



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

(Departamento de Microbiología Molecular)

INFLUENCIA DE *Ler*, EL REGULADOR POSITIVO DE LOS GENES DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICA O157:H7, SOBRE LA EXPRESIÓN DE *LOC*/DEL GENOMA *CORE* de *E. coli*.

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

AURORA LABASTIDA MARTÍNEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA.
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

INTEGRANTES DE COMITÉ TUTOR:

DR. ENRIQUE MERINO PÉREZ Y DR. JUAN ENRIQUE MORETT SÁNCHEZ

CUERNAVACA, MORELOS

ENERO DE 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Durante el desarrollo de este trabajo, la autora fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (num. **234671**).

ÍNDICE

ÍNDICE	- 3 -
LISTA DE ABREVIATURAS	- 5 -
RESUMEN	- 8 -
I. INTRODUCCIÓN	- 10 -
I.1 Los patotipos EHEC y EPEC.....	- 12 -
I.2 Factores de virulencia de EHEC y EPEC	- 13 -
I.2.a Sistema de secreción tipo III y proteínas efectoras	- 13 -
I.2.b Plásmidos de virulencia y toxinas Shiga.....	- 16 -
I.3 Regulación de los genes de virulencia en EPEC y EHEC.....	- 17 -
I.3.a Regulación del LEE por H-NS y Ler	- 17 -
I.3.b Mecanismos de acción de H-NS y Ler.....	- 19 -
I.3.c Otros reguladores del LEE que actúan a través de Ler	- 21 -
I.4 Origen e importancia adaptativa del LEE en <i>E. coli</i>	- 23 -
II. ANTECEDENTES	- 25 -
III. HIPÓTESIS	- 27 -
IV. OBJETIVOS	- 28 -
IV.1 Objetivo general	- 28 -
IV.2 Objetivos particulares.....	- 28 -
V. MÉTODOS	- 29 -
V.1 Herramientas bioinformáticas.....	- 29 -
V.2 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	- 30 -
V.3 Oligonucleótidos.....	- 30 -
V.4 Construcción de fusiones transcripcionales	- 33 -
V.5 Ensayo de actividad de CAT	- 36 -
V.6 Expresión y purificación de Ler	- 37 -

V.7 Ensayos de cambio de movilidad electroforética	- 37 -
VI. RESULTADOS	- 39 -
VI.1 Selección de los posibles blancos de Ler.....	- 39 -
VI.2 Efecto de Ler en la expresión de los genes <i>ompC</i> , <i>yehD</i> y <i>ypjC</i>	- 42 -
VI.2.a La sobre expresión de Ler en <i>E. coli</i> K-12 activa a <i>ypjC</i> y afecta negativamente la expresión de <i>ompC</i>	- 45 -
VI.2.b La actividad de <i>ompC</i> es similar en EPEC y EPEC Δ <i>ler</i> y <i>ypjC</i> es inactivo en EPEC.....	- 45 -
VI.3 Ler interacciona específicamente con las regiones reguladoras de <i>ompC</i> , <i>yehD</i> y <i>ypjC</i> -	47 -
VII. DISCUSIÓN	- 49 -
VIII. PERSPECTIVAS	- 55 -
REFERENCIAS	- 57 -

LISTA DE ABREVIATURAS

A. Adenina.

A/E. Adherencia y eliminación de microvellosidades.

Amp. Ampicilina.

BamHI. Enzima de restricción I de *Bacillus amyloliquefaciens*, cepa H.

BCA. Acido bicinconánico.

BFP. Pilus formador de haces (por sus siglas en inglés).

BSA. Albúmina sérica bovina (por sus siglas en inglés).

C. Citosina.

°C. Grados centígrados

C-terminal. Carboxilo terminal.

CAT. Enzima cloranfenicol acetil transferasa.

DMEM. Medio de cultivo de células eucariontes tipo Eagle modificado por Dulbecco (por sus siglas en inglés).

DNA. Acido desoxirribonucleico (por sus siglas en inglés).

dNTPs. Desoxirribonucleótidos trifosfato.

DO. Densidad óptica.

DTNB. Ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico).

DTT. Ditiotreitól.

EAF. Factor de adhesión de EPEC (por sus siglas en inglés).

EDTA. Acido etilendiaminotetraacético.

EHEC. *Escherichia coli* enterohemorrágica (por sus siglas en inglés).

ej. Ejemplo.

EMSA. Ensayo de cambio de la movilidad electroforética (por sus siglas en inglés).

EPEC. *Escherichia coli* enteropatógena (por sus siglas en inglés).

et al. Otros colaboradores.

FT (FTs). Factor Transcripcional (Factores Transcripcionales).

G. Guanina.

GET. Glucosa EDTA Tris-HCl.

H-NS. Proteína parecida a histona estructuradora del nucleóide (por sus siglas en inglés).

Δhns . Mutante isogénica en el gen *hns*.

HEPES. N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfónico)

HindIII. Enzima de restricción de *Haemophilus influenzae*, cepa Rd.

His. Histidina

HUS. Síndrome urémico hemolítico (Por sus siglas en inglés)

IPTG. Inductor isopropil- β -D-tiogalactopiranosido.

kb. Kilobases.

LB. Medio de cultivo tipo Luria.

LEE. Locus de eliminación de enterocitos (por sus siglas en inglés).

Ler. Regulador codificado en LEE (por sus siglas en inglés).

Δler . Mutante isogénica en el gen *ler*.

μ g. Microgramos.

mg. Miligramos.

min. Minutos.

μ l. Microlitros

ml. Mililitros.

μ M. Micromolar

mM. Milimolar.

μ g. Microgramos.

Myc. Polipéptido Myc usado en el etiquetado de proteínas.

N-terminal. Amino terminal.

ng. Nanogramos.

PAGE. Electroforesis en gel de poliacrilamida.

pb. Pares de bases.

Pch. Homólogo de PerC (por sus siglas en inglés), presente en EHEC.

$\Delta pchA \Delta pchB$. Doble mutante isogénica en los genes *pchA* y *pchB*.

$\Delta pchA \Delta pchB \Delta pchC$. Triple mutante isogénica en los genes *pchA*, *pchB* y *pchC*.

PCR. Reacción en cadena de la polimerasa (por sus siglas en inglés).

PerC. Regulador C codificado en plásmido (por sus siglas en inglés), presente en EPEC.

pH. Potencial de hidrógeno.

rpm. Revoluciones por minuto.

Sall. Enzima de restricción I de *Streptomyces albus*.

SDS. Lauril sulfato de sodio (por sus siglas en inglés).

seg. Segundos.

SOC. Medio súper óptimo con represor catabólico (por sus siglas en inglés).

SSTT. Sistema de secreción tipo III.

T. Timina.

Taq. DNA polimerasa termoestable de *Thermus aquaticus*.

Tc. Tetraciclina.

TDTT. Tris Ditiotreitól.

TGH. Transferencia genética horizontal

Tir. Receptor translocado de intimina.

UV. Ultravioleta.

V. Volts.

RESUMEN

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) es una variante patógena de la especie bacteriana *E. coli* que provoca colitis hemorrágica en humanos. Esta característica depende del Locus de eliminación de enterocitos (LEE), una isla de patogenicidad con cinco operones principales (LEE1-5) que codifica a los componentes de un Sistema de secreción tipo III. La expresión del LEE depende de Ler, una proteína codificada en LEE1 cuya expresión alcanza su máximo durante el crecimiento exponencial a 37 °C en medios de cultivo celular. Ler contrarresta la acción represora que ejerce el regulador global H-NS sobre los operones LEE2-5.

Se sabe que Ler regula la expresión del LEE y de varios genes de virulencia adquiridos por transferencia genética horizontal, pero se desconoce si tiene algún blanco relevante para la virulencia de EHEC en el genoma *core* de *E. coli* (que incluye a los genes presentes en todas las cepas conocidas de la especie). Según un estudio reciente (Abe *et al* 2008), en el que se usaron técnicas de monitoreo global de la transcripción y de la unión proteína-DNA, Ler podría regular a varios genes presentes en EHEC y en *E. coli* K-12 (una cepa comensal). En este trabajo se caracterizó la regulación por Ler de 3 de estos genes (electos tras un análisis teórico de los datos de Abe *et al*): *ompC*, que codifica una porina de membrana externa, el gen fimbrial *yehD* y el gen de función desconocida *ypjC*.

Se utilizaron fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* para medir el efecto de Ler sobre la expresión de *ompC*, *ypjC* y *yehD*. La expresión de Ler en *E. coli* K-12 desde un plásmido multicopia reprime la expresión de *ompC-cat* y aumenta la de *ypjC-cat*. Además, se comprobó que Ler se une directamente a las regiones reguladoras de *ompC* y *ypjC* mediante ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA). Sin embargo, al medir la expresión de las fusiones transcripcionales en EPEC y su mutante en *ler* se observó que la fusión *ypjC-cat* es inactiva y que la fusión *ompC-cat* tiene el mismo nivel de expresión en ambos fondos

genéticos. Ler también se une a la región reguladora de *yehD*, pero la fusión *yehD-cat* fue inactiva en todas las condiciones estudiadas.

. Puesto que Ler afecta la expresión de *ompC-cat* y *ypjC-cat* solo al ser sobreexpresada, es posible que estos efectos, así como la unión de Ler a las regiones reguladoras de *ompC*, *ypjC* y *yehD* se deba a la naturaleza inespecífica de la unión de Ler al DNA (que depende de su contenido AT y/o su curvatura). Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que Ler regule a otros genes del genoma *core* y de que su regulación contribuya a la virulencia de EHEC.

I. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli, el organismo procarionte más estudiado, es un bacilo Gram-negativo perteneciente a la clase gammaproteobacteria y a la familia *Enterobacteriaceae*. Se trata del anaerobio facultativo más abundante en la microbiota comensal del colon humano, nicho que comparte con más de 500 especies bacterianas, principalmente anaerobios estrictos (Berg 1996; Prescott *et al.* 2005).

El uso de *E. coli* como organismo modelo es consecuencia de su cercanía al humano, la abundancia de sus variantes inocuas y la facilidad con que puede propagarse en diferentes medios de cultivo (ej. LB o medios selectivos como el McConkey). Estas condiciones propiciaron la obtención de diferentes aislados de *E. coli* a partir de heces humanas. Algunas cepas derivadas de estas muestras, como *E. coli* K-12, obtenida en 1922 de un paciente con difteria, se convertirían en las cepas prototipo de la especie e importantes modelos de estudio en la bioquímica, la biología molecular, la genética y la biotecnología (Lederberg 2004).

Aunque el estudio de *E. coli* se ha centrado principalmente en cepas como K-12, en la actualidad se cuenta con las secuencias genómicas de un abundante número de cepas de diversas procedencias y fenotipos. Con esta información se ha mostrado que la diversidad la especie supera por mucho a la de sus cepas prototipo. El total de genes encontrados en la especie *E. coli* hasta el momento es alrededor de 16000 (el denominado pangenoma), mientras que en una cepa cualquiera hay al rededor de 5000 genes (4288 en K-12 MG1655) (Blattner *et al.* 1997; Lukjancenکو *et al.* 2010). De estos genes aproximadamente 1000 los comparten por todas las cepas estudiadas (el genoma *core*), mientras que el resto son genes accesorios, que sólo están presentes en un grupo de cepas y probablemente son necesarios para contender con condiciones ambientales y nichos muy diversos (Lukjancenکو *et al.* 2010).

Conforme a su versatilidad genética, *E. coli* ocupa diversos nichos ecológicos. Si bien

se identificó como habitante del intestino humano, también se encuentra en el intestino de otros animales. Su prevalencia es alta en mamíferos, pero también se encuentra con menor frecuencia en aves y en reptiles. La aptitud de una especie como hospedero de *E. coli* depende del clima en el que habita, su dieta, su masa corporal y su cercanía con el humano (Gordon y Cowling 2003). Mas aún, *E. coli* puede ser un organismo de vida libre y se ha estimado que la mitad de la población de la especie se encuentra en nichos secundarios como el agua contaminada, los sedimentos y los suelos (Savageau 1983; Tenaillon *et al.* 2010).

Entre los genes accesorios de *E. coli* existen grupos, principalmente localizados en material genético adquirido por transferencia genética horizontal (TGH), que confieren a la bacteria nuevas capacidades de colonización y un fenotipo virulento. Es así que hay variantes de la especie que son patógenas para para el humano u otros hospederos (patotipos), las cuales están asociadas a determinados padecimientos o síntomas clínicos y presentan mecanismos particulares de infección. En el humano, la mayoría de los patotipos tienen como nicho el intestino, donde causan padecimientos diarreicos, pero otros tienen la capacidad de infectar el tracto urinario o de diseminarse a través del torrente sanguíneo provocando sepsis y meningitis (Kaper *et al.* 2004).

Los patotipos que provocan diarrea se caracterizan por su capacidad para colonizar la superficie mucosa a pesar de sus movimientos peristálticos y de la competencia impuesta por la microbiota comensal. Esta capacidad depende, en gran parte, de la expresión de determinados factores de adherencia (ej. fimbrias distintas a las que expresan las variantes comensales), que pueden inclusive permitir la ocupación de nichos alternativos (ej. el intestino delgado, donde *E. coli* está usualmente ausente). No obstante, los patotipos también pueden expresar fimbrias que comparten con la *E. coli* comensal y que les permiten competir por los mismos nichos. Una vez establecida la colonización, la bacteria provoca diarrea por diferentes mecanismos: Producción de enterotoxinas (*E. coli* enterotoxigénica - ETEC- y enteroagregativa -EAEC-), invasión de las células del lumen intestinal (*E. coli* enteroinvasiva -EIEC-) o adherencia íntima al epitelio intestinal e intervención de la maquinaria celular por inyección de diversas proteínas efectoras (*E. coli* enterohemorrágica -EHEC- y enteropatógena -EPEC-) (Kaper *et al.* 2004; Nataro y Kaper 1998).

Los patotipos de *E. coli* son un problema importante de salud pública, ya sea por su relación con brotes epidémicos (ej. de diarrea por EHEC) (Nataro y Kaper 1998) o como causantes comunes de enfermedad (ej. las variantes uropatógenas son responsables de alrededor del 80% de las infecciones del tracto urinario) (Ronald 2002). Sin dejar de lado su importancia médica, la presencia de organismos comensales y de patógenos dentro de la misma especie han hecho de *E. coli* un modelo ideal para estudiar la relación evolutiva entre el comensalismo y la patogénesis (Tenaillon *et al.* 2010).

I.1 Los patotipos EHEC y EPEC

EPEC y EHEC son patotipos que están relacionados a nivel genético y fenotípico pero difieren en aspectos clínicos y epidemiológicos.

La infección por EPEC es un problema importante en los países en vías de desarrollo, donde este patógeno infecta a niños menores de dos años, en quienes provoca diarrea acuosa aguda, vómito y fiebre de baja intensidad. Aunque entre los menores de dos años existen portadores asintomáticos, EPEC se relaciona con tasas de mortalidad de hasta 30% en dicha población. En cambio, no existe una correlación significativa entre la presencia de EPEC y la enfermedad en niños mayores de dos años, pues la bacteria se aísla por igual en individuos sanos y enfermos (Nataro y Kaper 1998). Así mismo, se considera que los adultos no son susceptibles a la infección por EPEC, pues la infección y los brotes epidémicos son infrecuentes y se requiere administrar una dosis elevada de bacterias (10^8 a 10^{10} células) después de neutralizar el ácido estomacal para provocarla (Donnenberg *et al.* 1993; Levine *et al.* 1985). La transmisión de EPEC es fecal-oral y su reservorio son los niños (sintomáticos o asintomáticos) y los adultos que lo portan. Cabe mencionar que otros animales, como los conejos, los cerdos y los perros portan variantes de *E. coli* parecidas al patotipo humano EPEC, pero que no son las mismas que infectan al humano (Nataro y Kaper 1998).

Por su parte, EHEC provoca enfermedades de diversa gravedad, incluyendo diarreas leves, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (*hemolytic uremic syndrome* -HUS-

), un padecimiento renal potencialmente fatal (Kaper *et al.* 2004). En contraste con EPEC, EHEC se relaciona con brotes epidémicos e infecciones esporádicas en países desarrollados, pero provoca una baja morbi-mortalidad en los países en vías de desarrollo, cuyos individuos se especula que disfrutaban de protección cruzada por exposición al patotipo EPEC durante su niñez (J. Mellies *et al.* 2007). La infección por EHEC afecta a niños y adultos y, en los últimos, la dosis infectiva es baja (100 a 200 bacterias). El ganado vacuno es el principal reservorio de EHEC y, en muchos casos, la infección se debe al consumo de carne de bovinos. No obstante, EHEC puede transmitirse de humano a humano y a través de otros alimentos (ej. vegetales crudos) y del agua (Nataro y Kaper 1998).

Los patotipos EPEC y EHEC comprenden varios serotipos que se distinguen por la expresión de un lipopolisacárido y un antígeno flagelar específicos. El serotipo O157:H7 de EHEC es el que se ha asociado más frecuentemente con brotes epidémicos, entre ellos eventos en Estados Unidos y en Japón, donde se aislaron las cepas prototipo EDL933 (Riley *et al.* 1983) y Sakai (Watanabe *et al.* 1996), respectivamente.

