GTGCCGTAAAGCACTAAATCGG                                       |
| PMPM3 RV1.....       | GCGTTATCCCCTGATTCTGTGG                                       |
| Ehns H1P1.....       | CACCCCAATATAAGTTTTGAGATTACTACAATGAGCGAAGCttaggctggagctgcttcg |
| Ehns H2P2.....       | GATTTTAAGCAAGTGCAATCTACAAAAGATTATTGCTTcatatgaatatccctcttag   |

<sup>a</sup> The sequence in lowercases indicate nucleotides that were modified with respect to the WT sequence.

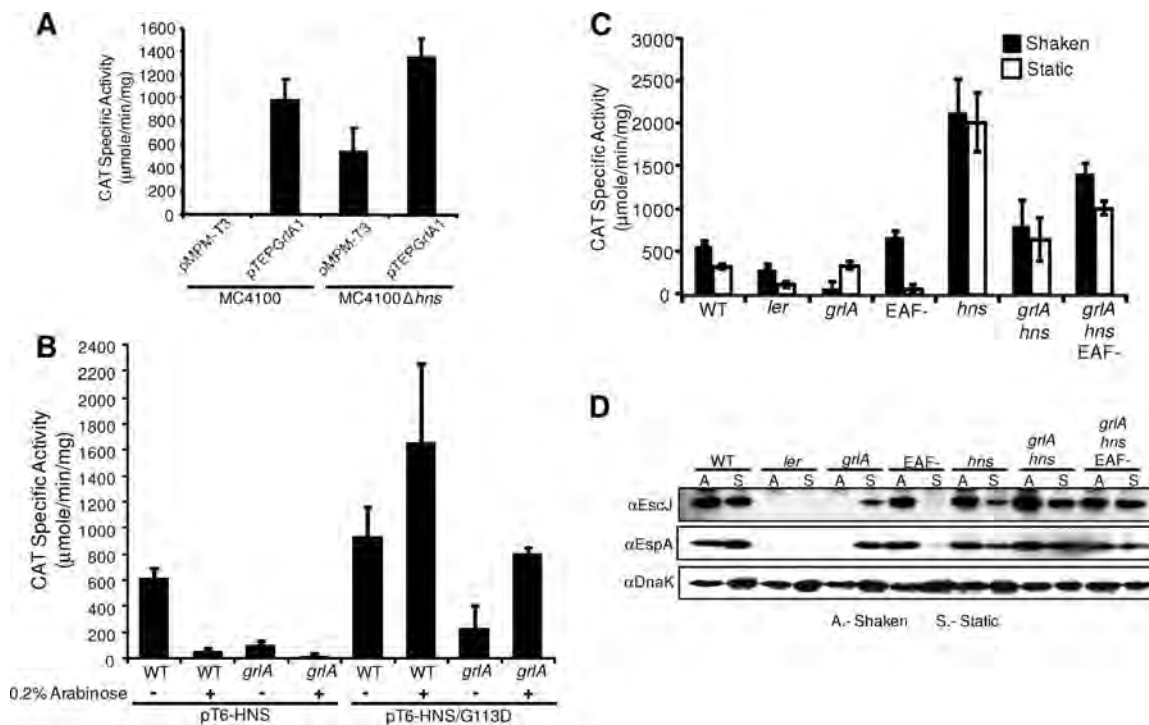


FIG. 1. LEE gene expression is GrlA independent in the absence of H-NS. (A) The expression of a *ler-cat* transcriptional fusion (pler-260) was analyzed in *E. coli* MC4100 and its isogenic  $\Delta hns$  mutant carrying the empty vector pMPPM-T3 or its derivative pTEPGrlA1. CAT specific activity was determined from samples collected from bacterial cultures grown in 50 ml of DMEM with shaking at an optical density at 600 nm ( $OD_{600}$ ) of 1. The results shown are the means and standard deviations of three independent experiments done in duplicate. (B) The expression of the *ler-cat* fusion was determined from samples collected from WT EPEC and  $\Delta grlA$  EPEC carrying pT6-HNS or pT6-HNS/G113D, expressing WT H-NS or its dominant negative H-NS<sup>G113D</sup>, respectively. CAT specific activity was determined as for panel A in the absence (–) or presence (+) of 0.2% arabinose. (C) The expression levels of the *ler-cat* fusion in WT EPEC and its  $\Delta ler$ ,  $\Delta grlA$ , pEAF<sup>–</sup>,  $\Delta hns$ ,  $\Delta hns \Delta grlA$ , and  $\Delta grlA \Delta hns$  pEAF<sup>–</sup> isogenic derivatives were determined from samples collected from bacterial cultures grown in DMEM at 37°C with agitation at an  $OD_{600}$  of 1 (black bars) or from static cultures at 37°C under a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere after 6 h (white bars). The results are the averages of three experiments done in duplicate. (D) Total cell extracts were prepared from bacterial pellets of the same cultures grown under shaken (A) and static (S) conditions as described above and then resolved by 12% SDS-PAGE. Expression of EscJ and EspA was analyzed by Western immunoblotting using polyclonal anti-EscJ and anti-EspA antibodies. As a loading control, DnaK was also detected using a monoclonal anti-DnaK antibody.

peting MBP-GrlA (0.5  $\mu$ M) binding to the <sup>32</sup>P-5'-end-labeled *ler*-50/+217 probe with 10, 20, 30, and 40-fold excess of the same unlabeled PCR-derived DNA fragment as a specific competitor or of the unlabeled, nonspecific *ler*-260/-50 fragment for 20 min at room temperature. Samples were resolved in a 5% polyacrylamide gel at room temperature and visualized by autoradiography.

## RESULTS

**GrlA counteracts the repression exerted by H-NS on the *ler* promoter.** We previously proposed that GrlA counteracts the H-NS-mediated repression on the *ler* promoters of both *C. rodentium* and EPEC, probably by interacting with a sequence located near the promoter (3, 15; Bustamante et al., submitted). As seen in Fig. 1A, the specific GrlA-mediated activation of the EPEC *ler* promoter can be recapitulated with a *ler-cat* transcriptional fusion in the presence of a plasmid expressing EPEC GrlA (pTEPGrlA1) (Table 1) in *E. coli* K-12 strain MC4100, where this promoter shows only background levels of expression in the presence of the control vector, pMPPM-T3. In addition, as previously observed, when introduced into *E. coli* MC4100  $\Delta hns$  (JPMC1), the *ler* promoter is derepressed, reaching an activity much higher than the background level seen in the WT strain. However, the activity of the *ler* promoter is further enhanced in the presence of GrlA, suggesting that

GrlA may also be facilitating transcriptional activation by the RNA polymerase or counteracting additional repressors (Fig. 1A) (Bustamante et al., submitted).

In order to further analyze the role of GrlA in overcoming H-NS repression at the *ler* promoter in the EPEC background, an EPEC  $\Delta grlA \Delta hns$  double mutant (JPEP37) was generated as described in Materials and Methods. To assess the role of GrlA in *ler* activation in the absence of H-NS, expression of the *ler-cat* transcriptional fusion was then analyzed in WT,  $\Delta ler$ ,  $\Delta grlA$ , pEAF<sup>–</sup>-cured (pEAF<sup>–</sup>),  $\Delta hns$ , and  $\Delta grlA \Delta hns$  EPEC and in pEAF<sup>–</sup>  $\Delta grlA \Delta hns$  strains (Table 1) grown in static and shaken cultures in DMEM. Static cultures were used as a control, as under this growth condition, *ler* activation in EPEC is mediated by PerC, a pEAF<sup>–</sup>-encoded regulator that is co-regulated with the *bfp* operon by PerA in a GrlA-independent manner (Bustamante et al., submitted). Consistent with our previous observations, *ler* was expressed under both growth conditions in WT EPEC, whereas its expression was significantly reduced under shaken and static growth conditions in the  $\Delta grlA$  (JPEP35) and pEAF<sup>–</sup> (JPEP30) strains, respectively (Fig. 1C). Expression in the  $\Delta ler$  strain (JPEP24) was partially reduced under both growth conditions. In contrast, in the  $\Delta hns$  mutant (JPEP36), *ler* expression showed a 4-fold increase with



respect to the expression obtained in the WT strain independently of the growth conditions, further confirming that both regulators act as H-NS antagonists. However, in the  $\Delta grlA \Delta hns$  double mutant (JPEP37), as well as in the  $\Delta grlA \Delta hns$  pEAF<sup>-</sup> triple mutant (JPEP38), *ler* expression showed a 2-fold to 3-fold increase in comparison to the WT strain under both growth conditions. The transcriptional activities in these strains were not as high as in the  $\Delta hns$  single mutant (JPEP36), consistent with the notion that GrlA enhances *ler* expression even in the absence of H-NS (Fig. 1C).

