



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“Caracterización de GrIR, un regulador
negativo de la expresión de los genes *LEE* en
Escherichia coli enteropatógena”**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

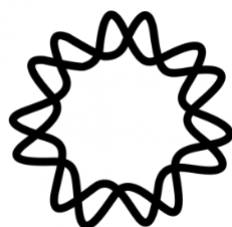
DOCTORA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

P R E S E N T A:

M. C. CRISTINA LARA OCHOA

ASESOR:

DR. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO 2023



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.

Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM bajo la asesoría del Dr. José Luis Puente García.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo