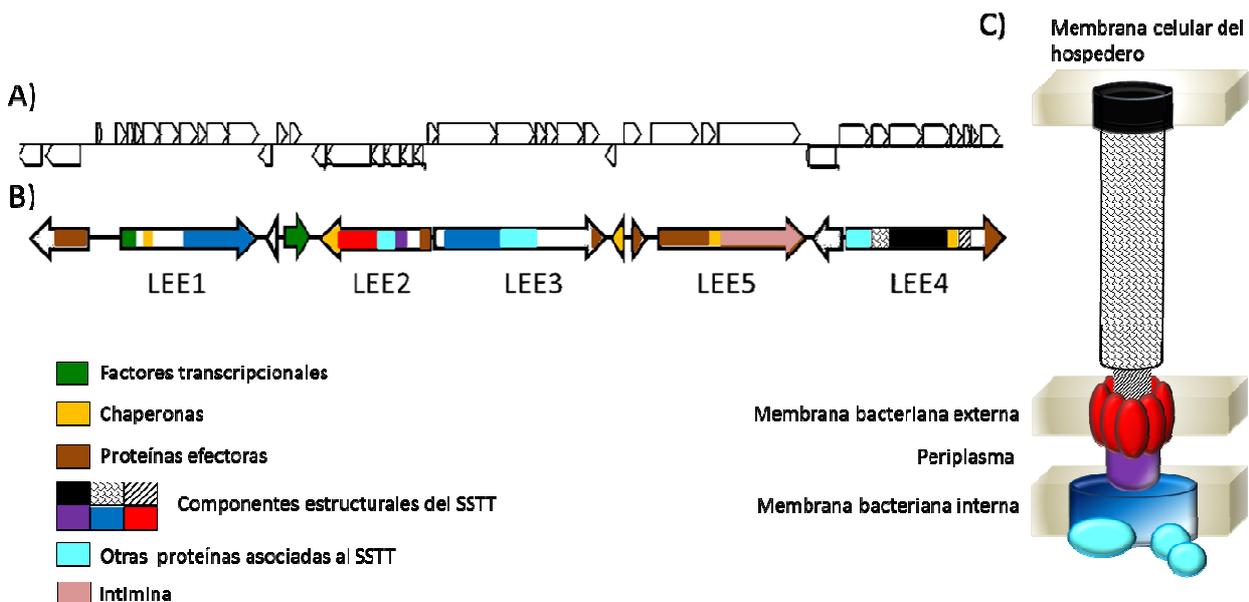
I.2 Factores de virulencia de EHEC y EPEC

I.2.a Sistema de secreción tipo III y proteínas efectoras

Como ya se mencionó, la virulencia en *E. coli*, depende de la presencia de elementos genéticos adquiridos por TGH. Tanto en EPEC como en EHEC, existen varios *loci* que contienen genes relacionados con la virulencia. Algunos de estos *loci* se encuentran en ambos patotipos y otros son característicos de uno de los dos, pero de todos ellos, el Locus de eliminación de enterocitos (LEE por sus siglas en inglés), una isla genómica presente en EPEC, EHEC y en el patógeno de ratones *Citrobacter rodentium* (causante de hiperplasia de colon transmisible) es el conjunto de genes más importante para la virulencia de estos organismos. El LEE codifica diversos factores de virulencia que confieren a la bacteria la capacidad de eliminar las microvellosidades intestinales y adherirse íntimamente a las células del epitelio intestinal, generando las llamadas lesiones de adherencia y eliminación (*attaching y effacing -AE-*) (Campellone 2010; Schmidt 2010).

La mayoría de los genes del LEE están organizados en cinco operones denominados LEE1 a LEE5. En ellos están codificados los componentes de un sistema de secreción tipo III (SSTT) o inyectisoma, un complejo proteico que permite a la bacteria translocar decenas de proteínas hacia el interior de las células del epitelio intestinal (proteínas efectoras) (Figura 1). El SSTT es, en esencia, un conducto formado por los productos de alrededor de 20 genes que conecta el citoplasma bacteriano con el de la célula del hospedero. Los operones LEE1 a LEE3 codifican para componentes del SSTT que atraviesan la superficie bacteriana mediante dos anillos: uno en la membrana bacteriana externa y otro en la interna, conectados a través del periplasma. El resto del SSTT consta de una aguja que se continua con un filamento, el cual protruye de la superficie bacteriana y termina en un anillo que se inserta en la membrana citoplásmica de la célula blanco. Estas estructuras están formadas por varias proteínas codificadas en LEE4 (Garmendia *et al.* 2005).

Figura 1. Organización genética del LEE y estructura del Sistema de secreción tipo III (SSTT). Distribución de los genes (A) y de las unidades transcripcionales (B) que conforman al LEE, tomando como modelo la isla de EPEC E2348/69 (Iguchi *et al.* 2009). El Sistema de secreción tipo III (C) está compuesto por los productos de varios genes codificados en el LEE (ver colores similares en B y C). Las funciones que codifican los genes se explican con mayor profundidad a lo largo de la sección I.2.a. El mapa genético de la isla (A) se obtuvo en la base de datos KEGG (Kanehisa y Goto 2000).



Además de los componentes estructurales, el LEE codifica proteínas que se asocian al SSTT, ya sea para determinar el orden espacio-temporal de la secreción de proteínas o para proveer la energía necesaria para este proceso. Otros genes del LEE codifican chaperonas que favorecen la estabilidad o la secreción de las proteínas translocadas por el SSTT; más aún, varias de las proteínas efectoras secretadas están codificadas en diferentes posiciones del LEE. Por último, la isla codifica para FTs (Factores Transcripcionales) que actúan sobre ella misma y sobre genes de otros *loci*, regulando el proceso de infección y a la proteína intimina, que es esencial en la unión íntima entre la célula del patógeno y la del hospedero (Garmendia *et al.* 2005; J. Mellies *et al.* 2007) .

Las proteínas efectoras tienen funciones diversas. Tir (*Translocated intimin receptor*), la primera efectora en translocarse, está codificada en LEE5. Tras ser inyectada, Tir se inserta en la membrana plasmática del hospedero y sirve como receptor para la proteína intimina, localizada en la membrana bacteriana externa. De esta forma Tir e intimina garantizan la unión estrecha entre la bacteria y el hospedero. Otras proteínas efectoras codificadas en el LEE interfieren con el funcionamiento de las células del epitelio intestinal en varias formas, entre ellas, desestabilizando y remodelando el citoesqueleto (Map, EspF, EspG, EspH y EspB). Una consecuencia importante de estas actividades es la acumulación de actina, en forma de fibras de estrés, por debajo del sitio en que Tir e Intimina interactúan, lo que conlleva la formación de una protuberancia sobre la superficie apical de la célula sobre la cual se encuentra la bacteria (un pedestal), fenotipo distintivo de la lesión AE. Los efectores codificados por el LEE también dañan el funcionamiento y la morfología de las mitocondrias, rompen las uniones estrechas (Map, EspF) e inician la cascada de muerte por apoptosis (EspF) (Campellone 2010; Dean y Kenny 2009; Garmendia *et al.* 2005).

Una importante cantidad de las proteínas efectoras secretadas por el SSTT están codificadas fuera del LEE. Los efectores NleA a NleF y NleH, cuya contribución en la virulencia es variada y aún poco entendida, se encuentran en profagos o islas genómicas tanto en EPEC como en EHEC. Otros, en cambio, son exclusivos de uno de los dos patotipos. Tal es el caso de EspFu (también llamada TccP), una proteína esencial para la formación de pedestales en EHEC, pero que no se requiere en EPEC (Frankel y Phillips

2008) y de EspG2, un homólogo de EspG que se encuentra sólo en algunos serotipos de EPEC (Garmendia *et al.* 2005).

I.2.b Plásmidos de virulencia y toxinas Shiga

Además de la formación de lesiones de adherencia y destrucción, EPEC y EHEC muestran otros mecanismos de virulencia. No obstante, estos mecanismos (y los factores genéticos de los que dependen) no son compartidos.

Para empezar, EPEC porta un plásmido de 70 a 90 kb denominado EAF (*EPEC adherence factor*). Este plásmido codifica a los componentes de la fimbria BFP (*Bundle forming pilus*), un factor de adherencia que une a las bacterias entre sí y posiblemente con el epitelio intestinal. El BFP permite a EPEC adherirse a la superficie del epitelio intestinal formando microcolonias de entre 5 y 200 individuos, un fenotipo que se conoce como adherencia localizada y distingue a EPEC de EHEC. Aunque existen variantes atípicas de EPEC (aEPEC) que carecen de plásmido EAF, éstas muestran fenotipos parecidos al de adherencia localizada, pues cuentan con otros factores de adhesión que compensan la ausencia del BFP (Hernandes *et al.* 2006; Tennant *et al.* 2009; Trabulsi *et al.* 2002). Es importante mencionar que el plásmido EAF también codifica FTs importantes para la virulencia, que actúan sobre el mismo plásmido y (como se verá más adelante) sobre el LEE.

La producción de toxinas Shiga (Stx1 y Stx2) es una característica fundamental del patotipo EHEC. Estas toxinas, codificadas en profagos en el genoma de EHEC, se unen al glicolípidido globotriosilceramida (Gb3) en la superficie del epitelio vascular, tras lo cual su porción catalítica (subunidad A) se internaliza y provoca el arresto de la síntesis de proteínas. Dependiendo de la cantidad de toxinas Shiga producidas, la vasculatura del colon puede resultar dañada, lo que puede dar origen a una colitis hemorrágica. Más aún, las toxinas pueden ser absorbidas a la circulación sistémica y afectar los sitios del endotelio vascular que presentan una mayor cantidad de Gb3 en su superficie. El riñón y el sistema nervioso central son los sitios más frecuentemente afectados. El daño en el riñón puede desatar el

HUS, que en casos graves culmina en la muerte del paciente por falla renal (Gyles 2007; Kaper *et al.* 2004). EPEC, que no produce toxinas Shiga, no provoca colitis hemorrágica ni HUS.

Aunque EHEC no tiene al plásmido EAF, la mayoría de sus aislados clínicos portan al plásmido de virulencia pO157, un replicón de entre 92 y 104 kb que codifica para varias proteínas que podrían estar implicadas en la patogénesis de EHEC (ej. la hemolisina HlyA). Pero a pesar de su amplia distribución en EHEC la importancia del plásmido pO157 para la virulencia no se entiende por completo (Lim *et al.* 2010).

I.3 Regulación de los genes de virulencia en EPEC y EHEC

Para que EPEC o EHEC puedan establecer una infección exitosa requieren una regulación precisa de los genes de virulencia en respuesta a diferentes señales del ambiente. La expresión en el momento y lugar inadecuados de estos genes de virulencia puede ser desfavorable para la bacteria, dado el elevado costo metabólico que implica y la posibilidad de alertar al sistema inmune del hospedero sobre la presencia de la bacteria antes de haber logrado una colonización exitosa (Coombes *et al.* 2005).

La expresión de los genes de virulencia se coordina mediante una red transcripcional que involucra factores codificados en el genoma *core* de *E. coli* y otros codificados en las islas de patogenicidad, en los profagos y los plásmidos relacionados con la virulencia de EHEC y/o EPEC.

I.3.a Regulación del LEE por H-NS y Ler

Gran parte del conocimiento sobre la regulación del LEE se obtuvo al estudiar a EPEC y/o *C. rodentium*. Dado el parecido entre las islas LEE de estos organismos y de EHEC, las observaciones más importantes relacionadas con el fenotipo AE se han extrapolado entre ellos.

En EPEC, la secreción de factores de virulencia por el SSTT varía dependiendo de diversas condiciones que pueden ser controladas en el laboratorio y que en varios casos se considera mimetizan aquellas encontradas por la bacteria en el intestino del hospedero. Como ejemplo, la secreción es baja cuando se crece a EPEC en medios ricos como el LB y, en cambio, es favorecida en medios mínimos usados para cultivo celular, tales como el DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium). La secreción alcanza su máximo durante el crecimiento exponencial a 37°C (la temperatura corporal del hospedero), pH. 7.0 y una osmolaridad fisiológica. Además, el calcio, el fierro y el bicarbonato de sodio favorecen la secreción, mientras que el amonio la inhibe (Kenny *et al.* 1997). Algunos de estos estímulos, como el calcio, actúan a nivel postranscripcional (Ide *et al.* 2003), pero gran parte de ellos, como la temperatura y las condiciones determinadas por el medio de cultivo, actúan modificando la expresión del LEE (J. Mellies *et al.* 2007).

Como ya se mencionó, el LEE está conformado, principalmente, por cinco operones (LEE1 a LEE5). El regulador global H-NS (*Histone-like nucleoid structuring protein*) codificado en el genoma *core* de *E. coli* y que se expresa constitutivamente, reprime la expresión de los operones LEE. La represión del operón LEE1 por H-NS depende de la temperatura y es más evidente cuando EPEC se crece a 27°C, pero su acción se contrarresta a 37°C por la acción de diferentes reguladores (Umanski *et al.* 2002). Es así que al crecer a EPEC en medio de cultivo celular a 37°C, se expresa Ler, una proteína homóloga a H-NS codificada por el primer gen del operón LEE1. Ler es necesaria para el establecimiento de lesiones AE por EPEC y EHEC (Elliott *et al.* 2000; Friedberg *et al.* 1999) y para el establecimiento de una infección por rEPEC (“rabbit EPEC”) y *C. rodentium* en modelos animales (Deng *et al.* 2004; Zhu *et al.* 2006). Su función consiste en desplazar a H-NS de los promotores de LEE2 a LEE5 y de otros promotores del LEE (cuya represión por H-NS no es temperatura-dependiente), permitiendo la activación completa de la isla (ver más adelante) (J. Mellies *et al.* 2007; Umanski *et al.* 2002).

Cabe mencionar que la proteína Ler también interviene en la expresión de proteínas efectoras codificadas en elementos genéticos fuera del LEE tanto en EPEC como en EHEC (Elliott *et al.* 2000; Roe *et al.* 2007; Rojas-Lopez *et al.* 2011; Schwidder *et al.* 2011; Tree *et al.* 2009). Así pues, Ler es un regulador global de la virulencia de estos organismos.

I.3.b Mecanismos de acción de H-NS y Ler

H-NS es una de las proteínas asociadas al nucleoide, implicadas en la organización y empacamiento del cromosoma bacteriano que también participa en la regulación transcripcional de más de 1000 de genes en *E. coli* K-12, actuando como represor en la mayoría de los casos. Esta proteína no reconoce una secuencia de DNA específica, sino que se une a regiones de alto contenido de A+T, que es característico de los elementos genéticos adquiridos por TGH. Con base en estas características se ha propuesto que H-NS ha actuado como un mecanismo de seguridad en la evolución de cepas patógenas, evitando la potencialmente peligrosa expresión del DNA exógeno. Si la información adquirida representa una ventaja adaptativa para la célula receptora podrían entonces desarrollarse mecanismos de control transcripcional, ya sea mediados por reguladores pre-existentes o mediante la adquisición de reguladores específicos, que permitan su adecuada expresión espacio-temporal de acuerdo a la función que desempeñan (Navarre *et al.* 2007; Oshima *et al.* 2006).

La acción represora de H-NS se relaciona con su capacidad para formar dímeros que polimerizan a lo largo de las regiones de alto contenido de A+T, cubriendo a los promotores y en ocasiones a varias secuencias codificantes contiguas. Los dímeros de H-NS unidos a regiones adyacentes de DNA pueden interaccionar entre sí formando tetrámeros u oligómeros más complejos. De esta forma H-NS dobla el DNA evitando el acceso de la RNA polimerasa a los promotores o incluso atrapándola en el complejo nucleorepresor, con lo que impide la transcripción (Navarre *et al.* 2007; Oshima *et al.* 2006) .