To monitor the expression of Ler-regulated genes within the LEE, we analyzed the protein levels of EscJ (*LEE2*) and EspA (*LEE4*) by Western blotting in the different strains grown in shaken or static cultures (Fig. 1D). Expression of EscJ and EspA was found to be similar under both growth conditions in the WT strain, while their synthesis was abolished, as expected, in the  $\Delta ler$  mutant (JPEP24). In contrast, in the  $\Delta grlA$  (JPEP25) and pEAF<sup>-</sup> (JPEP30) strains, EscJ and EspA were expressed only under static or shaken growth conditions, respectively, reflecting that *ler* expression is mediated by PerC in the absence of GrlA in static culture and by GrlA in the absence of pEAF, and thus of the *per* operon, in shaken cultures. In agreement with the transcriptional activity of the *ler* promoter shown in Fig. 1C, EscJ and EspA were expressed under both growth conditions in all the  $\Delta hns$  backgrounds, even in the absence of GrlA or both GrlA and PerC (Fig. 1D).

These observations were further supported by mimicking the *hns* mutation in WT EPEC by inducing the synthesis of H-NS<sup>G113D</sup>, a mutant derivative of H-NS that carries a mutation that abolishes DNA binding without affecting oligomerization, with WT H-NS then acting as a dominant negative (68). We have used this strategy successfully to inhibit the H-NS function at a defined time of the culture, preventing, at least in part, the pleiotropic and potentially deleterious effects of a chromosomal *hns* deletion (8). WT EPEC E2348/69 and its  $\Delta grlA$  derivative containing a *ler-cat* fusion and plasmids pT6-HNS and pT6-HNS<sup>G113D</sup> were grown in DMEM with or without arabinose to induce, or not, the expression of WT H-NS and H-NS<sup>G113D</sup>. The CAT specific activity derived from the transcriptional activity of the *ler-cat* fusion was determined from whole-cell extracts prepared from culture samples taken after 5 h. A slight increase in *ler* expression was observed in WT EPEC upon induction of H-NS<sup>G113D</sup>, but not of WT H-NS. In contrast, *ler* expression was 4-fold higher upon induction of the dominant-negative version of H-NS (H-NS<sup>G113D</sup>) than with the WT protein (Fig. 1B).

These results confirm that GrlA acts as an H-NS antagonist on the *ler* promoter and also support the notion that GrlA, in addition to acting as an antirepressor, further enhances *ler* expression, either by acting as a classical activator or by counteracting the negative regulation exerted by additional repressors.

**MBP-GrlA directly interacts with the *ler* regulatory region and displaces H-NS.** The role of GrlA in the regulation of the *LEE1* (*ler*) (3, 29, 36, 40), *flhDC* (31), and *ehxCABD* (55) operons, as well as the presence of a predicted HTH DNA binding domain at the N terminus of the protein, which shares homology with a known DNA binding activator, such as CaiF (3, 7), strongly suggests that it exerts its regulatory function by specifically binding to a DNA sequence motif in the *ler* regu-

latory region. However, previous attempts to demonstrate specific binding of purified GrlA to its reported regulatory sequence targets have been unsuccessful (3, 55) or not fully conclusive, as more recently it was shown that a recombinant GST-GrlA fusion protein formed protein-DNA complexes with the *LEE1* regulatory region even in the absence of the HTH motif and also shifted an unrelated band (29).

We further analyzed the *in vitro* DNA binding activity of the MBP-GrlA fusion protein by modifying the purification procedure and binding reactions, as indicated in Materials and Methods. The MBP-GrlA fusion is fully functional, as it is still capable of complementing the EPEC  $\Delta grlA$  mutant and of interacting with GrlR (see below). EMSAs were performed by mixing increasing concentrations of amylose affinity-purified MBP-GrlA and 100 ng of PCR DNA fragments spanning the *ler* regulatory region between positions -260 and +217 (*ler*-260/+217) contained in the *ler-cat* fusion and, as a negative control, the EPEC structural *dnaJ* gene. As shown in Fig. 2A, GrlA specifically bound to the *ler* fragment in a concentration-dependent manner, starting at a concentration of 0.4  $\mu$ M, while no shifting was seen for the control *dnaJ* fragment even at the highest concentration of the protein (1  $\mu$ M). F2

We previously determined that GrlA and H-NS were still able to activate and repress *ler* transcriptional fusions containing the *ler* regulatory region from positions -54 to +217 from EPEC (Bustamante et al., submitted) or -40 to -216 from *C. rodentium* (3), respectively, suggesting that the GrlA and H-NS recognition sequences are located in the vicinity of the *ler* promoter or downstream from it. Based on these results, to further delimit the GrlA binding motif in the EPEC *ler* regulatory region, two fragments containing the sequences between positions -260 and -50 (*ler*-260/-50) and -50 and +217 (*ler*-50/+217) were obtained by PCR and used in EMSAs, as described for the whole fragment. In agreement with the GrlA-mediated activation of a *ler-cat* transcriptional fusion containing the sequence between positions -50 and +217, MBP-GrlA was only able to bind to the fragment spanning these positions (Fig. 2B). Specific binding of GrlA to this region was also tested by competing binding of MBP-GrlA to the <sup>32</sup>P-5'-end-labeled *ler*-50/+217 probe with 10- to 40-fold excess of unlabeled specific and nonspecific fragments. As shown in Fig. 2C, only the unlabeled specific fragment was able to disrupt the interaction of GrlA with the labeled probe, further confirming that GrlA specifically interacts with the *ler* regulatory region downstream of position -50. Moreover, H-NS-His<sub>6</sub> shifted only the *ler* fragment spanning positions -50 to +217 (Fig. 1D). To further assess the role of GrlA as an H-NS antagonist in the *ler* regulatory region, we performed competitive EMSAs by first allowing the specific interaction of H-NS-FH with the *ler*-50/+217 fragment, followed by the addition of increasing concentrations of MBP-GrlA, as described in Materials and Methods. The addition of MBP-GrlA shifted the H-NS-DNA complex to a slower-migrating complex similar to that formed by MBP-GrlA alone (Fig. 2E, top) and displaced H-NS-FH from the DNA fragment, as shown by Western blotting using an anti-FLAG antibody (Fig. 2E, bottom).

**The C-terminal domain of GrlA is needed for transcriptional activation, but not for the interaction with GrlR.** Transcriptional regulators, like most proteins, can be modular and have more than one functional domain. According to the pre-