Las proteínas H-NS y Ler son homólogas. En ambas pueden distinguirse una región de α -hélices en el extremo N-terminal que contiene un dominio “*coiled-coil*”. En el dominio C-terminal (el más similar entre Ler y H-NS) se encuentra a su vez un motivo HTH (“*helix-turn-helix*”) de unión al DNA. Las regiones N-Terminal y C-terminal se encuentran unidas por una secuencia enlazadora o “*linker*”. En H-NS el dominio *coiled-coil* es necesario para la dimerización y participa, junto con el *linker*, en la formación de oligómeros de alto peso molecular (Dorman 2004). Se sabe que los tres dominios son importantes para la activación

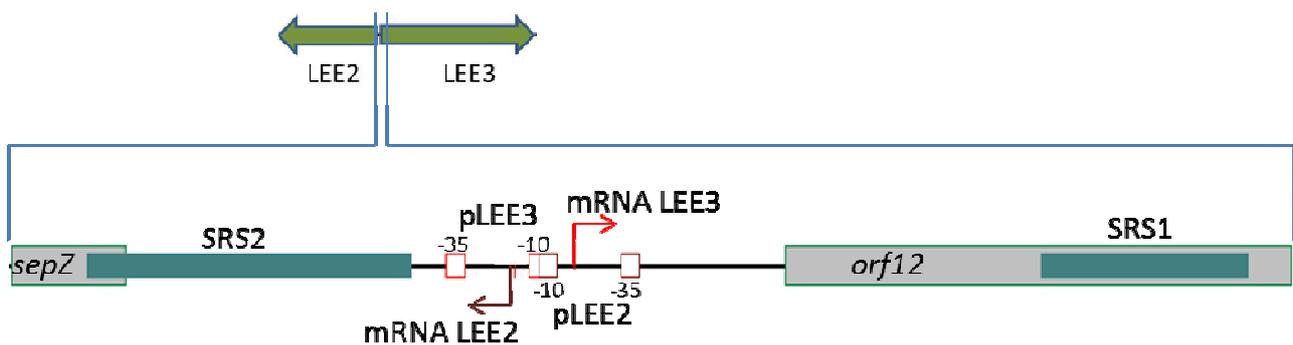


Figura 2. Región reguladora de los operones LEE2 y LEE3. Los promotores de los operones divergentes LEE2 y LEE3 están flanqueados por los elementos de regulación SRS2 y SRS1 (que se traslapan con las secuencias codificantes de *sepZ* y *orf12*, respectivamente). H-NS se une a ambas secuencias reguladoras, mientras que Ler se une solamente a SRS2 (ver texto).

transcripcional por parte de Ler, no obstante, aunque el dominio N-terminal puede ser parcialmente sustituido por el de H-NS sin detrimento de la función de Ler, el linker y el dominio de unión a DNA son funcionalmente distintos y su reemplazo con los equivalentes de H-NS genera proteínas carentes de la actividad anti-represora de Ler (J. Mellies *et al.* 2008; Sperandio *et al.* 2000).

Al igual que H-NS, Ler forma oligómeros que cubren grandes regiones de DNA (J. L. Mellies *et al.* 2011; Sperandio *et al.* 2000) y conforme a la similitud de sus dominios C-terminal, ambas proteínas se unen a las mismas regiones río arriba de los operones LEE2 y LEE5 (Haack *et al.* 2003; J. Mellies *et al.* 2007). La regulación de los operones divergentes LEE2 y LEE3 por Ler y H-NS es el caso mejor estudiado de regulación en el LEE. La región reguladora divergente de los operones LEE2 y LEE3 (Figura 2) la flanquean dos elementos importantes para su regulación denominados SRS1 y SRS2 (“*silencing regulatory sequence*”). H-NS se une a los dos silenciadores para reprimir a ambos promotores (pLEE2 y pLEE3); sin embargo, Ler se une sólo a SRS1 (río arriba de LEE2). Con base en estos antecedentes, se propone que la proteína H-NS, unida a SRS1 y 2, interaccionan de lado a lado de la región promotora, formando un complejo nucleorepresor y que Ler desestabiliza el complejo desplazando a H-NS de SRS1 (Bustamante *et al.* 2001; Sperandio *et al.* 2000). Así pues, la función de Ler es desplazar a H-NS de algunos de sus sitios de unión cercanos a los

promotores para así evitar la formación de oligómeros y, por tanto, de complejos que evitan el acceso de la RNA polimerasa (Mellies, Barron *et al.* 2007; Bustamante *et al.*, en preparación). Cabe notar que Ler no es un antagonista general de H-NS, pues no actúa sobre cualquier gen reprimido por este último (J. Mellies *et al.* 2007), aunque la secuencia o características estructurales del DNA que reconoce no han sido aún determinadas.

I.3.c Otros reguladores del LEE que actúan a través de Ler

La expresión del operón LEE1, y por tanto de *ler*, también está regulada por un mecanismo dependiente de las proteínas reguladoras codificadas en el mismo LEE. Ler activa la expresión del operón *grlRA*, que forma parte del LEE. El activador GrlA codificado en este operón es necesario, a su vez, para la expresión de LEE1. Así pues, existe un circuito de regulación positiva conformado por Ler y GrlA (Barba *et al.* 2005). El regulador GrlA está conservado en EPEC y EHEC, por lo que se asume que funciona de forma similar en ambos organismos. Además, el regulador GrlR, codificado en el mismo operón que GrlA, regula en forma negativa la expresión de Ler (Deng *et al.* 2004; Lara, C. *et al.*, en preparación).

También existen reguladores del LEE en otros elementos móviles presentes en EPEC o EHEC. Entre ellos destaca PerC de EPEC, cuyo gen se sitúa en el *locus per* del plásmido EAF. PerC no posee homología con los reguladores conocidos, ni presenta características de proteínas que se unen al DNA (ej. un dominio HTH); sin embargo, se requiere bajo ciertas condiciones de crecimiento para activar la expresión del operón LEE1 y de esta manera del resto de los genes del LEE a través de Ler (Bustamante *et al.* 2001; J. L. Mellies *et al.* 1999). En EHEC hay 7 homólogos de PerC denominados PchA a E, PchX y PchY codificados en profagos. De ellos, PchA a C activan a LEE1 y su presencia conjunta es necesaria para la activación completa del LEE y, por lo tanto, para la adherencia de EHEC a células epiteliales humanas (Iyoda y Watanabe 2004). Cabe notar que en ensayos a gran escala (microarreglos y Chlp-chip) se ha observado que, al igual que Ler, las proteínas PchA-C también regulan algunos genes de virulencia diferentes al LEE y podrían considerarse reguladores globales de virulencia (Abe *et al.* 2008). Finalmente, en EHEC hay otro ejemplo de comunicación entre

los genes localizados en distintos *loci* de virulencia adquiridos por TGH. En este patotipo la isla de patogenicidad ETT2, que contiene genes homólogos a los de un SSTT, no es funcional ya que varios de ellos han sido inactivados por múltiples mutaciones (Ren *et al.* 2004), pero posee dos genes, *etrA* y *eivF*, que son funcionales y sus productos reprimen la expresión del LEE, afectando así la secreción mediada por su SSTT y la adhesión a células intestinales humanas (Zhang *et al.* 2004).

A la regulación del LEE mediada tanto por los reguladores específicos codificados en esta isla de patogenicidad, como por aquellos codificados por otros *loci* de virulencia, se añade la acción de FTs codificados en el genoma *core* de *E. coli* (J. Mellies *et al.* 2007). Además de H-NS, las proteínas IHF y Fis, que también están asociadas al nucleoide, regulan al LEE en EPEC, pero en contraste con H-NS actúan positivamente sobre la expresión del LEE1 y, por tanto, son importantes para el establecimiento de las lesiones AE sobre las células epiteliales (Friedberg *et al.* 1999; Goldberg *et al.* 2001). En EHEC se ha mostrado que la proteína Hha, también asociada al nucleoide, reprime a LEE1 (Sharma y Zuerner 2004), mientras que la proteína BipA, de la familia de las GTPasas que se unen a ribosomas, activa a LEE1 en EPEC (Grant *et al.* 2003).

Los sistemas de detección del quórum (*quorum sensing*), con los que las bacterias monitorean la abundancia de los miembros de su especie o incluso de otras especies, juegan un papel importante en la regulación del LEE en EHEC. Un mecanismo de detección del quórum consta, en esencia, de una molécula de señalización denominada autoinductor, que se libera al medio, y de un receptor para el mismo autoinductor. El receptor puede ser una histidina-cinasa localizada en la membrana bacteriana o bien, una proteína reguladora intracelular (cuando el autoinductor difunde a través de la membrana). Tanto el autoinductor como el receptor son producidos por la misma especie o grupo de especies bacterianas (Taga y Bassler 2003). En EHEC existe un sistema de detección del quórum que activa a LEE1. El receptor de dicho sistema es el sistema de dos componentes QseCB, que detecta al autoinductor-3 (de estructura desconocida) y a las hormonas epinefrina y norepinefrina, que produce el hospedero. También el sistema de dos componentes QseEF activa la expresión del LEE y de la proteína efectora EspFu, que está codificada fuera del LEE, en respuesta a la adrenalina, los sulfatos y los fostatos (Hughes y Sperandio 2008).

I.4 Origen e importancia adaptativa del LEE en *E. coli*

Las cepas de la especie *E. coli* portan una gran cantidad de elementos genéticos obtenidos por TGH. Como ejemplo, el 17% del genoma de *E. coli* K-12 MG1655 (721 genes) es de origen extrínseco (Nakamura *et al.* 2004). El LEE proviene de una especie distinta a *E. coli*, como lo prueban su contenido GC (38%) menor al de los genomas secuenciados de la especie (50%) (Lukjancenko *et al.* 2010) y su ausencia en las cepas comensales de la misma. Además, los sitios de integración de la isla en los genomas de EPEC y EHEC (genes de tRNA) son puntos frecuentes de integración de distintos elementos genéticos móviles (Gal-Mor y Finlay 2006; Donnenberg y Whittam 2001).

Varios grupos filogenéticos o linajes de *E. coli* han adquirido en forma independiente al LEE. Así pues existen subgrupos de EPEC y/o EHEC en los linajes E, B1 y B2 de la especie, en los que también se incluyen cepas comensales y de otros patotipos (Tenailon *et al.* 2010; Ogura *et al.* 2009). Los subgrupos de EPEC y EHEC se distinguen entre otras cosas por el serotipo y el sitio de inserción del LEE en sus miembros (Donnenberg y Whittam 2001). Cabe mencionar que, al igual que el LEE, otros factores de virulencia distintivos de EPEC o EHEC (el plásmido EAF y los genes de las toxinas Shiga) fueron adquiridos en forma independiente por sus subgrupos (Reid *et al.* 2000).

La distribución del LEE en *E. coli* indica que no se requiere un fondo genético específico de alguno de los linajes para la adquisición y expresión de la isla. Más aún, la expresión del LEE de EPEC E2348/69 (Iguchi *et al.* 2009) en *E. coli* K-12 confiere a esta cepa comensal la capacidad para formar lesiones AE en cultivos celulares (McDaniel y Kaper 1997). En contraste, los factores de virulencia que se relacionan con infecciones extraintestinales están presentes en cepas de diferentes linajes, pero sólo en los grupos filogenéticos D y B2 de *E. coli* su presencia se asocia con un fenotipo patógeno (Escobar-Páramo *et al.* 2004).

Existen datos que sugieren que la expresión del SSTT supone un costo para la adecuación. En un cultivo de *Salmonella typhimurium* los individuos que expresan al inyectisoma tienen una tasa de crecimiento menor que los que no lo hacen (Sturm *et al.* 2011), mientras que en el patógeno de plantas *Pseudomonas syringae* las mutantes en que impiden el funcionamiento del SSTT crecen más rápido que una cepa silvestre (Schreiber *et al.* 2012). En este contexto las adquisiciones independientes del LEE, así como su permanencia y expresión en múltiples cepas de *E. coli* apuntan a que la isla confiere a la bacteria receptora una ventaja adaptativa que compensa la disminución de la adecuación (Reid *et al.* 2000).

El contexto en el que el LEE representa una ventaja adaptativa para *E. coli* es un tema controversial. La isla pudo ser objeto de selección positiva por su participación en funciones distintas a la patogénesis. De hecho EHEC también tiene como hospedero a los bovinos, en quienes funge como comensal y en donde las proteínas Tir e intimina, codificadas en el LEE contribuyen a la colonización del recto terminal (Sheng *et al.* 2006). Por otro lado, parte de las cepas de *Vibrio parahaemolyticus* portan un SSTT (SSTT-2) que usan para matar a los protozoarios con quienes cohabitan en ambientes marinos y estuarinos (Matz *et al.* 2011). Este mismo sistema participa en la enteropatogénesis de *V. parahaemolyticus* en humanos, secundaria al consumo de alimentos contaminados de origen marino (Broberg *et al.* 2011).

II. ANTECEDENTES

Como se explicó anteriormente, aunque los *loci* que contienen genes de virulencia en EHEC se adquirieron en eventos independientes de TGH, la expresión de sus unidades transcripcionales está corregulada mediante FTs codificados en los mismos *loci* (ej. Pch y Ler). Más aún, los genes de virulencia no están aislados del resto de la red transcripcional de *E. coli*, sino que su expresión se ve afectada por FTs cuyos genes pertenecen al genoma *core* (conformado por *loci* presentes en la mayoría de las cepas de *E. coli*). Así pues, la virulencia de EHEC depende de una red transcripcional compleja.

La proteína Ler, codificada en el LEE, es central para la patogenicidad de EHEC por que permite la activación del LEE y de otros genes de virulencia de EHEC. Además, al ser Ler el principal regulador de la isla, es su expresión donde converge la acción de diversos FTs codificados en el genoma *core* y, por tanto, donde se integra la red de regulación compleja que controla a los genes de virulencia. Ahora bien, una posibilidad no explorada es que Ler, a su vez, haya sido integrado a la regulación de uno o más genes del genoma *core*. La corregulación de dichos genes con los factores de virulencia podría conferir alguna ventaja a EHEC, ya sea en la colonización o en la infección del hospedero.

Existen evidencias que sugieren que los FTs adquiridos por TGH y relacionados con la virulencia afectan la transcripción de genes del genoma *core*. En EHEC el flagelo participa en la adhesión inicial a células epiteliales de bovinos, pero su expresión se reprime posteriormente durante la formación de las lesiones AE (Mahajan *et al.* 2009). Más aún, en condiciones en que se expresa el LEE (fase exponencial en DMEM a 37°C) tanto EPEC como EHEC carecen de flagelo (Yona-Nadler *et al.* 2003). Este efecto se debe, al menos en parte, a la acción de GrlA (codificada en el LEE), aunque no se ha comprobado la unión directa de GrlA a los genes relacionados con la biosíntesis del flagelo. Se piensa que la regulación coordinada del LEE y los genes flagelares es necesaria porque el flagelo representa un impedimento estérico para la interacción del SSTT con el epitelio del

hospedero. En apoyo a esta teoría, la expresión constitutiva de *flhDC* (que codifican activadores de los genes flagelares) inhibe la adherencia a células intestinales (Iyoda *et al.* 2006; Tree *et al.* 2009).

Además, otras funciones codificadas en el genoma *core* de *E. coli* son importantes para que esta especie colonice a su hospedador, lo cual las vuelve importantes para la patogénesis en el caso de EHEC O157:H7. Tal es el caso de los sistemas de resistencia a ácidos que le permiten a varias cepas de EHEC y cepas comensales sobrevivir a la acidez del estómago tras la ingesta oral (Lin *et al.* 1996). Por otra parte, hay evidencia de que ciertas funciones conservadas en *E. coli* podrían utilizarse en forma distinta en EHEC O157: H7 y en *E. coli* K-12. Como ejemplo, se ha observado que EHEC y *E. coli* K-12 utilizan un grupo diferente de fuentes de carbono durante la colonización del hospedero (Fabich *et al.* 2008).

En un estudio reciente Abe *et al.* (2008) utilizaron técnicas de recolección de datos a gran escala para identificar a los genes que forman parte del regulón de Ler y PchA-C en EHEC O157:H7. Los autores tomaron como modelo a la cepa Sakai y a sus mutantes Δler , $\Delta pchA$ $\Delta pchB$ y $\Delta pchA$ $\Delta pchB$ $\Delta pchC$ y realizaron 13 experimentos de microarreglos. En cada uno de ellos se comparó la expresión en una de las mutantes contra la cepa silvestre o en la misma cepa con distintos plásmidos (*p_{ler}* o *p_{pchA}* que sobre-expresan a Ler o PchA respectivamente y un plásmido control *pC*). Cada comparación se realizó con RNA proveniente de cultivos crecidos en LB y también a partir de cultivos en DMEM.

Abe *et al.* (2008) obtuvieron los cambios de expresión para cada gen en los 13 experimentos e identificaron aquellos con patrones de expresión similares (195 genes) u opuestos (147 genes) a los del LEE. Estos genes son posibles miembros del regulón de Ler y/o Pch, puesto que los patrones de expresión provienen de experimentos en los que se alteró la presencia de alguna de las dos proteínas. Los autores también midieron la unión de Ler y PchA a los genes de EHEC y EHEC $\Delta pchB$ $\Delta pchC$ respectivamente mediante Chip-chip. Con ello observaron la unión de Ler a 85 de los genes con patrones de expresión similares u opuestos a los del LEE (PchA también se detectó unida a la mayoría de ellos). Interesantemente, 22 de los 85 genes están presentes tanto en EHEC como en *E. coli* K-12, por lo que podrían formar parte del genoma *core* de *E. coli*.

Los resultados de Abe *et al* (2008) reafirman el papel de Ler y Pch como reguladores globales de virulencia y sugieren la existencia de nuevos blancos para estas proteínas. Este es un buen punto de partida para investigar el posible papel de Ler, que es indispensable para la virulencia de EPEC y EHEC, como regulador de genes del genoma *core* de *E. coli*. Dichos genes podrían haber sido incorporados al regulón de Ler durante la evolución de estos patógenos por codificar funciones que proporcionaron ventajas adaptativas o, para el caso de genes que son aparentemente reprimidos por Ler, que representaron una desventaja para el establecimiento de una colonización o una infección exitosas.

III. HIPÓTESIS

Si la regulación conjunta de los factores de virulencia distintivos de EHEC 0157:H7 y los genes del genoma *core* de *E. coli* contribuye a la colonización e infección por parte de este patotipo, entonces el regulador global de virulencia Ler, podría regular también genes del genoma *core*.

IV. OBJETIVOS

IV.1 Objetivo general

Comprobar y, en su caso, caracterizar el efecto de Ler en la expresión de genes del genoma *core* de *E. coli* en EHEC O157:H7

IV.2 Objetivos particulares

Seleccionar a varios genes de interés entre los posibles blancos de Ler reportados por Abe *et al* (2008) con base en los datos de dicho estudio y en otras características previamente estudiadas de los genes.

Medir el efecto de Ler sobre la expresión los genes seleccionados en distintas etapas de crecimiento, diferentes cepas de *E. coli* y en medios de cultivo que favorecen la expresión de la isla LEE o que la disminuyen.

Si se observa un efecto de Ler en la expresión de los genes de interés, comprobar si este se debe a la unión directa de Ler a la región reguladora del gen.

Comparar la regulación mediada por Ler de los genes del genoma *core* de EHEC seleccionados, con el efecto de Ler en los genes correspondientes de *E. coli* K-12.

V. MÉTODOS

V.1 Herramientas bioinformáticas

El contexto genético de varios genes de EHEC O157:H7 se estudió usando la herramienta GeConT II (Gene Context Tool II), disponible en <http://bioinfo.ibt.unam.mx/gecont/> (Ciria *et al.* 2004).

Para calcular la magnitud de la respuesta transcripcional de diferentes genes de *E. coli* ante la sobre expresión o eliminación de Ler, se partió de los archivos depositados por Abe *et al* (2008) en la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Cada uno de estos archivos contiene los resultados para una sola lectura de microarreglo. Se tomaron en cuenta 4 experimentos, dos en los que se compara la expresión en EHEC O157:H7 Sakai Δ ler con la expresión en la cepa silvestre y dos en los que se compara a EHEC que porta un plásmido que sobreexpresa a Ler (pLer) con EHEC que porta un plásmido control. En cada caso un experimento se hizo partiendo de cultivos crecidos en LB y otro partiendo de cultivos en DMEM. Ya que cada experimento se realizó por duplicado se obtuvieron 8 archivos en total.

Los archivos de Abe *et al* (2008) indican la intensidad de la señal para todos los genes de EHEC O157:H7 en a) la condición relevante (la mutante de *ler* o la sobreexpresión de Ler) y b) en la condición control (la cepa silvestre). A partir de cada archivo se calculó el cambio relativo en la señal para cada gen como:

$$\text{Cambio relativo} = \log_2 (\text{condición relevante} / \text{condición control})$$

Una vez calculado el cambio relativo de la señal a nivel genómico se promediaron los valores de cambio para las dos réplicas de los mismos experimentos y, finalmente, se

encontraron los valores correspondientes a los 22 genes que según Abe *et al* (2008) tienen patrones de expresión relacionados con los del LEE y son unidos por Ler. Este procedimiento se llevó a cabo usando códigos de Java y comandos de la terminal de Linux.

Para analizar la conservación de genes en la especie *E. coli* se creó una tabla de ortólogos utilizando el programa DomClust disponible en la Microbial Genome Database (<http://mbgd.genome.ad.jp/>). Para tal fin se tomaron en cuenta los genomas de 30 cepas de *E. coli*; éstas son: ED1a, HS, IAI1, K12 (DH10B, W3110, MG1655 y BW2952), BL21(DE3), SE11, ATCC 8739 y rel606 (comensales); SECEC SMS-3-5 (aislado ambiental); EC4115, Sakai, EDL933, 11368, 11128 y TW14359 (aislados de EHEC); E2348/69, B171 y E22 (aislados de EPEC); 536, CFT073, UTI89, IAI39, UMN026 y S88 (patógenos extraintestinales); E24377A (ETEC); 55989 (EAEC) y APEC 01 (APEC).

V.2 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas y los plásmidos utilizados en este estudio se enlistan en la Tabla 1. Se usaron los medios LB (contiene 10g de triptona, 5g de extracto de levadura y 10g de NaCl por litro, ajustado a pH 7.5 con NaOH) y DMEM (Gibco BRL Life Technologies, contiene alta glucosa, L-glutamina e hidrocloreuro de piridoxina. El medio LB se suplementó según fue requerido con los siguientes antibióticos: Amp (100-200 µg/ml), Tc (6-12 µg/ml) y Strp (100 µg/ml).

V.3 Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados se solicitaron a la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología-UNAM y se enlistan en la Tabla 2.

TABLA 2. Oligonucleótidos usados en este estudio

OLIGO	SECUENCIA 5'-3'	CARACTERÍSTICAS	USO
ompC-F2	<u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>G</u>	Introduce un sitio de corte de BamHI. Oligo a favor	pOMPC
ompC-R	<u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u>	Introduce un sitio de corte de HindIII. Oligo reverso	pOMPC
yehD-F	<u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u>	Introduce un sitio de corte de BamHI. Oligo a favor	pYEH
yehD-R	<u>T</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u>	Introduce un sitio de corte de Sall. Oligo reverso	pYEH
ypjC-F	<u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>C</u>	Introduce un sitio de corte de BamHI. Oligo a favor	pYPJC
ypjC-R	<u>C</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>G</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>G</u> <u>T</u> <u>T</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>T</u> <u>A</u> <u>C</u> <u>C</u>	Introduce un sitio de corte de HindIII. Oligo reverso	pYPJC
pKK232-BHI-F		Oligo a favor	Secuenciación de fusión ompC-cat
pKK232-H3-R		Oligo reverso	Secuenciación de fusión ompC-cat
pKK8-H3-R		Oligo a favor	Amplificación de fragmentos de DNA para EMSA
pKK8-H3-R		Oligo reverso	Secuenciación de fusiones yehD-cat y ypjC-cat Amplificación de fragmentos de DNA para EMSA

TABLA 1. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio. *Sm^r* y *Km^r* son resistentes a estreptomicina y kanamicina, respectivamente.

	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
Ceba		
EDL933	EHEC silvestre O157:H7	<u>Kaper et al. 2004</u>
E2348/69	EPEC silvestre O127:H6 <i>Sm^r</i>	<u>Levine et al. 1978</u>
EPEC <u>Δler</u>	EPEC <u>Δler</u> O127:H6 <i>Sm^r Km^r</i>	<u>Bustamante et al. 2001</u>
MC4100	F' <u>araD139 Δ(araF-lac) U169 rnsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR</u> <i>Sm^r</i>	Casadaban 1976
BL21/pLys21	F' <u>ompT(lon) hsdS₈(r₅ m₅⁻) gal dcm</u> (ADE3)	<u>Invitrogen</u>
Plásmido		
pMPM-T3	Vector de <u>clonación</u> derivado del p15A con un promotor <u>inducible</u> por IPTG	<u>Mayer, 1995</u>
pT3Ler y pT6Ler	Derivados de pMPM-T3 que expresan Ler-His6 bajo el control de un promotor <u>inducible</u> por <u>arabinosa</u> e IPTG, respectivamente.	Laboratorio
pKK232-8	Derivado de pBR322 que contiene el gen <u>cat</u> (<u>cloranfenicol acetil transferasa</u>) sin promotor, utilizado para la construcción de fusiones <u>transcripcionales</u> .	<u>Pharmacia Biotech</u>
<u>pSEPZ-11</u>	Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión <u>transcripcional</u> <u>sepZ-cat</u> de la región -469 a +121 con respecto al inicio de transcripción del <u>operón</u> LEE2.	<u>Bustamante et al. 2001</u>
<u>pOMPC</u>	Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión <u>transcripcional</u> <u>ompC-cat</u> de la región -243 a +395 con respecto al inicio de transcripción más cercano a la región <u>codificante</u>	Este estudio
<u>pYEHD</u>	Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión <u>transcripcional</u> <u>yehD-cat</u> . Comprende 471 pb río arriba y 246 pb río abajo del inicio de la región <u>codificante</u> de <u>yehD</u> .	Este estudio
<u>pYPJC</u>	Derivado de pKK232-8 que contiene la fusión <u>transcripcional</u> <u>yehD-cat</u> . Comprende 471 pb río arriba y 246 pb río abajo del inicio de la región <u>codificante</u> de <u>ypjC</u> .	Este estudio

V.4 Construcción de fusiones transcripcionales

Para la construcción de las fusiones transcripcionales *ompC-cat*, *yehD-cat* y *ypjC-cat* se utilizaron los oligonucleótidos listados en la Tabla 2. Con ellos se realizaron reacciones de PCR utilizando como molde DNA genómico de la cepa EDL933 (EHEC O157:H7). Para amplificar la región reguladora de *ompC* se usó Taq recombinante de alta fidelidad (Invitrogen) en presencia de MgSO₄ 1.5 mM, dNTPs (cada uno a concentración 1.5 mM) y 2 ng/μl de cada oligo. En el caso de las regiones reguladoras de *yehD* y *ypjC* se utilizó la mezcla Accuprime™ SuperMix II (Invitrogen) y 4 ng/μl de cada oligo. Los programas de amplificación fueron:

Con Taq recombinante

- 94°C 10 min

35 ciclos de:

94°C 1 min

53°C 1 min

72°C 1 min 30 seg

- 72°C 10 min

Con Accuprime™ SuperMixII

- 94°C 2 min

35 ciclos de:

94°C 30 seg

53°C 30 seg

68°C 1 min 30 seg

- 68°C 10 min

Una vez obtenidos los productos de PCR, se purificaron utilizando los estuches comerciales AxyPrep™ PCR cleanup o AxyPrep™ DNA gel extraction de Axygen de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los productos de PCR y el plásmido pKK232-8 (purificado con AxyPrep plasmid miniprep Kit de Axygen) fueron entonces digeridos con las enzimas de restricción BamHI y HindIII o Sall de la siguiente manera:

		Región reguladora <i>yehD</i>	pKK232-8
Primera digestión	Mezcla de reacción de 100 µl aforada con H ₂ O desionizada	Producto de PCR en 34 µl de H ₂ O desionizada	Plásmido en 55 µl de H ₂ O desionizada
		10 µl de buffer REact 3 (Invitrogen) y 2µl de BamHI	
	Condiciones de digestión:	3h a 37°C	
Segunda digestión	Mezcla de reacción de 100 µl	Producto de la primera reacción purificado (región reguladora de <i>yehD</i> o pKK232-8) en 88 µl de H ₂ O desionizada	
		10 µl de buffer REact 10 (Invitrogen) y 2µl de Sall	
	Condiciones de digestión:	3h a 37°C	

	Región reguladora <i>ompC</i>	Región reguladora <i>ypjC</i>	pKK232-8
Volumen de la reacción: (aforado con H ₂ O desionizada):	50 µl	100 µl	100 µl
Mezcla de reacción	PCR en 25 µl de H ₂ O desionizada	PCR en 17 µl de H ₂ O desionizada	Plásmido en 58 µl de H ₂ O desionizada
	5 microlitros buffer Sure/Cut B (Roche)	10 microlitros buffer Sure/Cut B	10 microlitros buffer Sure/Cut B
	2 µl de BamHI y 2 µl de HindIII en todos los casos		
Condiciones de digestión:	4h a 37°C		

Tras cada digestión el plásmido pKK232-8 y cada región reguladora se purificaron con el AxyPrep™ PCR cleanup Kit. Finalmente, plásmido e insertos se ligaron utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Promega), para lo cual se prepararon mezclas de 20 µl con 5 µl del vector y 5 µl del inserto (para la fusión *ompC-cat*) u 8 µl del vector y 9 µl del inserto (fusiones *yehD-cat* y *ypjC-cat*). A esto se añadieron 2 µl del amortiguador de la ligasa, 1 µl de la ligasa y la cantidad correspondiente de H₂O desionizada. La mezcla se incubó a 16°C toda la noche y se purificó mediante una precipitación con glicógeno como se describe a continuación: Se agregó 1 µl de glicógeno a cada mezcla de ligación, mezclando por pipeteo. Se añadieron 500 µl de etanol al 100%. Después de incubar la mezcla a -20°C por 30 min, se centrifugó a 14000 rpm por 15 min, se desechó el sobrenadante y se secó la pastilla en un Savant a temperatura alta por 15 min. Se resuspendió el DNA en 10-20 µl de H₂O desionizada.

La cepa MC4100 se transformó con diferentes volúmenes de cada producto de ligación por electroporación, se recuperaron las células en medio SOC (contiene bacto triptona 2 g, extracto de levadura 0.5 g, NaCl 5M 0.2 ml, KCl 1M 0.25 ml, MgCl 1M 1 ml, MgSO₄ 1 M 1 ml y glucosa 0.36 g aforado a 100 ml) a 37°C por 1 h y media y se cultivaron en agar LB con Amp 100 µg/ml para seleccionar a aquellas que tuvieran el plásmido. Posteriormente, se eligieron varias colonias para inocular cultivos de 5 ml de LB con Amp 100 µg/ml y Strp 100 µg/ml, de donde se extrajo el plásmido por Miniprep como se describe a continuación:

Se centrifugaron 3 ml de cultivo por 6 min a 13000 rpm. Se resuspendió la pastilla en 200 µl de solución GET (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0), se adicionaron 200 µl de solución de lisis (NaOH 0.2 N y SDS 1%), se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 5 min. La mezcla se centrifugó a 13000 rpm por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se le agregaron 300 µl de fenol y 200 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1). Se centrifugó a 13000 rpm por 5 min y tras recuperar la fase acuosa en otro tubo se agregó 1 ml de etanol absoluto. La mezcla se incubó a -70°C por 15 min y se centrifugó a 14000 rpm por 10 min. Se decantó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 1 ml de etanol al 70% (centrifugando a 14000 rpm 5 min). Finalmente la pastilla se secó en un Savant a alta temperatura y se resuspendió el DNA en 50 µl de H₂O desionizada.

Para corroborar las construcciones se observó su movilidad electroforética con respecto al vector pKK232-8 vacío en un gel de agarosa al 1%. Una vez revisadas, las construcciones se purificaron con el estuche comercial High Pure Plasmid Isolation Kit (Roche) y se secuenciaron en la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM. Los plásmidos que contenían fusiones transcripcionales sin mutaciones se usaron para transformar a las cepas de EPEC silvestre y Δler y a *E. coli* MC4100 (previamente transformada con pT3Ler o pMPM-T3) con el procedimiento ya mencionado.

V.5 Ensayo de actividad de CAT

La determinación de la actividad de las fusiones transcripcionales al gen *cat* se realizó según el método ya descrito (Puente *et al.* 1996) En breve, las cepas transformadas con las fusiones transcripcionales se cultivaron a 37°C en 5 ml de LB adicionado con Amp y Tc (cuando el fondo genético era MC4100) o con Amp y Strp (para los fondos genéticos EPEC y EPEC Δler). Estos precultivos se usaron para inocular un nuevo cultivo de 50 ml (LB con antibióticos -excepto Strp- o DMEM más LB 1%). El volumen del inóculo se calculó como: $V(\mu l) = 600 / (DO_{600} \text{ del precultivo})$.

En diferentes etapas de crecimiento, se colectaron entre 0.5 y 2 ml de cada cultivo y las pastillas celulares se recuperaron por centrifugación (13000 rpm por 2 min). Las pastillas se lavaron con 1 ml de TDTT (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, DTT 3 μM) y, finalmente, se resuspendieron en en 0.5 a 1 ml de TDTT y se obtuvieron los extractos proteicos crudos sonicando por 3 min con pulsos de 10 seg (separados por intervalos de 10 seg). Los extractos se centrifugaron a 13000 rpm por 15 min y se recuperó el sobrenadante.

La concentración de las proteínas en el extracto se determinó con el estuche comercial BCA (Pierce) y la actividad de CAT mediante una cinética de actividad enzimática con acetil-CoA, cloranfenicol y DNTB -Research Organics-) en un lector de microplacas computarizado tipo Ceres (Biotek) con el programa KC3. La actividad específica de CAT se determinó dividiendo la actividad obtenida entre la concentración de proteínas de cada extracto.

V.6 Expresión y purificación de Ler

La expresión y purificación de Ler-His6-Myc se realizó siguiendo el protocolo de trabajos previos (Barba *et al.* 2005). En resumen, la cepa de *E. coli* BL21/pLys21 transformada con el plásmido pT6Ler, que expresa a Ler-His6-Myc, se cultivo hasta alcanzar la fase logarítmica media en 200 ml de LB a 37°C. En este punto se añadió L-arabinosa al 0.1% al cultivo y se continuó la incubación del cultivo por 4h más en las mismas condiciones. Tras este tiempo las células se cosecharon por centrifugación a 4°C, se resuspendieron en 5 ml de buffer de urea a pH 8 (urea 8M, NaH₂PO₄ 20 mM, y Tris-HCl 2M) y se lisaron por sonicación. La suspensión resultante se centrifugó a 4°C y el sobrenadante se vació en una columna previamente cargada con 2 ml de resina de níquel. Ler-His6-Myc se eluyó usando un gradiente de pH (pH 8.0 a 4.5) del buffer de urea.