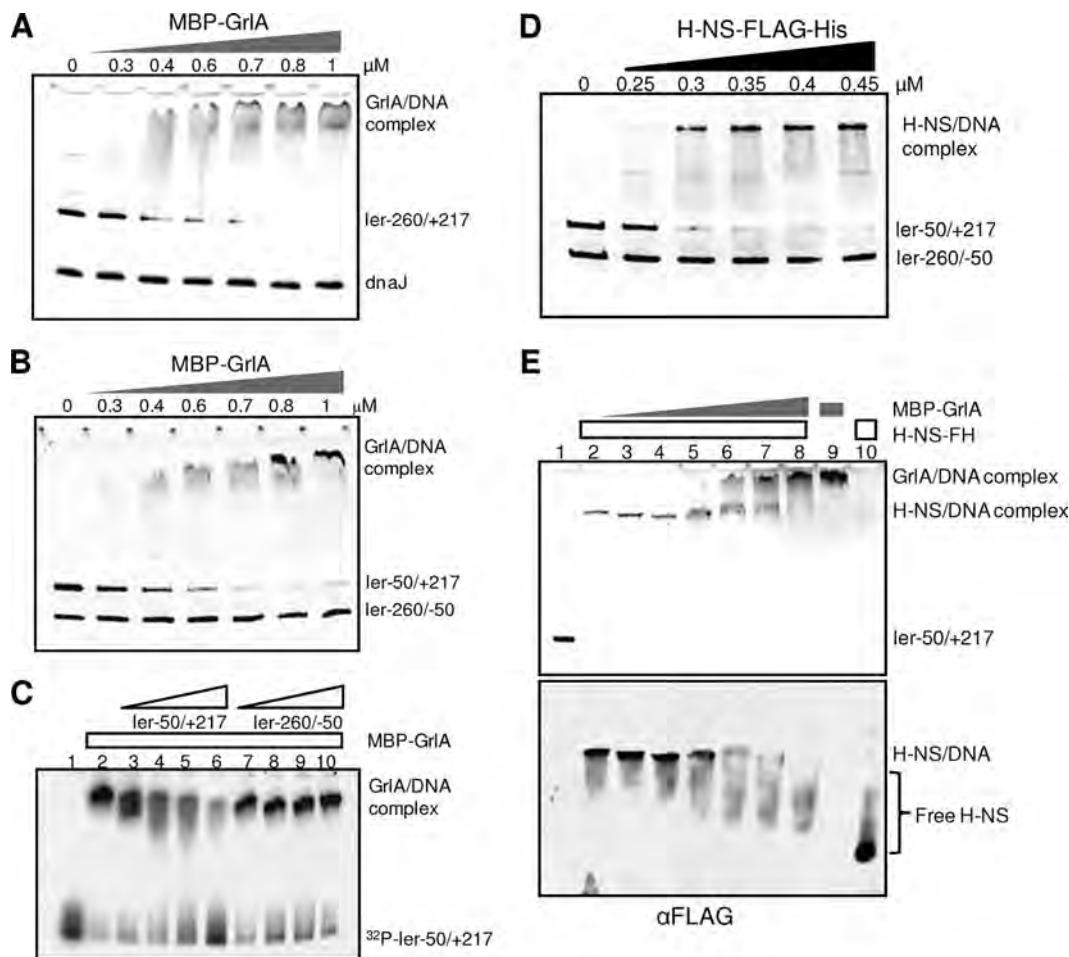


FIG. 2. GrIA and H-NS interact with the *ler* regulatory region *in vitro*. (A and B) EMSA of PCR DNA fragments comprising the *ler* regulatory region (*ler*-260/+217) and the *dnaJ* coding sequence (A) or of fragments *ler*-50/+217 and *ler*-260/-50 (B). DNA fragments were mixed and incubated with increasing concentrations of purified MBP-GrIA (0, 0.28, 0.42, 0.56, 0.7, 0.84, and 1  $\mu$ M). Free DNA and protein-DNA complexes were resolved by 5% polyacrylamide gel electrophoresis and stained with ethidium bromide. (C) Competitive EMSA. The  $^{32}$ P-5'-end-labeled *ler*-50/+217 probe was mixed with 0.5  $\mu$ M purified MBP-GrIA (lane 2), followed by the addition of a 10- to 40-fold excess of unlabeled specific (*ler*-50/+217) (lanes 3 to 6) or nonspecific (*ler*-260/-50) (lanes 7 to 10) competitors and resolved as indicated above. Lane 1,  $^{32}$ P-5'-end-labeled *ler*-50/+217 probe without protein. (D) EMSA of fragments *ler*-50/+217 and *ler*-260/-50 incubated with increasing concentrations of purified H-NS-FH (0, 0.25, 0.3, 0.35, 0.4, and 0.45  $\mu$ M). (E) H-NS displacement by GrIA from the *ler* regulatory region shown by competitive EMSA (top) and Western blotting with an  $\alpha$ -FLAG antibody (bottom). The *ler*-50/+217 fragment was incubated with purified H-NS-FH (0.45  $\mu$ M) (lanes 2 to 8) or MBP-GrIA (0.9  $\mu$ M), and then increasing concentrations of MBP-GrIA (0.17, 0.34, 0.51, 0.68, 0.85, and 1  $\mu$ M) were added (lanes 3 to 8). Lane 1, *ler*-50/+217 without protein; lane 10, free H-NS-FH (1  $\mu$ M).

AQ: E

F3 dictated secondary structure shown in Fig. 3B, the N-terminal half of GrIA contains four alpha helices. Helices III and IV correspond to a putative HTH DNA binding motif, whose presence correlates with the transcriptional activation function and *in vitro* DNA binding property of GrIA (Fig. 1 and 2). As mentioned above, GrIR interacts with GrIA, forming heterodimers (12, 29, 33), and it has been proposed that this interaction inhibits the GrIA-mediated activation of the *ler* promoter, thus also repressing LEE gene expression (3, 15). However, the role of this interaction in LEE regulation is not fully understood. In all, these observations suggest that this protein contains at least two functional domains. To investigate the potential modular nature of GrIA, we performed a systematic deletion analysis of the protein by generating consecutive deletions of 20 amino acids along the entire protein (Fig. 4A), as described in Materials and Methods. All deletions

F4

were unable to induce the expression of a *ler-cat* transcriptional fusion in *E. coli* MC4100 (Fig. 4B) or to complement the EPEC  $\Delta$ *grlA* strain (JPEP25) (data not shown), suggesting that each deletion imposed a structural constraint or modification that altered the entire folding of the protein or that several parts of the protein are essential for transcriptional activation.

To gain insights into the sequence motifs of GrIA required to interact with GrIR, all GrIA deletion mutants were MBP tagged, as described in Materials and Methods. Then, pull-down assays were performed using as prey WT MBP-GrIA and the MBP-GrIA deletion mutants expressed from pMAL-c2X derivatives (Table 1) and, as bait, GrIR fused in frame to GST-GrIR expressed from an IPTG-inducible promoter from plasmid pGEX-4T1. Full-length GST-GrIR was bound to glutathione beads and used to pull down MBP-tagged GrIA proteins from whole-cell extracts of *E. coli* BL21 pLys expressing

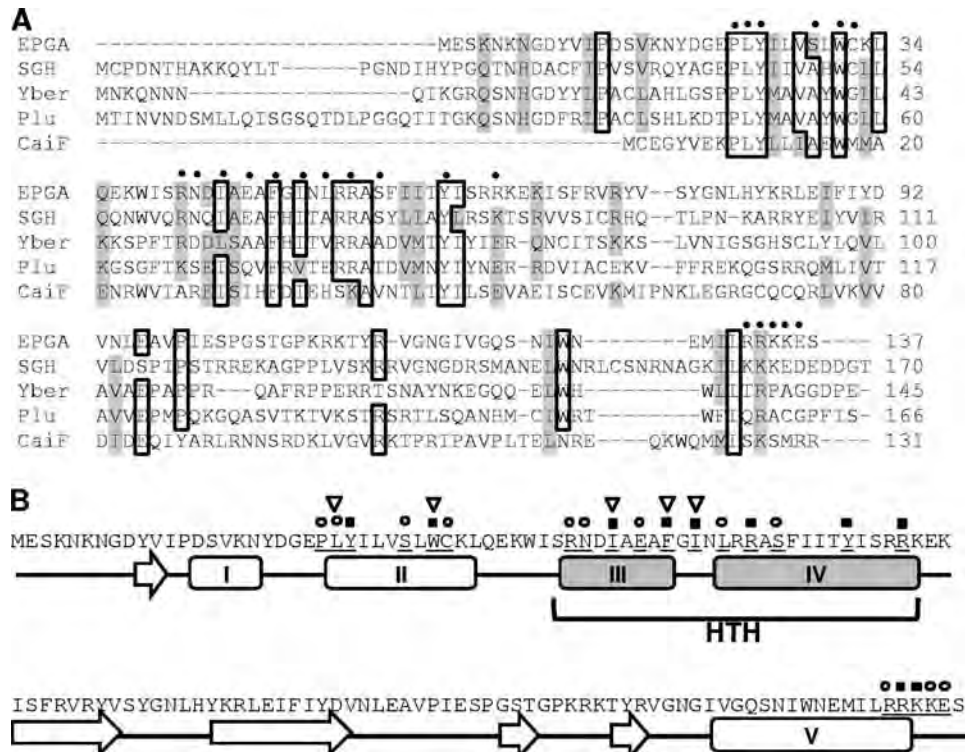


FIG. 3. GrIA homologues and secondary-structure prediction. (A) The amino acid sequence multialignment of GrIA from EPEC E2348/69 (AAC 38375.1), SGH from *S. enterica* serovar Typhimurium LT2 (NP\_945169), Yber from *Yersinia bercovieri* ATCC 43970 (ZP\_04627362), Plu from *Photobacterium luminescens* subsp. *Laumondii* TTO1 (NP\_927633), and CaiF from *E. coli* K-12 substrain MG1655 (NP\_414576), was done using the ClustalW sequence alignment program from the European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI). Identical amino acids are boxed, and similar amino acids are shaded in gray. The dots over the alignment indicate the GrIA amino acid residues mutated in this work. (B) Schematic representation of the predicted secondary structure of GrIA using the PSIPRED server (6). The arrows indicate beta strands, and the rectangles represent alpha helices. Amino acids replaced by alanine are underlined. Helices III and IV corresponding to the putative GrIA HTH DNA binding domain are shown in gray. The symbols above the amino acid sequence indicate alanine substitutions that did not affect GrIA function (white circles), affected *ler* expression and DNA binding (black squares) or abolished the interaction with GrIR (arrowheads).

them. MBP-GrIA<sub>WT</sub> was pulled down by GST-GrIR, but not by GST alone, confirming the interaction between the two proteins (Fig. 4C).

Interestingly, only mutants GrIA<sub>Δ101-120</sub> and GrIA<sub>Δ121-137</sub>, albeit inactive, were pulled down by GST-GrIR, indicating that the last 37 amino acids of the protein, while important for transcriptional activation, are not needed for the correct folding of the GrIR-interacting motif (Fig. 4C, top). Moreover, the elimination of all 37 amino acids produced a deletion mutant (GrIA<sub>Δ101-137</sub>) with the same phenotype seen for GrIA<sub>Δ101-120</sub> and GrIA<sub>Δ121-137</sub>, confirming that the C terminus is dispensable for protein-protein interactions, but not for transcriptional activation (data not shown). Further deletion of the C terminus up to amino acid 80 (GrIA<sub>Δ81-137</sub>) generated a mutant that was no longer able to interact with GrIR (data not shown). All variants were expressed at levels similar to those seen for the WT protein, as shown by Western blotting of whole-cell extracts of *E. coli* BL21 pLys expressing the MBP-GrIA deletion mutants (Fig. 4C, bottom).