Las fracciones de la elución se analizaron por SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) para identificar a las que contenían a Ler-His6-Myc. Las fracciones así seleccionadas se cargaron en un casete de diálisis Slyde-A-Lyzer 10K (Pierce) y se dializaron gradualmente a 4°C en un buffer con Tris-HCl 50 mM (pH 7.5), MgCl₂ 10 mM, Glicerol 20%, NaCl 0.5 M, Tritón X-100 0.1% y diferentes concentraciones de urea (4, 1 y 0.2 M), que se cambió cada 3h. El último paso de diálisis se llevó a cabo en un buffer con Tris-HCl (pH 7.5) 50 mM (pH 7.5), MgCl₂ 10 mM, Glicerol 20%, NaCl 240 mM, Tritón X-100 0.1% y EDTA 3mM. La proteína purificada se guardó en alícuotas a -70°C y su concentración se determinó mediante el método de Bradford.

V.7 Ensayos de cambio de movilidad electroforética

Los ensayos de cambio de movilidad electroforética o EMSA (*Electrophoretic mobility shift assays*) se realizaron con base en el protocolo de Rojas-Lopez, *et al* (2011): Se usaron alrededor de 40 ng de cada uno de los fragmentos de interés (obtenidos con reacciones de PCR). Los fragmentos de DNA se mezclaron con concentraciones crecientes de Ler-His6-

Myc en un buffer con HEPES 40 mM, MgCl₂ 8 mM, KCl 50 mM, DTT 1mM, Nonidet P40 0.5% y BSA a 10 µg/ml. Las mezclas de reacción se incubaron por 30 min a 4°C y después se separaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 5%. Las bandas de DNA se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con un transiluminador UV.

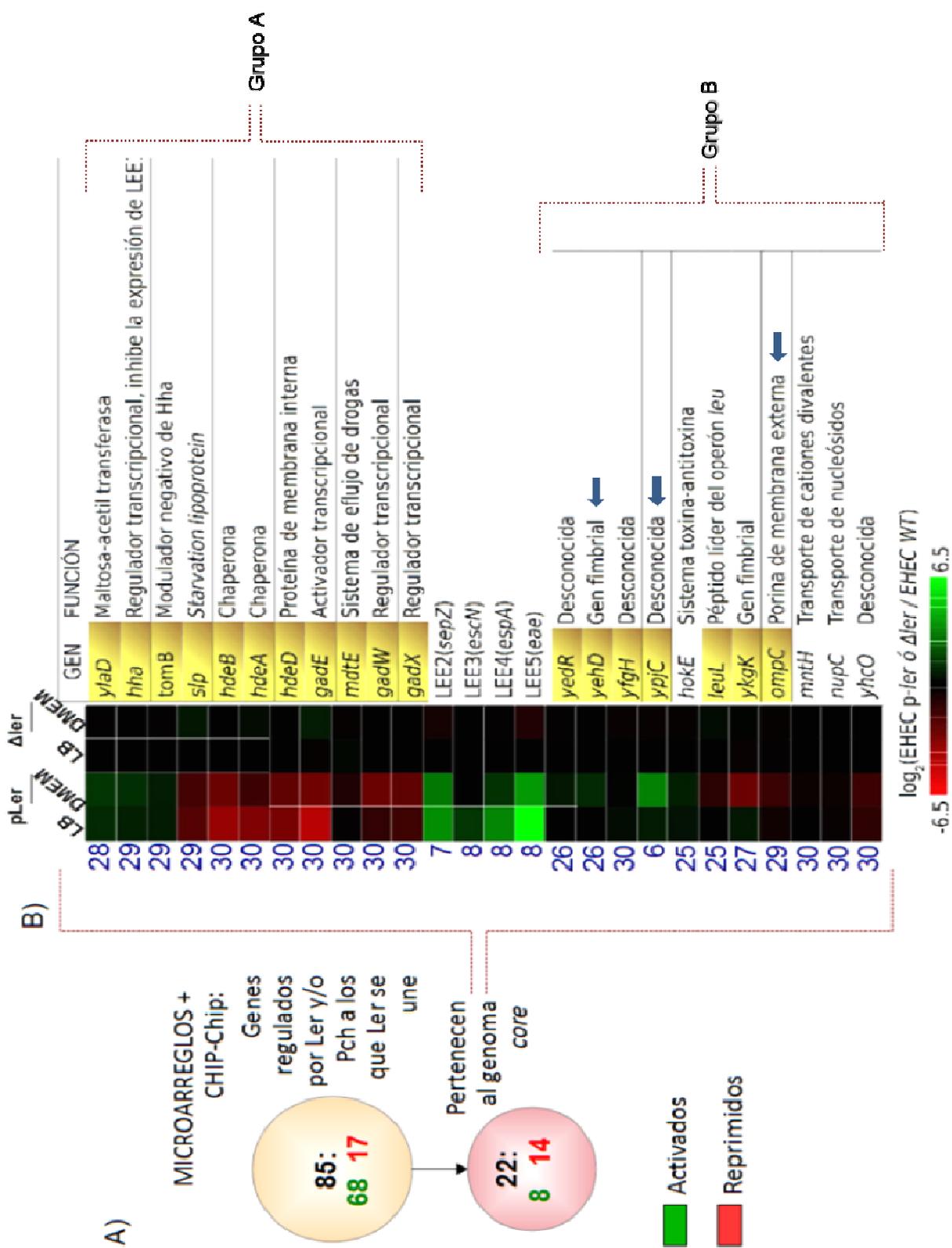
VI. RESULTADOS

VI.1 Selección de los posibles blancos de Ler

En un estudio en EHEC O157:H7 cepa Sakai, Abe *et al* (2008) usaron microarreglos y Chlp-chip para identificar a los genes cromosomales regulados por Ler y Pch. En sus microarreglos los autores compararon a: EHEC que porta a un plásmido que sobreexpresa a Ler o Pch con EHEC con un plásmido control; mutantes en Ler o Pch con una cepa silvestre; una mutante en *ler* que sobreexpresa contra una que no sobreexpresa a Pch y la triple mutante en *pchA-pchB-pchC* que sobreexpresa Ler con la triple mutante que no la sobreexpresa. En el análisis conjunto de estos experimentos se encontraron 172 genes de EHEC que mostraban patrones de expresión parecidos a los del LEE (195 genes) o aparentemente opuestos (147 genes). Los autores reportaron que Ler se unía a 85 de los 172 genes mencionados (a la región codificante o cerca de la misma) (Figura 3A). Para fines de este estudio se consideró que estos 85 genes son el posible regulón de Ler (si bien Pch también se une a la mayoría de ellos).

Según el estudio de Abe *et al* (2008), hay 22 genes del regulón de Ler que también se encuentran en *E. coli* K-12. Con el fin de averiguar si estos genes formaban parte del genoma *core* de *E. coli* se buscaron homólogos en 30 cepas de esta especie, incluyendo aislados de diversos patotipos y comensales. Como se muestra en la Figura 3B, la mayoría

Figura 3 (Siguiendo página). Estudio y selección de los genes a estudiar a partir de los datos de Abe *et al* (2008). **A)** 85 genes de EHEC O157:H7 Sakai conforman el posible regulón de Ler. De éstos 22 tienen ortólogos en *E. coli* K-12. **B)** Cambio en los niveles de transcripción de los 22 genes mencionados en EHEC que sobreexpresa a Ler (pLer) o en la mutante en *ler* (Δ *ler*) con respecto a la cepa silvestre (representados como *heat map*). Se indica la función para cada gen y el número de cepas de *E. coli* (de un total de 30) en las que se encontraron sus ortólogos (números azules, ver métodos). Los genes en amarillo son blancos de H-NS (Oshima, T. *et al.*, 2006). Se señalan los Grupos A y B y los genes seleccionados como objeto de este estudio. Los datos para varios genes del LEE aparecen como referencia. Las funciones de los genes se tomaron de las bases de datos KEGG y EcoCyc y de la literatura (ver texto).



de los genes conservados en *E. coli* K-12 también se encuentran en todas (o gran parte) de las cepas analizadas. Los 22 genes cuya pertenencia al genoma *core* se estudió se dividieron en dos grupos de acuerdo a su función (Figura 3B):

El Grupo A comprende 11 genes con funciones relativamente bien conocidas y que, en su mayoría, se han relacionado previamente con la patogénesis de EHEC. Estos genes están agrupados en dos *loci*, uno de los cuales es un operón formado por los genes *hha*, *ylaD* y *tomB*. El gen *hha* codifica para un represor de la expresión de Ler (ver sección I.3.c). El segundo *locus* agrupa los genes *slp*, *hdeB*, *hdeA*, *hdeD*, *gadE*, *mdtE*, *gadX* y *gadW*, relacionados con la resistencia de *E. coli* al estrés por ácidos (ver sección II).

Los 11 genes restantes están distribuidos en 10 *loci* y forman el Grupo B. Entre ellos figuran genes relacionados con el transporte de solutos a través de la membrana (*ompC*, *mntH* y *nupC*) (Anjem *et al.* 2009; Pratt *et al.* 1996) (Craig *et al.* 1994); *leuL*, que codifica al péptido líder del operón de leucina, necesario para la regulación por atenuación transcripcional del operón (Somers *et al.* 1973; Wessler y Calvo 1981), y genes cuya función se ha estudiado poco (los genes fimbriales *yfgH* y *ykgK* y la toxina *hokE*) o se desconoce. Este trabajo se enfoca en la regulación por Ler de los genes *ompC*, *yehD* y *ypjC* del grupo B, que se seleccionaron tomando en cuenta varios criterios (Figura 3B):

a) Función asociada al gen: La expresión de fimbrias, que confieren a las bacterias la capacidad para adherirse entre ellas o a las células del hospedero es importante para la patogénesis de EHEC y EPEC (Saldaña *et al.* 2009; Torres *et al.* 2008; Xicohtencatl-Cortes *et al.* 2007). Esto motivó el estudio del gen *yehD* en el presente trabajo.

b) Cambio transcripcional ante la sobreexpresión o delección de *ler*: El cambio relativo del nivel de transcripción se calculó a partir de los datos depositados por Abe *et al* en la base de datos GEO (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). De acuerdo a este cálculo, el gen de función desconocida *ypjC* se activa fuertemente al sobreexpresar Ler en DMEM (en comparación con otros genes del grupo B). La activación de *ypjC* se asemeja a la de *sepZ* (LEE2) y *eae* (LEE5) en la misma condición.

c) Regulación por H-NS: Ler evita la represión por H-NS de los operones del LEE al competir por sus sitios de unión. Por tal motivo nos interesamos en aquellos genes cuya represión por H-NS se ha observado previamente (Figura 3B, genes resaltados en amarillo). La represión de *yehD*, *ypjC* y *ompC* por H-NS se observó al estudiar el regulón de dicha proteína usando microarreglos y ChIP-chip (Oshima *et al.* 2006).

d) Conservación de la posible región reguladora y contexto genético: Para explorar la posibilidad de que los genes *ompC*, *yehD* y *ypjC* hayan sufrido cambios que hagan posible su regulación por Ler, se alinearon las posibles regiones reguladoras de dichos genes de EHEC O157:H7 Sakai y *E. coli* K-12 MG1655. En los tres casos se observan diferencias en la posible región reguladora y en el caso de *yehD* y *ypjC* la cantidad de posiciones diferentes es mayor a 10% (Figura 4A-C). Por otro lado, la estructura del *locus ypjC* es diferente entre *E. coli* K-12 y EHEC O157:H7: en *E. coli* K-12 comprende dos genes, mismos que están fusionados en EHEC O157:H7. Esta situación se repite con los *loci yqaDC* y *ygaRQ* que están río arriba de *ypjC* (Figura 4C). Cabe mencionar que según su conservación en diferentes cepas de *E. coli* (Figura 3B), *ypjC* no pertenece al genoma *core* de la especie. Empero, sus homólogos están distribuidos en cepas comensales y patógenas a diferencia de los genes del LEE que son exclusivos de cepas patógenas, por lo que se decidió mantenerlo como parte de este estudio, considerando también que fue uno de los genes cuya regulación por Ler fue más clara en el análisis realizado por Abe *et al* (2008).

VI.2 Efecto de Ler en la expresión de los genes *ompC*, *yehD* y *ypjC*

Como primer paso para abordar la regulación por Ler de los genes seleccionados, se construyeron fusiones transcripcionales de sus posibles regiones reguladoras con el gen reportero *cat* (cloranfenicol acetil transferasa). Las fusiones *ompC-cat*, *yehD-cat* y *ypjC-cat* están contenidas en plásmidos multicopia derivados de pKK232-8 (Tabla 1). Las regiones clonadas se describen en la Tabla 2 y son las mismas cuya longitud y conservación se detallan en la Figura 4. La fusión *sepZ-cat* (Figura 5), correspondiente al primer gen del operón LEE2 (Bustamante *et al.* 2001), se usó como control positivo.

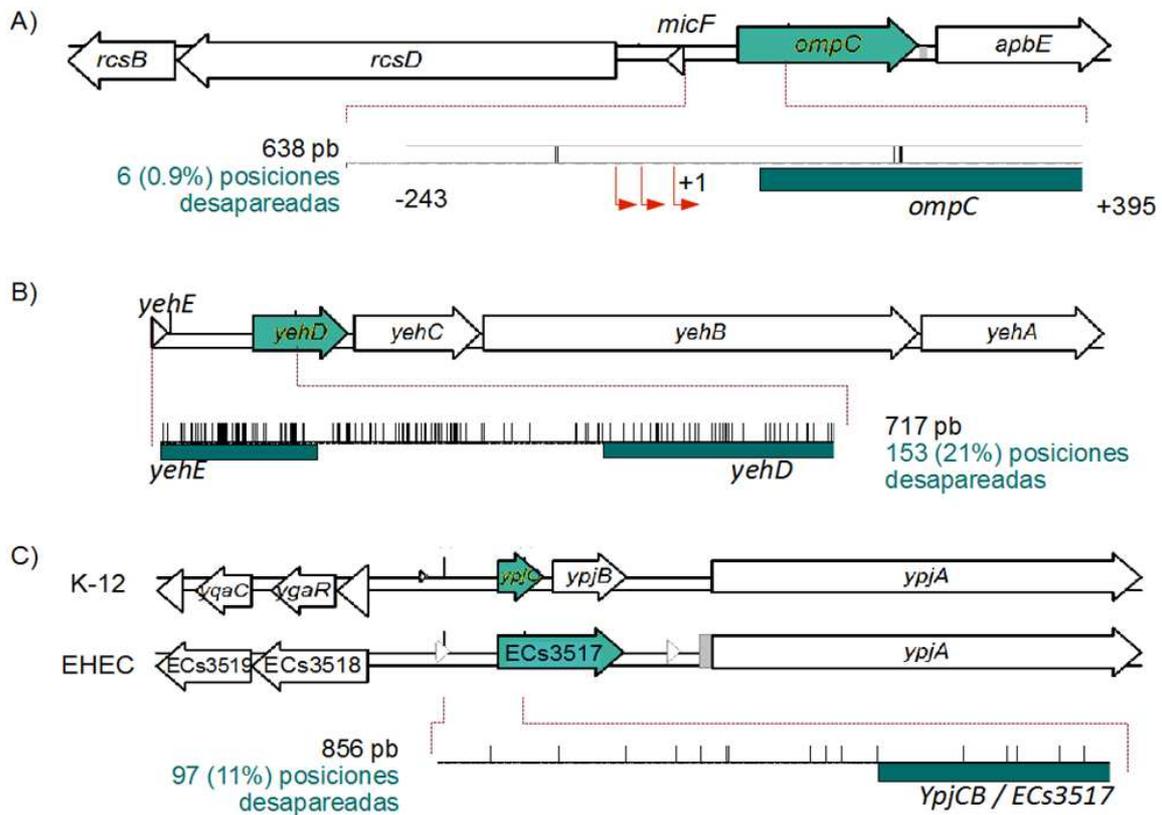


Figura 4. Contextos genéticos de los genes a estudiar. Se detalla la región del cromosoma de EHEC O157:H7 Sakai que rodea a los genes *ompC* (A), *yehD* (B) y *ypjC* (C). Además se hace un acercamiento a la posible región reguladora de dichos genes, mostrando los sitios que son diferentes entre *E. coli* K-12 y EHEC e indicando la cantidad y porcentaje de posiciones desapareadas en la región (según un alineamiento de ClustalW2). Para *ompC* se indican los 3 sitios de inicio de la transcripción en rojo. En el caso de *ypjC* se comparan los contextos entre ambas cepas de *E. coli*. Los gráficos se generaron usando las herramientas pDRAW32 1.1.113 y CLC Sequence Viewer 6.6.2