**The predicted HTH motif of GrIA contains amino acid residues that are essential for GrIA transcriptional activity and DNA binding.** The results described above indicated that the entire protein was needed for the function of GrIA as a transcriptional regulator and also suggested that protein folding or

stability was not being compromised for all deletion mutants, as the deletion of the last 37 amino acids did not affect the interaction with GrIR. GrIA is a 137-amino-acid protein that is highly conserved in strains belonging to the A/E family of bacterial pathogens. Uncharacterized homologues of GrIA are present in *S. enterica*, *Y. bercovieri*, and *Photobacterium* sp. (Fig. 3A). A partially characterized homologue, CaiF, is found in members of the family *Enterobacteriaceae*. CaiF is a DNA binding protein that positively regulates the *cai* and *fix* operons (7). The multialignment analysis of these proteins revealed several conserved amino acid residues, mainly in the N-terminal half of the protein (Fig. 3A). To investigate in more detail the roles of helices II, III, and IV, and thus of the HTH motif, as well as to determine the contributions of the conserved amino acid residues to GrIA function (Fig. 3A), alanine substitutions were generated at residues P23, L24, Y25, S29, W31, and C32 (in helix II) and R41, N42, I44, E46, F48, I50, L52, R54, S56, Y61, and R65 (in the HTH motif, helices III and IV) by site-directed mutagenesis, as described in Materials and Methods. The effects of these changes on GrIA function were assessed by determining the capacities of the GrIA mutants to activate the expression of a *ler-cat* transcriptional fusion in *E. coli* MC4100 in comparison to WT GrIA (Fig. 5A and Table 3). Alanine substitutions at residues Y25, W31, I44, F48, I50, R54,



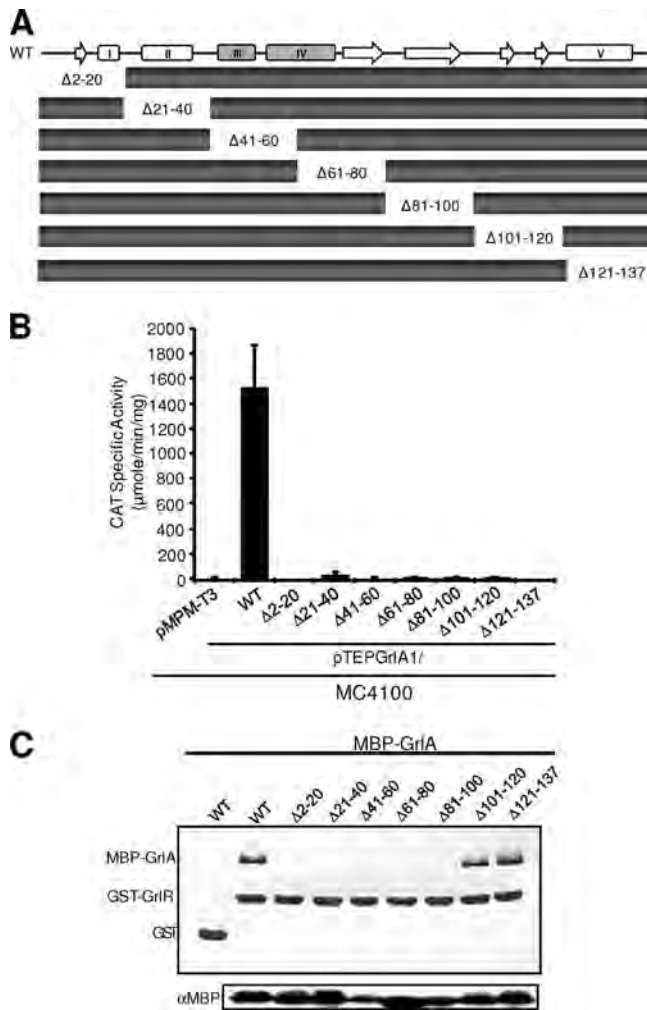


FIG. 4. The complete GrlA protein is required for *ler* expression, but not for GrlA-GrlR interactions. (A) Schematic representation of the predicted secondary structure of WT GrlA and of the GrlA 20-amino-acid sequential deletions. (B) The effects of the deletions on the activation of the *ler-cat* transcriptional fusion were determined in *E. coli* MC4100 transformed with pMPM-T3, pTEPGrlA1, and its derivatives expressing the GrlA deletion variants. The results are the average of three experiments done in duplicate. Standard deviations are shown. (C) Pull-down assay to analyze the interaction between the GrlA deletion mutants fused to MBP and GrlR fused to GST. Protein samples were resolved by 12% SDS-PAGE. The bands corresponding to MBP-GrlA, GST-GrlR, and GST are indicated. (Bottom) Western blot of whole-cell extracts of strains expressing the different MBP-GrlA variants used in the pull-down assay.

Y61, and R65 produced nonfunctional GrlA mutants, as they were unable to activate the expression of the *ler-cat* transcriptional fusion. In contrast, changes at residues P23, L24, S29, C32, N42, E46, L52, and S56 produced mutants that still activated the *ler-cat* fusion to different extents, but without abolishing the function of GrlA. These results indicated that the highly conserved residues I44, F48, I50, R54, and Y61 in the HTH motif (helices III and IV) play critical roles in transcriptional activation and suggested that these residues may also be important for the putative regulatory function of GrlA homologues present in other bacteria (Fig. 3A). Interestingly, ala-

nine substitutions at residue Y25 of the highly conserved PLY motif and residue W31 in helix II also produced inactive mutants, indicating that this helix also has an important function in transcriptional activity, likely having a role in the correct folding of the HTH motif or in DNA recognition or binding.

To further evaluate the effects of these mutations on GrlA activity, MBP fusions of all mutants were constructed by subcloning the *grlA* mutant genes from pMPM-T3 derivatives into pMAL-c2x (Table 1), as described in Materials and Methods. Plasmids expressing the MBP-GrlA variants were then introduced into EPEC  $\Delta$ *grlA* to assess their capacities to complement the mutation by analyzing type III secretion (T3S) protein profiles by SDS-PAGE of proteins recovered from culture supernatants (Fig. 5B) and expression of LEE-encoded proteins by Western blotting (Fig. 5C) of whole-cell extracts prepared from culture samples collected from shaken cultures in DMEM. In both cases, the results were fully consistent with the phenotypes observed for the different mutants in *E. coli* K-12 carrying the *ler-cat* fusion (Fig. 5A and Table 3), as determined by the presence of protein bands corresponding to EspA, EspB, and EspD (Fig. 5B) or expression of LEE-encoded proteins, such as EscJ or Tir (Fig. 5C, top two gels).

Proper expression of all GrlA mutants was evaluated by detecting the MBP portion of each fusion using an anti-MBP antibody. As seen in Fig. 5C (third gel from the top), all mutants were expressed at similar levels in comparison to the MBP fusion of WT GrlA, which complemented *ler-cat* expression in *E. coli* K-12 and T3S and the expression of LEE-encoded proteins in EPEC  $\Delta$ *grlA* (Fig. 5).

Helices II, III, and IV seem to comprise a typical trihelical bundle or HTH domain that includes the HTH motif (helices III and IV), a structural feature commonly found in DNA binding transcription factors (2). We found that mutations in conserved residues located in the three helices abolished the capacity of GrlA to activate *ler* transcription. The third helix of the HTH domain is usually involved in the interaction with the DNA and thus is known as the recognition sequence. However, the first and second helices also play important roles in DNA recognition and specificity (2). Considering that the majority of the conserved residues in the HTH domain were essential for GrlA function, we explored the possibility that these residues were also required for DNA binding by performing EMSAs with the purified MBP-GrlA mutants. An excess of 1.2  $\mu\text{M}$  purified MBP-GrlA<sub>WT</sub> and MBP fusions to GrlA mutants Y25A, W31A, I44A, F48A, I50A, and R54A was mixed with a PCR fragment spanning the *ler* regulatory region from positions -50 to +217. In agreement with the predicted function of the HTH domain and the phenotypes described above (Fig. 5A to C), all mutants tested by EMSA were unable to form a protein/DNA complex with the regulatory region of *ler*, in contrast to WT GrlA, showing that helices II, III, and IV, as well as the linker region between helices III and IV, participate in DNA recognition and thus in transcriptional activation (Fig. 5D).

**Amino acid residues in helices II and III are involved in GrlA-GrlR protein-protein interactions.** To determine the roles of single amino acid mutations in the interaction of GrlA with GrlR, MBP-tagged GrlA mutants were used in pull-down assays with GST-GrlR, as described above. The active GrlA



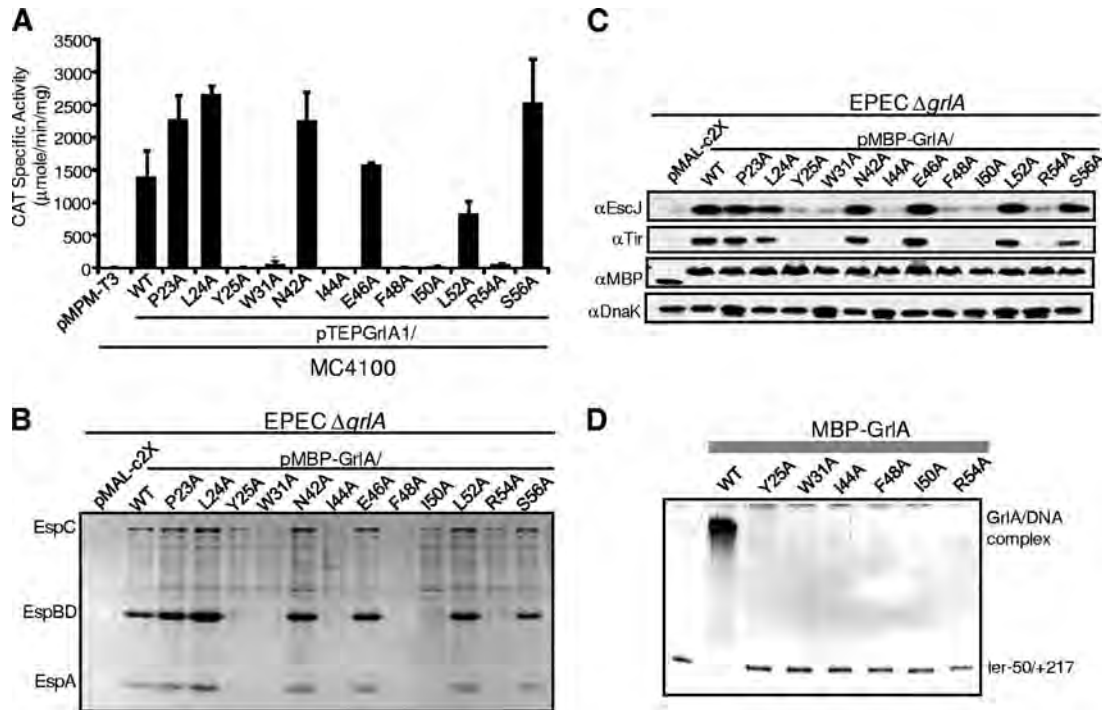


FIG. 5. Different amino acid residues in the HTH motif are important for GrIA function. Site-directed mutants were generated at different positions near the putative HTH motif. (A) Functional analysis of GrIA site-directed mutants in *E. coli* MC4100 carrying a *ler-cat* transcriptional fusion. Plasmids pMPM-T3 (empty vector) and pT3EPGrIA1 and its derivatives expressing one of the single-amino-acid mutants pTEPGrIA1/P23A, L24A, Y25A, W31A, N42A, I44A, E46A, F48A, I50A, L52A, R54A, and S56A were transformed into *E. coli* MC4100 containing the *ler-cat* transcriptional fusion. Bacterial cultures were grown in DMEM at 37°C with shaking, and samples were collected at an OD<sub>600</sub> of 1 to determine CAT specific activity. The error bars indicate standard deviations. (B) Complementation analysis of EPEC  $\Delta$ grlA. Plasmids expressing WT MBP-GrIA and MBP-GrIA single-amino-acid mutants were introduced into EPEC  $\Delta$ grlA. The resulting strains were grown as indicated above. The secreted proteins were concentrated from culture supernatants by TCA precipitation and resolved by 12% SDS-PAGE. (C) Western blot analysis of whole-cell extracts of the strains shown in panel B, using anti-EscJ, anti-Tir, anti-MBP, and anti-DnaK, which was used as a loading control. (D) EMSAs were performed to analyze the capacities of purified MBP-GrIA mutants (MBP-GrIA/Y25A, MBP-GrIA/W31A, MBP-GrIA/I44A, MBP-GrIA/F48A, MBP-GrIA/I50A, and MBP-GrIA/R54A) to bind to the *ler*-50/+217 fragment at a concentration of 1.2  $\mu$ M. The DNA-protein complexes were resolved in 5% polyacrylamide gels and stained with ethidium bromide.

AQ: F

TABLE 3. Phenotypes shown by the GrIA mutants

| Mutation         | Phenotype | Interaction with GrIR | Location   |
|------------------|-----------|-----------------------|------------|
| P23A             | Active    | Yes                   |            |
| L24A             | Active    | No                    | Helix II   |
| Y25A             | Inactive  | Yes                   | Helix II   |
| S29A             | Active    | Yes                   | Helix II   |
| W31A             | Inactive  | No                    | Helix II   |
| C32A             | Active    | Yes                   | Helix II   |
| R41A             | Active    | Yes                   | Helix III  |
| N42A             | Active    | Yes                   | Helix III  |
| I44A             | Inactive  | No                    | Helix III  |
| E46A             | Active    | Yes                   | Helix III  |
| F48A             | Inactive  | No                    | Helix III  |
| I50A             | Inactive  | No                    | HTH loop   |
| L52A             | Active    | Yes                   | Helix IV   |
| R54A             | Inactive  | Yes                   | Helix IV   |
| S56A             | Active    | Yes                   | Helix IV   |
| Y61A             | Inactive  | Yes                   | Helix IV   |
| R65A             | Inactive  | Yes                   | Helix IV   |
| $\Delta$ 125-137 | Inactive  | Yes                   | C terminal |
| $\Delta$ 131-137 | Inactive  | Yes                   | C terminal |
| R132A            | Active    | Yes                   | C terminal |
| R133A            | Inactive  | Yes                   | C terminal |
| K134A            | Inactive  | Yes                   | C terminal |
| K135A            | Active    | Yes                   | C terminal |
| E136A            | Active    | Yes                   | C terminal |

F6

variants P32A, S29A, C32A, R41A, N42A, E46A, L52A, and S56A were still able to interact with GrIR, without any evident change in affinity, indicating that these residues do not play essential roles in either function (Fig. 6A and Table 3). In contrast, GST-GrIR did not pull down mutants L24A, W31A, I44A, F48A, and I50A; however, while most of these mutants were also not able to activate *ler* expression, MBP-GrIA<sub>L24A</sub> was still active (Fig. 5 and Table 3). Interestingly, inactive GrIA mutants, such as Y25A, R54A, Y61A, and R65A, were pulled down by GST-GrIR, indicating that despite losing the DNA binding/transcriptional activation properties, the GrIR-interacting motif was still functional. These results, together with the observation that these proteins are expressed at similar levels, as tested by Western blotting of the same whole-cell extracts used for the pulldown assay using an anti-MBP antibody (Fig. 6B), also supported the notion that these proteins are being expressed and folded correctly.

In all, these data suggested that the DNA binding/activation and heterodimerization motifs overlap at the N terminus of GrIA but do not involve the exact same set of amino acids. In addition, although further analysis is required, they also suggested that helices II and III (Fig. 3B) are part of the motif that interacts with GrIR, which is not the case for the putative

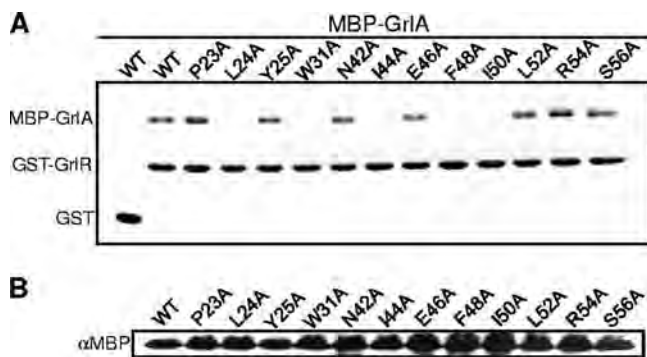


FIG. 6. Amino acid positions in the HTH motif are also essential for GrlA-GrlR interactions. (A) A pull-down assay was performed to analyze the interactions of GrlA single-amino-acid mutants with GrlR. Whole-cell extracts of strains expressing the different MBP-GrlA proteins were mixed with GST-GrlR bound to glutathione-Sepharose beads. The bound proteins were resolved by 12% SDS-PAGE. Protein bands corresponding to GST, GST-GrlR, and MBP-GrlA proteins are indicated. (B) Western blot analysis of whole-cell extracts of the strains expressing the MBP-GrlA fusion variants with anti-MBP antibodies.

recognition helix at the HTH motif (helix IV), as all 5 mutants in this region, including inactive mutants R54A, S56A, and Y61A, maintained its interaction with GrlR (Fig. 5A and Table 3).

**The GrlA C terminus contains residues involved in *ler* activation.** In addition to the functional motifs identified in the N-terminal half of the protein, the deletion analysis shown in Fig. 4 also revealed that the last 17 amino acids of GrlA were required for *ler* expression, but not for interaction with GrlR. To further characterize this putative functional motif, two additional deletions, GrlA $_{\Delta 125-137}$  and GrlA $_{\Delta 131-137}$ , were constructed and tested for the capacity to activate the *ler-cat* fusion and to complement the EPEC  $\Delta$ *grlA* mutant. Both mutants were not active in both assays, indicating that the C-terminal tail of GrlA, characterized by the presence of 5 out of 6 charged amino acid residues (RRKKE), plays an important role in DNA binding and activation (Table 3). To determine if all of the residues of this motif were important for GrlA activity, alanine substitutions were generated at residues R132, R133, K134, K135, and E136 and tested. We found that changes at positions R132, K135, and E136 did not affect GrlA function, whereas mutations in R133 and K134 produced protein mutants defective in *ler* activation (Fig. 7A), but not in their interaction with GrlR, as expected (Fig. 7B).