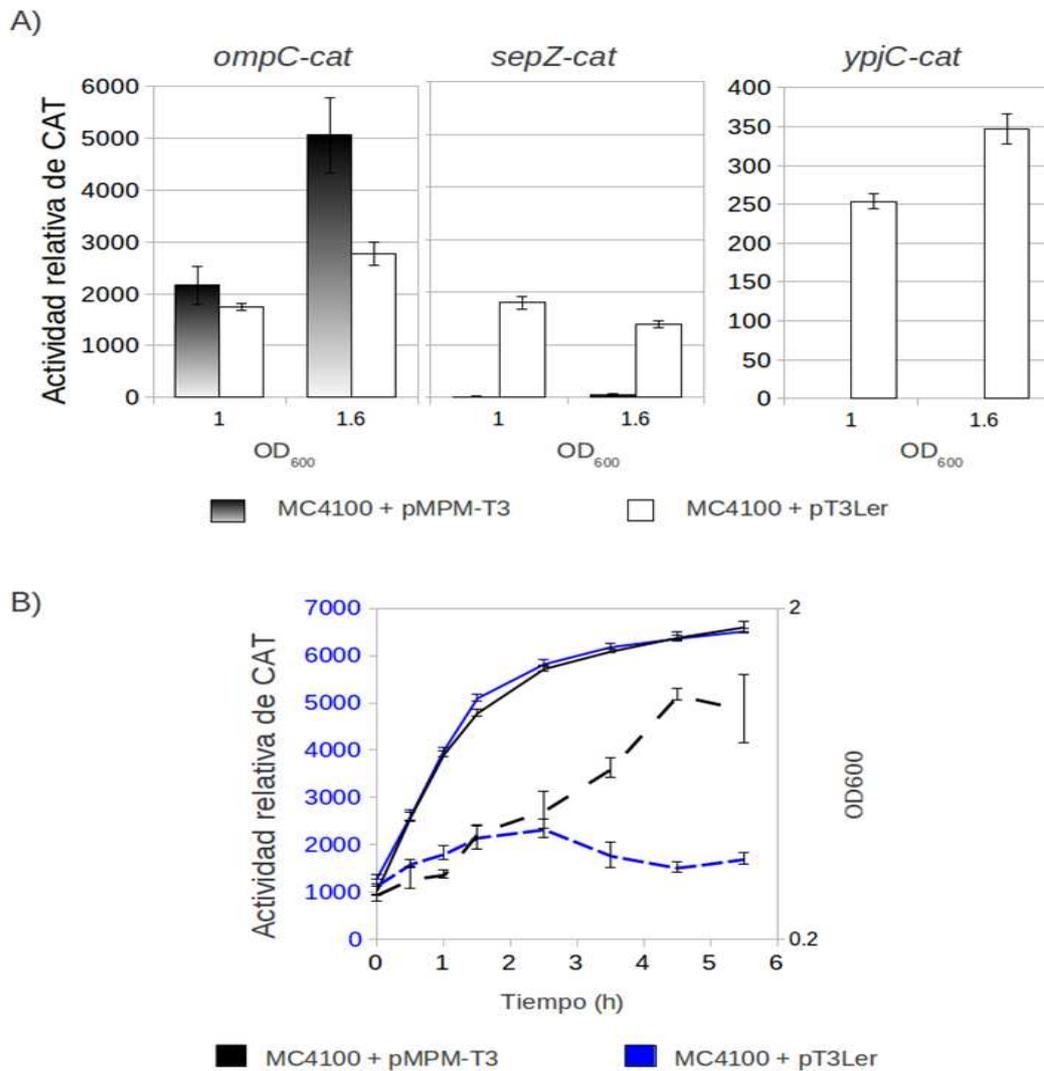


Figura 5. Actividad de las fusiones transcripcionales *ompC-cat*, *ypjC-cat* y *sepZ-cat* en *E. coli* K-12 MC4100 en presencia o ausencia de Ler. La cepa MC4100 fue transformada con pT3Ler (que sobre expresa a Ler) o con el vector vacío pMPPM-T3 y con cada una de las fusiones transcripcionales. La actividad de CAT se midió en extractos proteicos de cultivos obtenidos en diferentes fases de crecimiento en medio LB a 37°C con agitación. **A)** Actividad de las fusiones transcripcionales *ompC-cat*, *ypjC-cat* y *sepZ-cat* en el inicio de la fase estacionaria (OD₆₀₀=1) y en fase estacionaria tardía (OD₆₀₀=1.6). **B)** Actividad de la fusión *ompC-cat* a lo largo de 5.5 h de cultivo (líneas discontinuas) y curvas de crecimiento de los cultivos correspondientes a ambas cepas (líneas continuas, el eje “y” secundario está en escala logarítmica).

VI.2.a La sobre expresión de Ler en *E. coli* K-12 activa a *ypjC* y afecta negativamente la expresión de *ompC*

La actividad de las fusiones transcripcionales se determinó en *E. coli* K12 MC4100 en presencia del plásmido pMPM-T3 o de su derivado pT3Ler, que sobreexpresa a Ler (Figura 5).

La fusión *ompC-cat* es activa en MC4100 y, aunque la presencia de pT3Ler no afecta su expresión en la fase exponencial ni en el inicio de la fase estacionaria, la reprime significativamente en etapas posteriores. La represión de *ompC-cat* por Ler es más clara cuando la $DO_{600} \sim 1.6$ (Figura 5A y B). Este efecto contrasta con el observado con *sepZ-cat* que, como se esperaba, que es fuertemente activada por Ler (Bustamante *et al.* 2001). En cambio, la fusión *ypjC-cat* es inactiva en el fondo MC4100, pero se activa al sobreexpresar Ler. El nivel de expresión de *ypjC-cat* en presencia de Ler es bajo comparado con el de *ompC-cat* o *sepZ-cat* (ver ejes “y” en la Figura 5A). Por su parte, la fusión *yehD-cat* no mostró actividad ni en presencia ni en ausencia de Ler.

VI.2.b La actividad de *ompC* es similar en EPEC y EPEC Δler y *ypjC* es inactivo en EPEC

Con el propósito de determinar la influencia de Ler sobre la expresión de estas fusiones en un contexto genético donde naturalmente se produce Ler, la expresión de las fusiones transcripcionales se analizó en EPEC y EPEC Δler cultivadas en LB o DMEM (Figura 6). Bajo estas condiciones se observó que la expresión de *ompC-cat* es similar en ambas cepas (independientemente de la etapa de crecimiento y el medio de cultivo) y que la presencia del gen *ler* en EPEC no es suficiente para activar a *ypjC-cat*. La fusión *yehD-cat* también fue inactiva en ambos fondos, mientras que el control se comportó normalmente, siendo activado por Ler a bajos niveles en LB y fuertemente en DMEM (Bustamante *et al.* 2001).

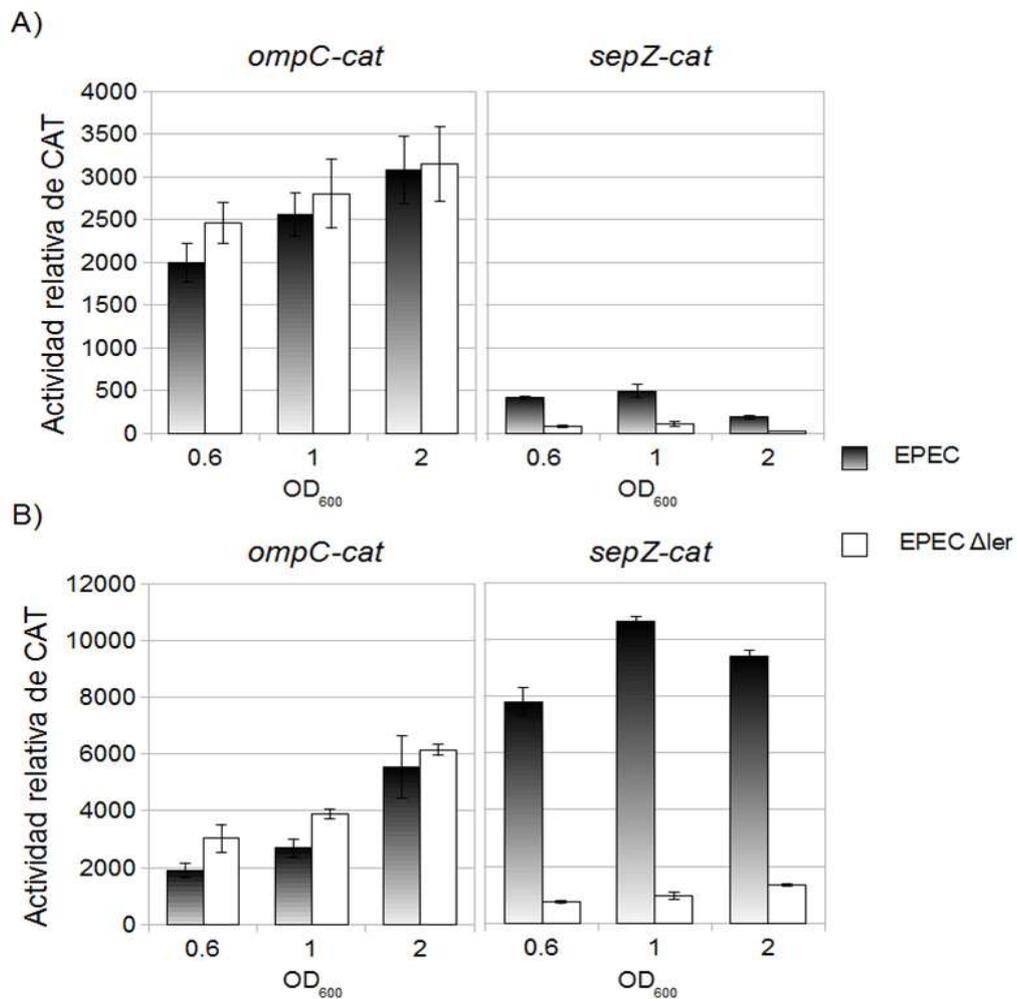


Figura 6. Actividad de las fusiones transcripcionales *ompC-cat* y *sepZ-cat* en EPEC y EPEC Δ ler. La actividad de CAT se midió en extractos proteicos de cultivos crecidos en LB (A) o DMEM (B) a 37°C con agitación. Las muestras se tomaron durante la fase exponencial ($OD_{600}=0.6$), en el inicio de la fase estacionaria ($OD_{600}=1.0$) o en fase estacionaria tardía ($OD_{600}=1.6$). Las barras representan el promedio y desviación estándar de 3 experimentos independientes.

VI.3 Ler interacciona específicamente con las regiones reguladoras de *ompC*, *yehD* y *ypjC*

Con el fin de determinar si el efecto de Ler en la actividad de *ompC-cat* y *ypjC-cat*, confirmado en *E. coli* MC4100 sobreexpresando Ler, se debía a la acción directa de la proteína sobre las regiones reguladoras de estos genes, se realizaron ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA) usando a Ler-His6-Myc purificada y productos de PCR idénticos a las regiones contenidas en las fusiones transcripcionales *yehD-cat*, *ompC-cat*, y *ypjC-cat*. También se usó a la región reguladora de *sepZ*, que contiene un sitio de unión de Ler (Bustamante *et al.* 2001), como control positivo. Además, en todos los ensayos se añadió como control negativo un fragmento de DNA correspondiente a la región codificante del gen *ler* de EPEC (390 pb) (Figura 7). Estos experimentos demostraron que Ler se une a los fragmentos de DNA correspondientes a las regiones reguladoras de *ompC*, *ypjC* y *yehD*. La unión de Ler a dichos fragmentos sucedió a una concentración de proteína similar o menor a la que se requirió para retardar al control positivo, así pues, la afinidad de Ler por las regiones reguladoras de *ompC*, *yehD* y *ypjC* es parecida o superior a su afinidad por su sitio de unión río arriba de LEE2. Finalmente, la unión de Ler a los genes estudiados no se debe a que Ler se una inespecíficamente a la región reguladora de cualquier gen cromosomal, pues Ler no retarda a la región río arriba del operón *malEFG*.

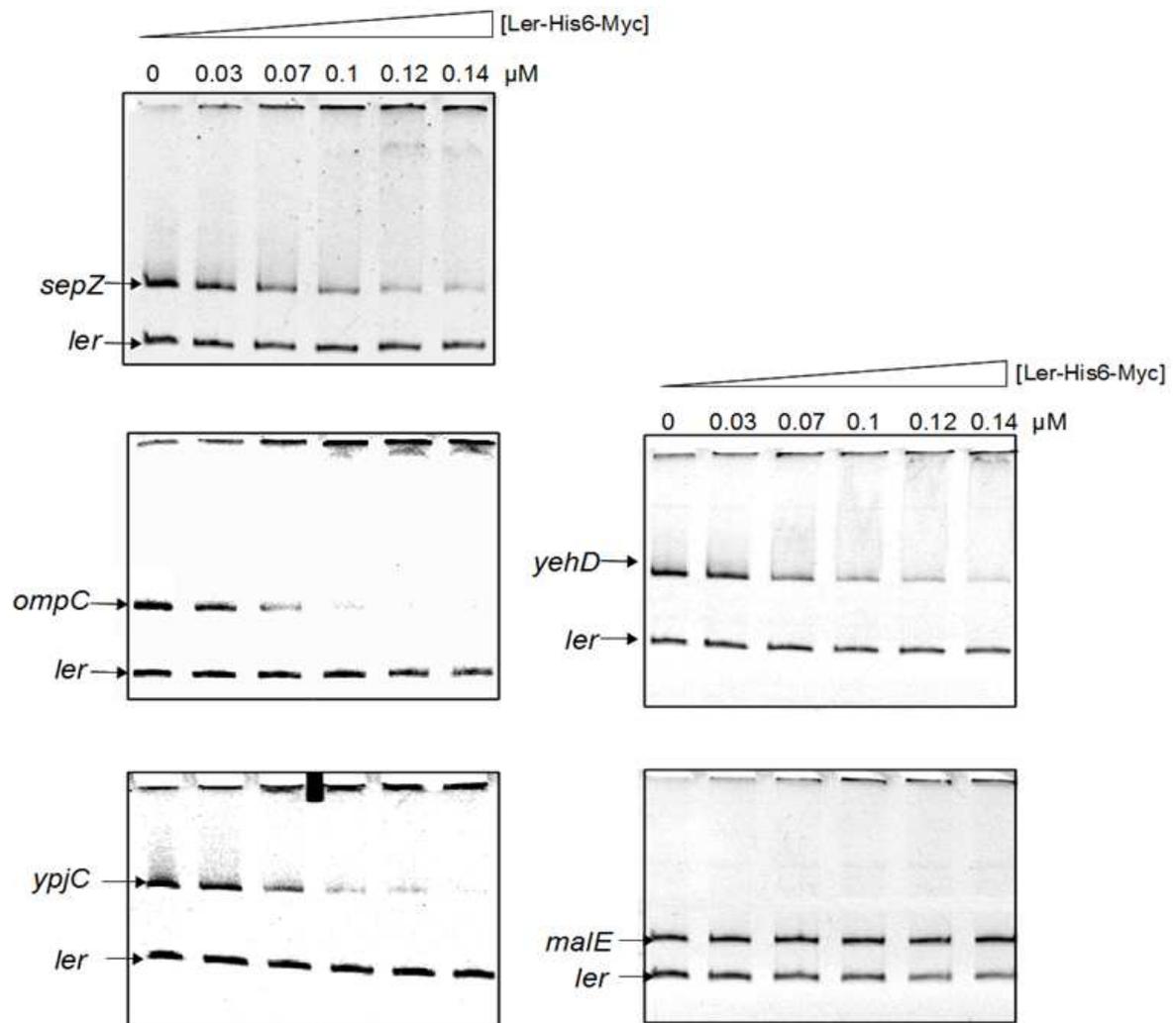


Figura 7. Interacción de Ler con las regiones reguladoras de diferentes genes. Concentraciones crecientes de Ler fueron mezcladas con una concentración única de cada fragmento de DNA obtenido por PCR. En cada caso se incluyó en la misma mezcla una cantidad similar del control negativo. Los fragmentos y los complejos generados fueron separados por electroforesis en un gel de acrilamida al 5% y visualizados por tinción con bromuro de etidio. Para cada experimento se indica el gen al que corresponde cada fragmento. El fragmento *ler* corresponde a la región codificante de dicho gen y funge como control negativo. Las concentraciones de Ler-His6-Myc utilizadas son las mismas en todos los experimentos.

VII. DISCUSIÓN

La virulencia de EPEC y EHEC se relaciona con la presencia de diversos *loci* adquiridos por transferencia genética horizontal (TGH), entre los que el LEE juega un papel central. En ambos patógenos la proteína Ler, codificada en el LEE, funge como regulador global de la patogénesis, activando a los genes del LEE y a otros genes que codifican para factores de virulencia. A su vez, muchos FTs, codificados en el genoma *core* de *E. coli* o en los genes de patogenicidad regulan la expresión de Ler. Así pues, en la red transcripcional que modula la patogénesis de EHEC y EPEC existen conexiones que van del genoma *core* y de elementos móviles (a través de diversos reguladores) hacia *ler* y conexiones desde *ler* (a través de Ler) hacia varios elementos móviles. No obstante, la existencia de conexiones desde *ler* hacia el genoma *core* de *E. coli*, que completarían esta red, se ha estudiado poco. Esta incógnita se abordó en el presente trabajo tomando como base el estudio del regulón de Ler y Pch realizado por Abe *et al* (2008) en EHEC O157:H7 Sakai.