## DISCUSSION

The genome of a bacterial pathogen is characterized by the presence of large DNA segments that have been acquired by horizontal gene transfer (HGT) events and that are not present in closely related bacteria. In many cases these genomic islands encode proteins with virulence properties and thus are called PAIs (24). It has been proposed that to prevent the potential deleterious effects caused by the uncontrolled expression of incoming new genetic information, the global regulator H-NS has acted as a guardian silencer during the evolution of enteric bacterial pathogens by binding to AT-rich DNA tracks commonly found in PAIs, thus repressing the

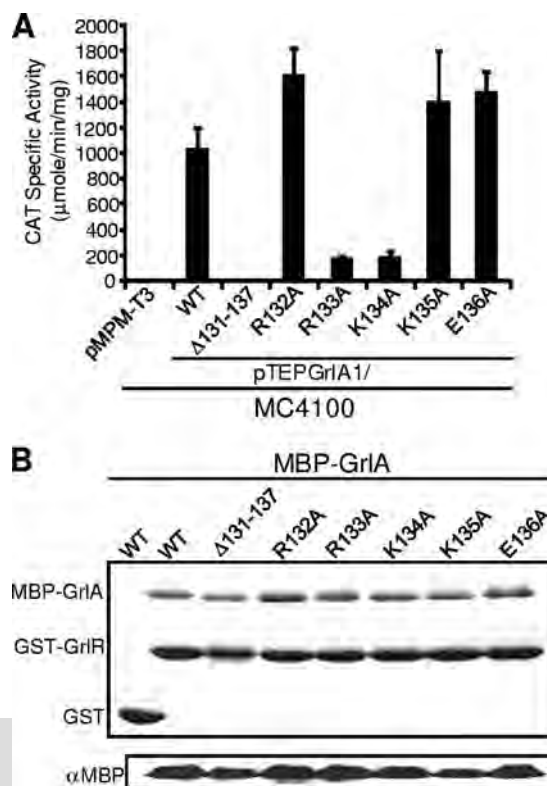


FIG. 7. Amino acid residues at the C terminus of GrlA are important for *ler* expression. (A) The functionality of the GrlA deletion mutant lacking amino acids 131 to 137 and of point mutants at residues R132, R133, K134, K135, and E136 was analyzed by testing their capacities to activate the expression of the *ler-cat* fusion in *E. coli* MC4100, as described for Fig. 5A. The error bars indicate standard deviations. (B) The interaction of MBP-GrlA proteins containing the mutations described above with GrlR was tested by performing a pull-down assay as described in the legend to Fig. 6.

expression of this information until regulatory mechanisms evolved to control its spatiotemporal expression in an appropriate manner (16, 42, 50, 51). As with other PAIs, the core LEE has a low G+C content (an average of 38.4%), which contrasts with the 50% G+C content of the entire genome, a characteristic of DNA regions acquired horizontally (46, 49). Accordingly, it has been widely documented that the expression of LEE genes is repressed by H-NS (3, 9, 17, 23, 48, 57, 62, 69). As summarized in the introduction, the expression of LEE genes is regulated by a complex network of negative and positive regulators, most of them modulating the expression of the master regulator of the island, Ler, which in turn counteracts H-NS repression at all the promoters in the LEE, except for the *LEE1* (*ler*) promoter. Despite this complexity, GrlA, a second LEE-encoded regulator, has been shown to play a key role in the regulation of *ler* (and thus in the expression of LEE genes) and of other virulence-related genes outside the LEE, as well as in virulence *in vitro* and *in vivo*. In addition, it has previously been shown that Ler and GrlA regulate each other, establishing a positive regulatory loop that ensures the appropriate level of Ler production to activate LEE gene expression (3). Despite its importance, the mechanism whereby GrlA activates *ler* expression is not well understood.

Here, we have further shown that GrIA acts as a positive regulator of *ler* expression by binding directly to its regulatory region, thus counteracting the H-NS repression exerted on its promoter. However, our data also confirmed that GrIA further enhances *ler* transcription in the absence of H-NS, although it remains to be investigated whether it does so by counteracting other repressors or by facilitating the formation of productive RNA polymerase-promoter complexes. The secondary structure of GrIA predicts a putative HTH DNA binding domain in the N-terminal half of the protein between residues 41 and 65, which was shown to be functional by site-directed mutagenesis. Mutations in this motif completely abolished GrIA-mediated activation of the *ler* promoter and DNA binding. Although the exact sequence motif bound by GrIA has not been identified, the interaction with the *ler* regulatory region seems to be specific, as GrIA did not bind other DNA fragments under the conditions used in this work. Ler (9) and GrIA share the capacity to counteract H-NS repression by binding to sequences within the LEE in different promoter regions and seem to do it specifically based on the observation that these proteins do not activate each other's target promoters in a non-EPEC background, such as *E. coli* K-12 (3). Moreover, expression of Tir and EspB in a *C. rodentium*  $\Delta$ ler  $\Delta$ grIA double mutant can be restored only with a plasmid expressing Ler from a constitutive promoter, while a plasmid expressing GrIA restores only *ler* expression (15).

As in the case of GrIA, several virulence-regulatory proteins activate virulence gene expression by counteracting the repression exerted by H-NS. Among others, this role has been reported for AraC-like proteins, such as CfaD from enterotoxigenic *E. coli* (34), HilD from *S. enterica* serovar Typhimurium (8), and ToxT from *Vibrio cholerae* (72), and also for VirB, an unusual transcription factor from *Shigella flexneri* (67); for RovA, a member of the SlyA/Hor family of transcriptional regulators from *Yersinia* sp. (11); Ler, an H-NS paralogue from A/E pathogens (3, 9, 23, 69); and SsrB, a response regulator from *S. enterica* (70).

The ability of GrIA to activate *ler* expression correlates with the prediction of a putative HTH DNA binding motif in the N-terminal domain of the protein, suggesting that GrIA must bind to the *ler* promoter region to activate its expression. Previous attempts to demonstrate the specific interaction of purified MBP-GrIA with the *C. rodentium* *ler* promoter (3) or of a 6XHis-GrIA fusion to the EHEC *ehxCABD* and *flhDC* promoters (55) were unsuccessful. Binding of GST-GrIA to the EHEC *ler* promoter region was recently shown; intriguingly, binding was still observed even for a deletion mutant lacking the HTH motif (29). In this work, we demonstrated that a functional MBP-GrIA fusion specifically binds to a DNA fragment spanning the *ler* promoter region from positions -50 to +217, but not to the *ler* fragment spanning positions -260 to -50 or to an unrelated control fragment. This result is in agreement with experiments demonstrating that GrIA still enhances the expression of a *ler-cat* transcriptional fusion containing the region between positions -50 and +217, which is also repressed by H-NS (3; Bustamante et al., submitted). In addition, we showed that GrIA binding displaces H-NS from its binding site, also located between positions -50 and +217. Thus, GrIA could alleviate H-NS repression by competing for overlapping binding sites or by generating architectural

changes in this region that prevent H-NS binding or the formation of a nucleoprotein repressor complex.

A variety of structural motifs are involved in DNA binding. One of the most frequently found in bacterial transcription factors is the HTH motif. The basic structure of the HTH motif consists of a bundle of three helices, where the second and third helices, connected by a tight turn, are involved in DNA recognition (2). The predicted secondary structure of GrIA shows the presence of four alpha helices (helices I to IV) in the N-terminal half of the protein and an additional alpha helix (helix V) toward the C terminus. Helices II, III, and IV constitute the 3-helical HTH domain, and helices III and IV are the putative core helices (Fig. 3B). The relevance of the HTH domain in GrIA-mediated activation was analyzed by site-directed mutagenesis. Several amino acids were found to be critical for GrIA activity (Y25, W31, I44, F48, I50, and R54). GrIA mutants carrying alanine substitutions at these residues were incapable of activating the expression of a *ler-cat* transcriptional fusion in *E. coli* K-12 and unable to complement an EPEC  $\Delta$ grIA mutant. Mutants carrying serine substitutions for residues I44, F48, I50, and R54 showed the same phenotype as the corresponding alanine mutants (data not shown), confirming the critical role that these amino acid residues play in the functionality of GrIA. Consistent with the expected role of the HTH domain, inactive mutants were also defective in DNA binding, confirming their relevance in GrIA function; however, it remains to be determined if these residues establish direct contacts with the DNA backbone or play a structural role.

Amino acids Y25 and W31, located in helix II, are hydrophobic, suggesting that they may participate in the correct folding of the HTH domain by interacting with other amino acids. The second HTH helix (helix III in GrIA) has been associated with the correct positioning of the recognition helix (helix IV) at the DNA binding site. In addition, the replacement of hydrophobic amino acids I44 and F48 within the second HTH helix (helix III) produced inactive GrIA mutants. Taken together, these results suggest that hydrophobic amino acids in the first and second HTH helices (helices II and III) probably form a hydrophobic pocket that is important to maintain the compact fold of the HTH motif. However, the possibility that these amino acids participate directly in DNA binding—as shown for the corresponding helices 1 and 2 from the winged HTH motif of the LysR family of transcriptional regulators, which were implicated in DNA binding, as its mutation produced a protein that lost the interaction with DNA (73)—cannot be ruled out at this point. The turn connecting the second and third helices is also important for maintaining the correct folding of the HTH motif, and it does not support changes or distortions in its sequence (2). According to this notion, a mutation in residue I50, which is located in the middle of the turn, abolished GrIA activity. Furthermore, in agreement with the putative role of helix IV in the interaction with DNA, the mutation at residue R54 produced a GrIA variant that was deficient in activating *ler* and in DNA binding. It is also consistent with the observation indicating that positively charged amino acids are the main residues involved in the interaction with DNA phosphate groups (43). In contrast, several residues located in the HTH were not essential for GrIA function as a transcriptional regulator. The fact that not all alanine substitutions in this motif caused significant defects



in GrlA function suggests that the integrity of the protein is, in general, maintained with this mutagenesis strategy and that changes generating a defective phenotype reflect only local effects and the importance of those amino acids in establishing contacts with the DNA target sequence or the stability and spatial orientation of the HTH fold in GrlA. In support of this, helical-wheel projections of helices III and IV of the putative GrlA HTH motif showed that residues that are essential for GrlA activity are clustered on one side of each of the helices (data not shown). In particular, at the putative recognition helix (helix IV), hydrophilic amino acid residues, which, if mutated, produced inactive GrlA proteins, are clustered on one side, probably favoring sequence-specific contacts with the DNA.

At this point, pulldown experiments and two-hybrid assays have indicated that GrlA does not interact with itself (data not shown). These observations suggest that GrlA acts on the DNA as a monomer, which is consistent with the apparent absence of direct or inverted repeats in the sequence of the fragment bound by GrlA. However, further work is required to completely rule out GrlA dimerization, as CaiF, the only GrlA homologue partially characterized, has been shown to be a dimer in solution and to bind to a palindromic sequence (7). Only two nonfunctional single-amino-acid mutants have been described for CaiF. An N-terminal A27V mutation seems to dramatically affect its structure and function, while an I62N mutant, located in the central part of the protein, showed a defect in DNA binding (7). Both CaiF A27 and I62N are not conserved with GrlA or other GrlA homologues (Fig. 3A).

The interaction between GrlA and GrlR has been documented previously (29, 33), an observation that has led to the proposal that GrlR acts as a repressor of LEE gene expression by heterodimerizing with GrlA (3, 31, 33, 40). However, we have recently shown that this interaction rather serves to prevent repression by GrlR, which inhibits LEE gene transcription specifically and independently of its interaction with GrlA (37). Thus, GrlA has a dual and key role in the transcriptional positive regulation of the LEE, as, in addition to acting as a DNA binding protein in the *ler* regulatory region to antagonize H-NS repression and to further promote *ler* transcription, it also acts as an antirepressor by inactivating GrlR through direct protein-protein interactions. In view of the relevance of this interaction, in this work, we also identified several GrlA mutants that were incapable of interacting with GrlR.

Mutations in residues L24, W31, I44, F48, and I50 produced GrlA versions that no longer interacted with GrlR. Interestingly, while most of these mutants also lost the capacity to activate *ler* expression, GrlA L24A was still functional. Although a full alanine-scanning analysis would be required to determine all positions important for the interaction with GrlR, the locations of these mutations suggest that the region spanning helices II and III forms a functional domain for protein-protein (GrlA-GrlR) interactions that partially overlaps with the DNA binding domain. This region is not as rich in basic residues as the C terminus, which was suggested to be the region potentially involved in the interaction with GrlR, for which a negatively charged EDED motif was shown to be important for GrlA-GrlR heterodimerization (33). In this regard, several basic residues, including the RRKK motif at the GrlA C terminus, had no role in the interaction with GrlR.

Of note, the 3 residues of the highly conserved PLY motif at helix II seem to play different roles in the functionality of the protein. While mutant P23A did not show any defect in *ler* activation, DNA binding, or the interaction with GrlR, L24A was active but lost the interaction, and in contrast, Y25A, although inactive, was still able to interact with GrlR. In time, it will be interesting to investigate if this motif also has a role in protein-protein interactions or DNA binding for other GrlA-like proteins.

This work furthers our understanding of the functional organization of GrlA and provides insights for future studies into the molecular structure-function relationship of this novel family of regulatory proteins and, in particular, into the importance of the GrlR-GrlA duo in the regulation of the LEE and the evolution of A/E pathogens.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank F. J. Santana and A. Vázquez for excellent technical assistance and J. Barba for preliminary data and advice. We are grateful to B. González-Pedrajo (UNAM), B. B. Finlay (University of British Columbia), and J. B. Kaper (University of Maryland) for kindly providing the anti-EscJ, anti-Tir, and anti-EspA antibodies, respectively.

This work was supported by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) (42918Q and 60796), the Howard Hughes Medical Institute (75301-565101), and Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN224107 and IN201703-3) to J.L.P. R.J. was supported by a fellowship from CONACyT (183500).