Según los ensayos de microarreglos y Chlp-chip de Abe *et al* (2008), hay 22 genes compartidos entre EHEC y *E. coli* K-12 a los que Ler se une directamente y cuya expresión está regulada por Pch y/o Ler. Entre ellos se seleccionaron a los genes *yehD*, *ompC* y *ypjC* como objetos de este estudio.

El gen *ompC*, cuya pertenencia al genoma *core* de *E. coli* se constató, codifica una porina de membrana externa y según Abe *et al* (2008) es un gen inhibido por Ler. En *E. coli* K-12 OmpC es una porina abundante que controla el paso de iones y otros solutos hidrofílicos pequeños a través de la membrana externa. La cantidad de OmpC en la célula varía en respuesta a diferentes factores ambientales, incluyendo la temperatura, el pH, la osmolaridad, la limitación de nutrientes y la presencia de antibióticos (Pratt *et al.* 1996). Entre los FTs que regulan a *ompC* figura H-NS, que se une directamente a la región reguladora de este gen (Oshima *et al.* 2006) inhibiendo su expresión. La reducción de los niveles de expresión de *ompC* por Ler podría contribuir en la virulencia si la presencia abundante de OmpC en la membrana representara un impedimento para la adhesión a las

células del hospedero o para el ensamblaje del SSTT o si alguna molécula que ingresa a través de esta porina afectara la expresión de los factores de virulencia. Estas y otras posibilidades que tendrían que analizarse en caso de comprobarse la importancia de OmpC para la virulencia.

Por su parte, el gen *ypjC*, cuya función se desconoce por completo, resulta particularmente interesante por la fuerte respuesta positiva que mostró ante la sobre expresión de Ler en DMEM (similar a la de algunos genes del LEE) en el estudio de Abe *et al* (2008). Por otro lado, H-NS se une a la secuencia codificante y a la región río arriba de *ypjC* (Oshima *et al.* 2006). Estas observaciones motivaron la inclusión de *ypjC* en el presente estudio a pesar de que el gen fue identificado en sólo 6 cepas de *E. coli* (patógenas y comensales).

Al estudiar la regulación por Ler de *ompC* y *ypjC* con fusiones transcripcionales, se observó que la sobre expresión de Ler en *E. coli* K-12 inhibía a la fusión *ompC-cat* en la fase estacionaria tardía y activaba a *ypjC-cat* (inactivo en ausencia de Ler). Además se constató la unión de Ler a la región reguladora de ambos genes, lo que indica que Ler afecta su transcripción en forma directa y no actúa a través de otro regulador. A excepción de la activación de *ypjC* en LB, que sólo se observó en este estudio, estas observaciones confirman los resultados de Abe *et al* (2008) para el caso de estos genes (Figura 3B). El efecto de Ler en *ompC* es de particular interés en vista de la controversia actual en cuanto a la acción de Ler como represor. Al igual que con *ompC*, la sobre expresión de Ler reprime a LEE1 bajo ciertas condiciones, aunque debe considerarse la posibilidad de que esto no ocurra en presencia de una dosis menor de Ler (Berdichevsky *et al.* 2005; J. Mellies *et al.* 2007), como se observó para *ompC-cat* en este estudio en la cepa silvestre y mutante de EPEC. Cabe añadir que según datos preliminares, el gen *ypjC* no sólo se activa al sobreexpresar a Ler, sino también en *E. coli* K-12 mutante en *hns* (ver Apéndice 1). Esto sugiere la posibilidad de que Ler actúe evitando la represión de *ypjC* por H-NS, al igual que sucede con los promotores del LEE.

Para continuar se investigó el efecto de Ler, expresada desde el cromosoma de EPEC E2348/69, en la expresión de los genes seleccionados. Aunque cabía la posibilidad de usar a

EHEC y su mutante en *ler* como modelos de estudio, la mutación de *ler* en EHEC (mediante el método de Datsenko y Wanner) no tiene efecto sobre la expresión de los genes del LEE (Abe *et al.* 2008). Se desconoce la causa de este fenómeno, que también se ha observado en ensayos realizados en nuestro laboratorio y contrasta con la observación de que Ler es necesaria en EHEC para la expresión del LEE, la secreción a través del SSTT y la formación de lesiones AE (Elliott *et al.* 2000; Friedberg *et al.* 1999). Con esto en mente, se emplearon a las cepas de EPEC E2348/69 silvestre y su mutante en *ler*, con las que se observan efectos claros de Ler en la expresión del LEE (Bustamante *et al.* 2001).

La expresión de Ler a partir del gen *ler* de EPEC es insuficiente para reprimir a la fusión *ompC-cat* o activar a *ypjC-cat* en las condiciones utilizadas en este estudio. Esto sugiere que la dosis de Ler necesaria para cambiar la expresión de *ompC* o *ypjC* es superior a la que existe en un contexto biológicamente relevante. Sin embargo, debe considerarse la posibilidad de que el fondo genético (EPEC en lugar de EHEC O157:H7) o las condiciones empleadas no sean las adecuadas para observar el efecto de Ler sobre *ompC-cat* o *ypjC-cat*. En el caso de *ompC*, alguna de las muchas condiciones que modifican su expresión (ej. un cambio de osmolaridad) podría hacer evidente su regulación por Ler. También es posible que la dosis endógena de Ler sí regule a las copias cromosomales de *ompC* y *ypjC* pero se vuelva insuficiente cuando las regiones reguladoras se encuentran en un alto número de copias, como en el caso de las fusiones transcripcionales. Por otro lado, otros reguladores presentes en EPEC pero no en *E. coli* K-12 podrían actuar sobre *ompC* y *ypjC* en EPEC impidiendo o enmascarando la regulación por Ler. De hecho, Pch también se une a los promotores de *ompC*, *yehD* y *ypjC* según Abe *et al.* (2008), y en EPEC la proteína PerC es funcionalmente equivalente a Pch (pues PerC activa al LEE1 de EHEC) (Porter *et al.* 2005); sin embargo, a la fecha desconocemos cuál es el papel de PerC en la regulación de genes del core.

En cuanto a *yehD*, el gen se encontró en la mayoría de las cepas de *E. coli* analizadas (Figura 1) y pertenece al operón *yehDCBA*, que probablemente codifica un factor de adherencia tipo fimbria (Low *et al.* 2006). Una fimbria es un filamento proteico de longitud y grosor variable que facilita la adherencia de la bacteria a diferentes tipos de superficie. A diferencia de las cepas del patotipo EPEC, que colonizan el intestino delgado, EHEC

O157:H7 se adhiere a la parte distal del colon. Se ha sugerido que este tropismo se relaciona con la expresión de factores de adherencia específicos por parte de EHEC O157:H7 (J. Mellies *et al.* 2007). En EHEC O157:H7 se han identificado 16 *clusters* de genes que codifican factores de adherencia tipo fimbria (Low *et al.* 2006). De ellos, los operones *ppdD*, *MAT* y *csgA*, conservados en *E. coli* K-12 y EPEC, codifican factores relevantes para la adherencia de EPEC y EHEC O157:H7 a células epiteliales (Saldaña *et al.* 2009; Xicohtencatl-Cortes *et al.* 2007).

Por otro lado, el operón fimbrial *lpf1*, que se encuentra en EHEC y no en *E. coli* K-12 o EPEC (Low *et al.* 2006) y su producto (la fimbria LPF1) son importantes para la adherencia de EHEC en células epiteliales (Torres *et al.* 2008). Más aún, LPF1 contribuye en la adherencia específica de EHEC en el colon, ya que en ausencia de *lpf1* EHEC O157:H7 se une también al intestino delgado (Fitzhenry *et al.* 2006). Al igual que con los operones del LEE, Ler activa a *lpf1* y H-NS lo inhibe (Rojas-Lopez *et al.* 2011; Torres *et al.* 2008). Según Abe *et al.* (2008) Ler se une a *yehD* y la sobre expresión de Ler en DMEM correlaciona con el aumento en la señal transcripcional del mismo. Además, en *E. coli* K-12 H-NS se une al operón *yehDCBA*, cuya expresión aumenta en ausencia de H-NS (Oshima *et al.* 2006). Esto último apoya un modelo de regulación como el descrito para *lpf1*. El operón *yehDCBA* es uno de los pocos operones fimbriales de EHEC cuya expresión se ha observado (Low *et al.* 2006).

Aunque Ler se une directamente a la región reguladora de *yehD*, la fusión *yehD-cat* fue inactiva en todas las condiciones estudiadas. Según nuestros datos preliminares, la ausencia de H-NS es suficiente para observar la expresión de *yehD-cat* en MC4100, pero es posible que se requiera de algún factor diferente de Ler y exclusivo de EHEC para evitar el efecto de H-NS sobre *yehD* y observar la expresión del gen que se ha reportado previamente (Low *et al.* 2006).

Datos preliminares, obtenidos al fusionar las regiones reguladoras de los genes *yehD*, *ypjC* y *ompC* de *E. coli* K-12 a *cat* muestran comportamientos similares a los observados con las fusiones correspondientes a EHEC O157:H7. Aquí también, la sobre expresión de Ler reprime a la fusión de *ompC* y activa a la de *ypjC*, mientras que la fusión de *yehD* es inactiva

en presencia o ausencia de Ler. La confirmación de estos datos indicaría que los efectos observados con las fusiones de EHEC O157:H7 no se deben a adaptaciones de las regiones reguladoras de *ompC* o *ypjC* ocurridas en este organismo. Es muy posible que, al igual que su homólogo H-NS, Ler no reconozca una secuencia de DNA específica, sino que su unión dependa del contenido de A+T de sus blancos o de la curvatura del DNA (Navarre *et al.* 2007). En tal caso, la sobre expresión de Ler podría ocasionar su unión inespecífica a varios *loci* genoma *core* de *E. coli* y, con ello, su activación o represión de los genes correspondientes. Si esto también sucede cuando Ler se encuentra en concentraciones fisiológicas, cabe suponer que sus efectos sobre los genes del genoma *core* serían principalmente de carácter neutral (no promueven ni disminuyen la viabilidad) o deletéreo (y tienden a eliminarse), pero no se puede descartar que alguno de estos eventos contribuya en el establecimiento de la infección.

En resumen, Ler tiene el potencial para modificar en forma directa la expresión de genes del genoma *core* de *E. coli*, no obstante, en el caso de los genes *ompC* y *ypjC*, este evento sólo se observa cuando Ler se expresa artificialmente a partir de un plásmido, lo cual confirma las observaciones realizadas por Abe *et al* (2008), para el caso de estos genes; sin embargo, dicha regulación no pudo ser comprobada en condiciones que se consideran más cercanas al contexto fisiológico de EHEC O157:H7. Mas aún, es posible que el efecto de Ler sobre *ompC* y *ypjC* no se deba a polimorfismos presentes en las secuencias de EHEC, sino que también ocurra con genes de una cepa comensal (*E. coli* K-12). Esto último descartaría que la regulación de *ompC* y *ypjC* por Ler sea un carácter que apareció y se seleccionó en EHEC O157:H7 aunque no comprueba que carezca de importancia para la virulencia.

Los resultados de este estudio son un primer abordaje para la siguiente pregunta: ¿Qué blancos de Ler en el genoma *core* son importantes para la virulencia? ¿Cómo diferenciarlos de aquellos genes, probablemente más abundantes, cuya regulación por Ler no tiene impacto en la patogenicidad de *E. coli*? La respuesta a estas preguntas a nivel del genoma *core* completo de *E. coli* requiere de un estudio del regulón de Ler que tome en cuenta varios factores:

Para empezar, puesto que la sobreexpresión de Ler podría tener efectos globales

distintos a la de su dosis fisiológica, es importante contar con datos obtenidos con una mutante en *ler*. En el estudio de Abe *et al* (2008) la obtención de dichos datos está oscurecida por el comportamiento inesperado de los genes del LEE en EHEC Δ *ler*. Una solución a esta dificultad sería el uso de EPEC y su mutante en *ler*, cuyo comportamiento se comprende a fondo, como modelos.

Por otra parte, es necesario tomar en cuenta los efectos de otros reguladores de virulencia que pudiesen interferir con la identificación del regulón de Ler. Entre estos reguladores destacan PchA-C de EHEC (o su homólogo PerC de EPEC), que según el estudio de Abe *et al* (2008) se une a la mayoría de los genes que Ler regula, dificultando la identificación del regulón de Ler. Por otro lado, el efecto de GrlA, cuya expresión está íntimamente ligada a la de Ler no se tomó en cuenta en el estudio de Abe *et al* (2008). En este aspecto, el modelo EPEC presenta la ventaja de que sus reguladores GrlA y PerC se han estudiado a fondo y este último puede ser eliminado curando a EPEC del plásmido EAF o eliminando específicamente el gen (en contraste con EHEC en donde existen varios genes *pch* cromosomales) (ver I.3.c).

Finalmente, el estudio de los efectos de Ler en cepas que no portan al LEE o en diferentes variantes de EPEC, planteado como herramienta en este estudio, podría llevarse a nivel global. La comparación de los blancos de Ler en varios linajes y en relación con diversos fenotipos de la especie *E. coli* nos daría luz sobre el valor adaptativo de diferentes eventos de regulación.

En la medida en que se tomen en cuenta los parámetros mencionados será posible entender hasta qué grado la regulación del LEE se ha integrado con la red transcripcional residente y qué cambios en el genoma *core*, si los hay, reforzaron su virulencia. Esta información reflejaría el nivel de adaptación de EHEC o EPEC para la patogénesis y con ello la importancia que ha tenido esta característica para su supervivencia

VIII. PERSPECTIVAS

Confirmar los cambios en la expresión de *ompC*-, *ypjC*- y *yehD-cat*, correspondientes a los genes de *E. coli* K-12, ante la sobre expresión o mutación de *ler*. Así como estudiar su expresión en MC4100 Δhns y la unión de Ler a las regiones reguladoras correspondientes.

Confirmar la expresión de las fusiones *ompC*-, *ypjC*- y *yehD-cat*, correspondientes a los genes de EHEC O157:H7, en MC4100 Δhns .

Analizar el efecto de Ler en la expresión de las fusiones transcripcionales de los genes de interés (tanto los de EHEC O157:H7 como los de *E. coli* K-12) en EHEC O157:H7. Para investigar si la regulación por Ler de estos genes (y la expresión en el caso de *yehD*) sólo es posible en presencia de FTs exclusivos de EHEC O157:H7.

Ampliar el espectro de condiciones a estudiar en EPEC y EPEC Δler con miras a identificar aquellas en las que la dosis fisiológica de Ler modifique la expresión de *ompC* y *ypjC*. En el caso de *ompC* se tomarían en cuenta las condiciones conocidas que alteran su expresión (ej. osmolaridad, pH, presencia de antibióticos).

Determinar el efecto de Ler en la expresión de *ypjC* y *ompC* mediante PCR en tiempo real. Con esto se estudiaría el fenómeno sin intervención de variables propias de las fusiones transcripcionales como la longitud de la región reguladora fusionada al gen reportero o el número de copias del vector que las porta.

Identificar los blancos relevantes de Ler en el genoma *core*. Como ya se mencionó, una nueva búsqueda del regulón de Ler será primordial como primer paso para contestar incógnitas fundamentales sobre el funcionamiento y la evolución de los patógenos que portan al LEE. En contraste con el estudio de Abe *et al* (2008), dicha búsqueda se enfocaría en el regulador Ler de EPEC E2348/69 y tomaría en cuenta los parámetros que se discutieron con

anterioridad para garantizar la relevancia biológica de los datos obtenidos.

Explorar la participación de los genes que son blancos de Ler en el genoma core en la virulencia de los patógenos AE. Para tal fin se construirían mutantes en dichos genes en cepas modelo de EPEC, EHEC y/o *C. rodentium* y se mediría su capacidad para secretar proteínas efectoras y adherirse a células epiteliales en cultivo, así como para colonizar y formar lesiones AE en el intestino ratones (para el caso de *C. rodentium*).

REFERENCIAS

1. Abe, H., Miyahara, A., Oshima, T., Tashiro, K., Ogura, Y., Kuhara, S., Ogasawara, N., Hayashi, T. y Tobe, T. (2008). Global regulation by horizontally transferred regulators establishes the pathogenicity of *Escherichia coli*. *DNA research* **15**, 25–38
2. Anjem, A., Varghese, S. y Imlay, J.A. (2009). Manganese import is a key element of the OxyR response to hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **72**, 844–58
3. Barba, J., Bustamante, V.H., Flores-valdez, M.A., Deng, W., Finlay, B.B. y Puente, J.L. (2005). A Positive Regulatory Loop Controls Expression of the Locus of Enterocyte Effacement-Encoded Regulators Ler and GrlA. *Journal of bacteriology* **187**, 7918–30
4. Berdichevsky, T., Friedberg, D., Nadler, C., Rokney, A., Oppenheim, A. y Rosenshine, I. (2005). Ler is a negative autoregulator of the LEE1 operon in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **187**, 349–57
5. Berg, R.D. (1996). The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in microbiology* **4**, 430–5
6. Blattner, F.R. (1997). The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**, 1453–62
7. Broberg, C.A., Calder, T.J. y Orth, K. (2011). *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Microbes and infection* **13**, 992–1001
8. Bustamante, V.H., Santana, F.J., Calva, E. y Puente, J.L. (2001). Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Molecular microbiology* **39**, 664–78
9. Campellone, K.G. (2010). Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: Tir, EspFU and actin pedestal assembly. *The FEBS journal* **277**, 2390–402
10. Ciria, R., Abreu-Goodger, C., Morett, E. y Merino, E. (2004). GeConT: gene context analysis. *Bioinformatics* **20**, 2307–8
11. Coombes, B.K., Wickham, M.E., Lowden, M.J., Brown, N.F. y Finlay, B.B. (2005). Negative regulation of *Salmonella* pathogenicity island 2 is required for contextual control of virulence during typhoid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 17460–5
12. Craig, J.E., Zhang, Y. y Gallagher, M.P. (1994). Cloning of the *nupC* gene of *Escherichia coli* encoding a nucleoside transport system, and identification of an adjacent insertion element, IS 186. *Molecular microbiology* **11**, 1159–68
13. Dean, P. y Kenny, B. (2009). The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Current opinion in microbiology* **12**, 101–9

14. Deng, W., Puente, J.L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B.A., Vázquez, A., Barba, J., Ibarra, J.A., O'Donnell, P., Metalnikov, P., Ashman, K., Lee, S., Goode, D., Pawson, T. y Finlay, B.B. (2004). Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 3597–602
15. Sonnenberg, M.S., Tacket, C.O., James, S.P., Losonsky, G., Nataro, J.P., Wasserman, S.S., Kaper, J.B. y Levine, M.M. (1993). Role of the *eaeA* Gene in Experimental Enteropathogenic *Escherichia coli* Infection. *Journal of Clinical Investigation* **92**, 1412–17
16. Sonnenberg, M.S. y Whittam, T.S. (2001). Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Bacterial polymorphisms* **107**, 539–48
17. Dorman, C.J. (2004). H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nature reviews. Microbiology* **2**, 391–400
18. Elliott, S.J., Sperandio, V., Girón, J.A., Shin, S., Mellies, J.L., Wainwright, L., Hutcheson, S.W., McDaniel, T.K. y 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*. *Infection and immunity* **68**, 6115–26
19. Escobar-páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A.-B., Bui, H., Le Bouguéneq, C. y Denamur, E. (2004). A Specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli*. *Molecular biology and evolution* **21**, 1085–94
20. Fabich, A.J., Jones, S.A., Chowdhury, F.Z., Cernosek, A., Anderson, A., Smalley, D., McHargue, J.W., Hightower, G.A., Smith, J.T., Autieri, S.M., Leatham, M.P., Lins, J.J., Allen, R.L., Laux, D.C., Cohen, P.S. y Conway, T. (2008). Comparison of carbon nutrition for pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains in the mouse intestine. *Infection and immunity* **76**, 1143–52
21. Fitzhenry, R., Dahan, S., Torres, A.G., Chong, Y., Heuschkel, R., Murch, S.H., Thomson, M., Kaper, J.B., Frankel, G. y Phillips, A.D. (2006). Long polar fimbriae and tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7. *Microbes and infection* **8**, 1741–9
22. Frankel, G. y Phillips, A.D. (2008). Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cellular microbiology* **10**, 549–56
23. Friedberg, D., Umanski, T., Fang, Y. y Rosenshine, I. (1999). Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **34**, 941–52
24. Gal-Mor, O. y Finlay, B.B. (2006). Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence. *Cellular microbiology* **8**, 1707–19
25. Garmendia, J., Frankel, G. y Crepin, V.F. (2005). Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections : *Infection and immunity* **73**, 2573–85
26. Goldberg, M.D., Johnson, M., Hinton, J.C. y Williams, P.H. (2001). Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **41**, 549–59

27. Gordon, D.M. y Cowling, A. (2003). The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology* **149**, 3575–86
28. Grant, A.J., Farris, M., Alefounder, P., Williams, P.H., Woodward, M.J. y O'Connor, C.D. (2003). Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Molecular microbiology* **48**, 507–21
29. Gyles, C.L. (2007). Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: an overview. *Journal of animal science* **85**, E45–62
30. Haack, K.R., Robinson, C.L., Miller, K.J., Fowlkes, J.W. y Mellies, J.L. (2003). Interaction of Ler at the LEE5 (tir) Operon of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity* **71**, 384–92
31. Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C.G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hattori, M. y Shinagawa, H. (2001). Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA research* **8**, 11–22
32. Hernandez, R.T., Vieira, M.A.M., Carneiro, S.M., Salvador, F.A. y Gomes, T.A.T. (2006). Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains that express typical localized adherence in HeLa cells in the absence of the bundle-forming pilus. *Journal of clinical microbiology* **44**, 4214–7
33. Hughes, D.T. y Sperandio, V. (2008). Inter-kingdom signalling: communication between bacteria and their hosts. *Nature reviews. Microbiology* **6**, 111–20
34. Ide, T., Michgehl, S., Knappstein, S., Heusipp, G. y Schmidt, M.A. (2003). Differential Modulation by Ca²⁺ of Type III Secretion of Diffusely Adhering Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity* **71**, 1725–32
35. 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. y Frankel, G. (2009). Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *Journal of bacteriology* **191**, 347–54
36. Iyoda, S., Koizumi, N., Satou, H., Lu, Y., Saitoh, T., Ohnishi, M. y Watanabe, H. (2006). The GrIR-GrIA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and LEE-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* **188**, 5682–92
37. Iyoda, S. y 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**, 2357–571
38. Kanehisa, M. y Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* **28**, 27–30
39. Kaper, J.B., Nataro, J.P. y Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology* **2**, 123–40

40. Kenny, B., Abe, A., Stein, M. y Finlay, B.B. (1997). Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infection and immunity* **65**, 2606–12
41. Lederberg, J. (2004). *E. coli* K-12. *Microbiology Today* **31**, 116
42. Levine, M.M., Nataro, J.P., Karch, H., Baldini, M.M., Kaper, J.B., Black, R.E., Clements, M.L. y O'Brien, A.D. (1985). The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *The Journal of infectious diseases* **152**, 550–9
43. Lim, J.Y., Yoon, J.W. y Hovde, C.J. (2010). A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **20**, 1–10
44. Lin, J., Smith, M.P., Chapin, K.C., Baik, H.S., Bennett, G.N. y Foster, J.W. (1996). Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology* **62**, 3094–100
45. Low, A.S., Holden, N., Rosser, T., Roe, A.J., Constantinidou, C., Hobman, J.L., Smith, D.G.E., Low, J.C. y Gally, D.L. (2006). Analysis of fimbrial gene clusters and their expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Environmental microbiology* **8**, 1033–47
46. Lukjancenko, O., Wassenaar, T.M. y Ussery, D.W. (2010). Comparison of 61 sequenced *Escherichia coli* genomes. *Microbial ecology* **60**, 708–20
47. Mahajan, A., Currie, C.G., Mackie, S., Tree, J., McAteer, S., McKendrick, I., McNeilly, T.N., Roe, A., La Ragione, R.M., Woodward, M.J., Gally, D.L. y Smith, D.G.E. (2009). An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157:H7 with bovine intestinal epithelium. *Cellular microbiology* **11**, 121–37
48. Matz, C., Nouri, B., McCarter, L. y Martinez-Urtaza, J. (2011). Acquired type III secretion system determines environmental fitness of epidemic *Vibrio parahaemolyticus* in the interaction with bacterivorous protists. *PLoS one* **6**, e20275
49. McDaniel, T.K. y Kaper, J.B. (1997). A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Molecular microbiology* **23**, 399–407
50. Mellies, J.L., Barron, A.M.S. y Carmona, A.M. (2007). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infection and immunity* **75**, 4199–210
51. Mellies, J.L., Benison, G., McNitt, W., Mavor, D., Boniface, C. y Larabee, F.J. (2011). Ler of pathogenic *Escherichia coli* forms toroidal protein-DNA complexes. *Microbiology* **157**, 1123–33
52. Mellies, J.L., Elliott, S.J., Sperandio, V., Sonnenberg, M.S. y 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). *Molecular microbiology* **33**, 296–306
53. Mellies, J.L., Larabee, F.J., Zarr, M.A., Horback, K.L., Lorenzen, E. y Mavor, D. (2008). Ler interdomain linker is essential for anti-silencing activity in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **154**, 3624–38

54. Nakamura, Y., Itoh, T., Matsuda, H. y Gojobori, T. (2004). Biased biological functions of horizontally transferred genes in prokaryotic genomes. *Nature genetics* **36**, 760–6
55. Nataro, J.P. y Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews* **11**, 142–201
56. Navarre, W.W., McClelland, M., Libby, S.J. y Fang, F.C. (2007). Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA. *Genes y development* **21**, 1456–71
57. Ogura, Y., Ooka, T., Iguchi, A., Toh, H., Asadulghani, M., Oshima, K., Kodama, T., Abe, H., Nakayama, K., Kurokawa, K., Tobe, T., Hattori, M. y Hayashi, T. (2009). Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 17939–44
58. Oshima, T., Ishikawa, S., Kurokawa, K., Aiba, H. y Ogasawara, N. (2006). *Escherichia coli* histone-like protein H-NS preferentially binds to horizontally acquired DNA in association with RNA polymerase. *DNA research* **13**, 141–53
59. Perna, N.T., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Pósfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamouisis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A. y Blattner, F.R. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**, 529–33
60. Porter, M.E., Mitchell, P., Free, A., Smith, D.G.E. y Gally, D.L. (2005). The LEE1 Promoters from both Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Can Be Activated by PerC-Like Proteins from Either Organism. *Journal of bacteriology* **187**, 458–72
61. Pratt, L.A., Hsing, W., Gibson, K.E. y Silhavy, T.J. (1996). From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* **20**, 911–17
62. Prescott, L.M., Harley, J.P. y Klein, D.A. (McGraw-Hill: 2005). *Microbiology*. 1130
63. Puente, J.L., Bieber, D., Ramer, S.W., Murray, W. y Schoolnik, G.K. (1996). The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Molecular microbiology* **20**, 87–100
64. Reid, S.D., Herbelin, C.J., Bumbaugh, A.C., Selander, R.K. y Whittam, T.S. (2000). Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. *Nature* **406**, 64–7
65. Ren, C., Chaudhuri, R.R., Fivian, A., Bailey, C.M., Antonio, M., Barnes, W.M. y Pallen, M.J. (2004). The ETT2 Gene Cluster , Encoding a Second Type III Secretion System from *Escherichia coli* Is Present in the Majority of Strains but Has Undergone Widespread Mutational Attrition. *Journal of bacteriology* **186**, 3547–60
66. Riley, L.W., Remis, R.S., Helgerson, S.D., McGee, H.B., Wells, J.G., Davis, B.R., Hebert, R.J., Olcott, E.S., Johnson, L.M., Hargrett, N.T., Blake, P.A. y Cohen, M.L. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *The New England journal of medicine* **308**, 681–5

67. Roe, A.J., Tysall, L., Dransfield, T., Wang, D., Fraser-Pitt, D., Mahajan, A., Constandinou, C., Inglis, N., Downing, A., Talbot, R., Smith, D.G.E. y Gally, D.L. (2007). Analysis of the expression, regulation and export of NleA-E in *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* **153**, 1350–60
68. Rojas-López, M., Arenas-Hernández, M.M.P., Medrano-López, A., Martínez de la Peña, C.F., Puente, J.L., Martínez-Laguna, Y. y Torres, A.G. (2011). Regulatory control of the *Escherichia coli* O157:H7 *lpf1* operon by H-NS and Ler. *Journal of bacteriology* **193**, 1622–32
69. Ronald, A.M.D. (2002). The Etiology of Urinary Tract Infection: Traditional and Emerging Pathogens. *The american journal of medicine* **113**, 14S–19S
70. Saldaña, Z., Xicohtencatl-Cortes, J., Avelino, F., Phillips, A.D., Kaper, J.B., Puente, J.L. y Girón, J.A. (2009). Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. *Environmental microbiology* **11**, 992–1006
71. Savageau, M.A. (1983). *Escherichia coli* Habitats, Cell Types and Molecular Mechanisms of Gene Control. *The American Naturalist* **122**, 732–44
72. Schmidt, M.A. (2010). LEE ways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cellular microbiology* **12**, 1544–52
73. Schreiber, K.J., Ye, D., Fich, E., Jian, A., Lo, T. y Desveaux, D. (2012). A high-throughput forward genetic screen identifies genes required for virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* ES4326 on Arabidopsis. *PLoS one* **7**, e41461
74. Schwidder, M., Hensel, M. y Schmidt, H. (2011). Regulation of *nleA* in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O84:H4 strain 4795/97. *Journal of bacteriology* **193**, 832–41
75. Sharma, V.K. y Zuerner, R.L. (2004). Role of *hha* and *ler* in Transcriptional Regulation of the *esp* Operon of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of bacteriology* **186**, 7290–7301
76. Sheng, H., Lim, J.Y., Knecht, H.J., Li, J. y Hovde, C.J. (2006). Role of *Escherichia coli* O157:H7 virulence factors in colonization at the bovine terminal rectal mucosa. *Infection and immunity* **74**, 4685–93
77. Somers, J.M., Amzallag, A. y Middleton, R.B. (1973). Genetic fine structure of the leucine operon of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* **113**, 1268–72
78. Sperandio, V., Mellies, J.L., Delahay, R.M., Frankel, G., Crawford, J.A., Nguyen, W. y Kaper, J.B. (2000). Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler. *Molecular microbiology* **38**, 781–93
79. Sturm, A., Heinemann, M., Arnoldini, M., Benecke, A., Ackermann, M., Benz, M., Dormann, J. y Hardt, W.-D. (2011). The cost of virulence: retarded growth of *Salmonella Typhimurium* cells expressing type III secretion system 1. *PLoS pathogens* **7**, e1002143
80. Taga, M.E. y Bassler, B.L. (2003). Chemical communication among bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100 Suppl**, 14549–54

81. Tenailon, O., Skurnik, D., Picard, B. y Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology* **8**, 207–17
82. Tennant, S.M., Tauschek, M., Azzopardi, K., Bigham, A., Bennett-Wood, V., Hartland, E.L., Qi, W., Whittam, T.S. y Robins-Browne, R.M. (2009). Characterisation of atypical enteropathogenic *E. coli* strains of clinical origin. *BMC microbiology* **9**, 117
83. Torres, A.G., Slater, T.M., Patel, S.D., Popov, V.L. y Arenas-Hernández, M.M.P. (2008). Contribution of the Ler- and H-NS-regulated long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 during binding to tissue-cultured cells. *Infection and immunity* **76**, 5062–71
84. Trabulsi, L.R., Keller, R. y Gomes, T.A.T. (2002). Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious Diseases* **8**, 508–13
85. Tree, J.J., Wolfson, E.B., Wang, D., Roe, A.J. y Gally, D.L. (2009). Controlling injection: regulation of type III secretion in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Trends in microbiology* **17**, 361–70
86. Umanski, T., Rosenshine, I. y Friedberg, D. (2002). Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**, 2735–44
87. Watanabe, H., Wada, A., Inagaki, Y., Itoh, K. y Tamura, K. (1996). Outbreaks of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection by two different genotype strains in Japan, 1996. *The Lancet* **348**, 831–2
88. Wessler, S.R. y Calvo, J.M. (1981). Control of *leu* Operon *Escherichia coli* by a Transcription Expression in Attenuation Mechanism. *Journal of molecular biology* **149**, 579–97
89. Xicohtencatl-cortes, J., Monteiro-Neto, V., Ledesma, M.A., Jordan, D.M., Francetic, O., Kaper, J.B., Puente, J.L. y Girón, J.A. (2007). Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Clinical Investigation* **117**, 3519–29
90. Yona-Nadler, C., Umanski, T., Aziwaga, S.-I., Friedberg, D. y Rosenshine, I. (2003). Integration host factor (IHF) mediates repression of flagella in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**, 877–84
91. Zhang, L., Chaudhuri, R.R., Constantinidou, C., Hobman, J.L., Patel, M.D., Jones, A.C., Sarti, D., Roe, A.J., Vlisidou, I., Shaw, R.K., Falciani, F., Stevens, M.P., Gally, D.L., Knutton, S., Frankel, G., Penn, C.W. y Pallen, M.J. (2004). Regulators Encoded in the *Escherichia coli* Type III Secretion System 2 Gene Cluster Influence Expression of Genes within the Locus for Enterocyte Effacement in Enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Infection and immunity* **72**, 7282–93
92. Zhu, C., Feng, S., Thate, T.E., Kaper, J.B. y Boedeker, E.C. (2006). Towards a vaccine for attaching/effacing *Escherichia coli*: a LEE encoded regulator (*ler*) mutant of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* is attenuated, immunogenic, and protects rabbits from lethal challenge with the wild-type virulent strain. *Vaccine* **24**, 3845–55