#### REFERENCES

1. Abe, H., A. Miyahara, T. Oshima, K. Tashiro, Y. Ogura, S. Kuhara, N. Ogasawara, T. Hayashi, and T. Tobe. 2008. Global regulation by horizontally transferred regulators establishes the pathogenicity of *Escherichia coli*. *DNA Res.* 15:25–38.
2. Aravind, L., V. Anantharaman, S. Balaji, M. M. Babu, and L. M. Iyer. 2005. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol. Rev.* 29:231–262.
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. Berdichevsky, T., D. Friedberg, C. Nadler, A. Rokney, A. Oppenheim, and I. Rosenshine. 2005. *Ler* is a negative autoregulator of the *LEE1* operon in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187:349–357.
5. Bhatt, S., A. N. Edwards, H. T. Nguyen, D. Merlin, T. Romeo, and D. Kalman. 2009. The RNA binding protein *CsrA* is a pleiotropic regulator of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 77:3552–3568.
6. Bryson, K., L. J. McGuffin, R. L. Marsden, J. J. Ward, J. S. Sodhi, and D. T. Jones. 2005. Protein structure prediction servers at University College London. *Nucleic Acids Res.* 33:W36–W38.
7. Buchet, A., W. Nasser, K. Eichler, and M. A. Mandrand-Berthelot. 1999. Positive co-regulation of the *Escherichia coli* carnitine pathway *cai* and *fix* operons by CRP and the *CaiF* activator. *Mol. Microbiol.* 34:562–575.
8. Bustamante, V. H., L. C. Martínez, F. J. Santana, L. A. Knodler, O. Steele-Mortimer, and J. L. Puente. 2008. *HilD*-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:14591–14596.
9. 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.
10. Casadaban, M. J. 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J. Mol. Biol.* 104:541–545.
11. Cathelyn, J. S., D. W. Ellison, S. J. Hinchliffe, B. W. Wren, and V. L. Miller. 2007. The *RovA* regulons of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis* are distinct: evidence that many *RovA*-regulated genes were acquired more recently than the core genome. *Mol. Microbiol.* 66:189–205.
12. Creasey, E. A., R. M. Delahay, S. J. Daniell, and G. Frankel. 2003. Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 149:2093–2106.
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. 2009. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**:101–109.
15. Deng, W., J. L. Puentes, 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. U. S. A.* **101**:3597–3602.
16. Dorman, C. J. 2007. H-NS, the genome sentinel. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**:157–161.
17. 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.
18. Elliott, S. J., L. A. Wainwright, T. K. McDaniel, K. G. Jarvis, Y. K. Deng, L. C. Lai, B. P. McNamara, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol. Microbiol.* **28**:1–4.
19. Frankel, G., and A. D. Phillips. 2008. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cell. Microbiol.* **10**:549–556.
20. Friedberg, D., T. Umanski, Y. Fang, and I. Rosenshine. 1999. Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **34**:941–952.
21. Garmendia, J., G. Frankel, and V. F. Crepin. 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect. Immun.* **73**:2573–2585.
22. Guttman, J. A., and B. B. Finlay. 2008. Subcellular alterations that lead to diarrhea during bacterial pathogenesis. *Trends Microbiol.* **16**:535–542.
23. 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.
24. Hacker, J., and J. B. Kaper. 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**:641–679.
25. Hansen, A. M., and J. B. Kaper. 2009. Hfq affects the expression of the LEE pathogenicity island in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **73**:446–465.
26. Hayward, R. D., J. M. Leong, V. Koronakis, and K. G. Campellone. 2006. Exploiting pathogenic *Escherichia coli* to model transmembrane receptor signalling. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**:358–370.
27. Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, and L. R. Pease. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* **77**:51–59.
28. Honda, N., S. Iyoda, S. Yamamoto, J. Terajima, and H. Watanabe. 2009. LrhA positively controls the expression of the locus of enterocyte effacement genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* by differential regulation of their master regulators PchA and PchB. *Mol. Microbiol.* **74**:1393–1441.
29. Huang, L. H., and W. J. Syu. 2008. GrlA of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 activates *LEE1* by binding to the promoter region. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **41**:9–16.
30. Iguchi, A., N. R. Thomson, Y. Ogura, D. Saunders, T. Ooka, I. R. Henderson, D. Harris, M. Asadulghani, K. Kurokawa, P. Dean, B. Kenny, M. A. Quail, S. Thurston, G. Dougan, T. Hayashi, J. Parkhill, and G. Frankel. 2009. Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *J. Bacteriol.* **191**:347–354.
31. Iyoda, S., N. Koizumi, H. Satou, Y. Lu, T. Saitoh, M. Ohnishi, and H. Watanabe. 2006. The GrlR-GrlA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and LEE-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**:5682–5692.
32. Iyoda, S., and H. Watanabe. 2004. Positive effects of multiple *pch* genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HEp-2 cells. *Microbiology* **150**:2357–2571.
33. Jobichen, C., M. Li, G. Yerushalmi, Y. W. Tan, Y. K. Mok, I. Rosenshine, K. Y. Leung, and J. Sivaraman. 2007. Structure of GrlR and the implication of its EDED motif in mediating the regulation of type III secretion system in EHEC. *PLoS Pathog.* **3**:e69.
34. Jordi, B. J., B. Dagberg, L. A. de Haan, A. M. Hamers, B. A. van der Zeijst, W. Gastra, and B. E. Uhlin. 1992. The positive regulator CfaD overcomes the repression mediated by histone-like protein H-NS (H1) in the CFA/I fimbrial operon of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **11**:2627–2632.
35. Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:123–140.
36. Laaberki, M. H., N. Janabi, E. Oswald, and F. Repoila. 2006. Concert of regulators to switch on LEE expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: interplay between Ler, GrlA, HNS and RpoS. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**:197–210.
37. Lara, C., A. Huerta-Saquero, R. Jiménez-Mejía, and J. L. Puente-García. 2009. The repressor activity of GrlR, a LEE-encoded negative regulator of enteropathogenic *Escherichia coli*, is antagonized by GrlA through protein-protein interactions, abstr. B-197, p. 71. Abstr. 109th Gen. Meet. Am. Soc. Microbiol. American Society for Microbiology, Washington, DC.
38. 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* **i**:1119–1122.
39. Li, M., I. Rosenshine, S. L. Tung, X. H. Wang, D. Friedberg, C. L. Hew, and K. Y. Leung. 2004. Comparative proteomic analysis of extracellular proteins of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* strains and their *ihf* and *ler* mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:5274–5282.
40. 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.
41. Lodato, P. B., and J. B. Kaper. 2009. Post-transcriptional processing of the *LEE4* operon in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **71**:273–290.
42. Lucchini, S., G. Rowley, M. D. Goldberg, D. Hurd, M. Harrison, and J. C. Hinton. 2006. H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathog.* **2**:746–752.
43. Luscombe, N. M., R. A. Laskowski, and J. M. Thornton. 2001. Amino acid-base interactions: a three-dimensional analysis of protein-DNA interactions at an atomic level. *Nucleic Acids Res.* **29**:2860–2874.
44. Martínez-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.
45. Mayer, M. P. 1995. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**:41–46.
46. McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**:1664–1668.
47. Mellies, J. L., A. M. Barron, and A. M. Carmona. 2007. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infect. Immun.* **75**:4199–4210.
48. Mellies, J. L., S. J. Elliott, V. Sperandio, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 1999. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol. Microbiol.* **33**:296–306.
49. Müller, D., I. Benz, A. Liebchen, I. Gallitz, H. Karch, and M. A. Schmidt. 2009. Comparative analysis of the locus of enterocyte effacement and its flanking regions. *Infect. Immun.* **77**:3501–3513.
50. Navarre, W. W., S. Porwollik, Y. Wang, M. McClelland, H. Rosen, S. J. Libby, and F. C. Fang. 2006. Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* **313**:236–238.
51. Oshima, T., S. Ishikawa, K. Kurokawa, H. Aiba, and N. Ogasawara. 2006. *Escherichia coli* histone-like protein H-NS preferentially binds to horizontally acquired DNA in association with RNA polymerase. *DNA Res.* **13**:141–153.
52. Pacheco, A. R., and V. Sperandio. 2009. Inter-kingdom signaling: chemical language between bacteria and host. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**:192–198.
53. Porter, M. E., P. Mitchell, A. Free, D. G. Smith, and D. L. Gally. 2005. The *LEE1* promoters from both enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* can be activated by PerC-like proteins from either organism. *J. Bacteriol.* **187**:458–472.
54. 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.
55. Saitoh, T., S. Iyoda, S. Yamamoto, Y. Lu, K. Shimuta, M. Ohnishi, J. Terajima, and H. Watanabe. 2008. Transcription of the *ehx* enterohemolysin gene is positively regulated by GrlA, a global regulator encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **190**:4822–4830.
56. Sambrook, J., and D. Russell. 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY.
57. Sánchez-SanMartin, C., V. H. Bustamante, E. Calva, and J. L. Puente. 2001. Transcriptional regulation of the *orf19* gene and the *tir-cesT-ae* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **183**:2823–2833.
58. Shakhnovich, E. A., B. M. Davis, and M. K. Waldor. 2009. Hfq negatively regulates type III secretion in EHEC and several other pathogens. *Mol. Microbiol.* **74**:347–363.
59. Sharma, V. K., and R. L. Zuerner. 2004. Role of *hha* and *ler* in transcriptional regulation of the *esp* operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Bacteriol.* **186**:7290–7301.
60. Sharp, F. C., and V. Sperandio. 2007. QseA directly activates transcription of *LEE1* in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **75**:2432–2440.
61. Shifrin, Y., A. Peleg, O. Ilan, C. Nadler, S. Kobi, K. Baruch, G. Yerushalmi, T. Berdichevsky, S. Altuvia, M. Elgrably-Weiss, C. Abe, S. Knutton, C. Sasakawa, J. M. Ritchie, M. K. Waldor, and I. Rosenshine. 2008. Transient shielding of intimin and the type III secretion system of enterohemorrhagic

- and enteropathogenic *Escherichia coli* by a group 4 capsule. *J. Bacteriol.* **190**:5063–5074.
62. Sperandio, V., J. L. Mellies, R. M. Delahay, G. Frankel, J. A. Crawford, W. Nguyen, and J. B. Kaper. 2000. Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) *LEE2* and *LEE3* operons by Ler. *Mol. Microbiol.* **38**:781–793.
  63. 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.
  64. Tobe, T., G. K. Schoolnik, I. Sohel, V. H. Bustamante, and J. L. Puente. 1996. Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**:963–975.
  65. 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.
  66. Tree, J. J., E. B. Wolfson, D. Wang, A. J. Roe, and D. L. Gally. 2009. Controlling injection: regulation of type III secretion in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Trends Microbiol.* **17**:361–370.
  67. Turner, E. C., and C. J. Dorman. 2007. H-NS antagonism in *Shigella flexneri* by VirB, a virulence gene transcription regulator that is closely related to plasmid partition factors. *J. Bacteriol.* **189**:3403–3413.
  68. Ueguchi, C., T. Suzuki, T. Yoshida, K. Tanaka, and T. Mizuno. 1996. Systematic mutational analysis revealing the functional domain organization of *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J. Mol. Biol.* **263**:149–162.
  69. Umanski, T., I. Rosenshine, and D. Friedberg. 2002. Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**:2735–2744.
  70. Walthers, D., R. K. Carroll, W. W. Navarre, S. J. Libby, F. C. Fang, and L. J. Kenney. 2007. The response regulator SsrB activates expression of diverse *Salmonella* pathogenicity island 2 promoters and counters silencing by the nucleoid-associated protein H-NS. *Mol. Microbiol.* **65**:477–493.
  71. Yang, Z., J. Kim, C. Zhang, M. Zhang, J. Niefeldt, C. M. Southward, M. G. Surette, S. D. Kachman, and A. K. Benson. 2009. Genomic instability in regions adjacent to a highly conserved *pch* prophage in *Escherichia coli* O157:H7 generates diversity in expression patterns of the LEE pathogenicity island. *J. Bacteriol.* **191**:3553–3568.
  72. Yu, R. R., and V. J. DiRita. 2002. Regulation of gene expression in *Vibrio cholerae* by ToxT involves both antirepression and RNA polymerase stimulation. *Mol. Microbiol.* **43**:119–134.
  73. Zaim, J., and A. M. Kierzek. 2003. The structure of full-length LysR-type transcriptional regulators. Modeling of the full-length OxyR transcription factor dimer. *Nucleic Acids Res.* **31**:1444–1454.

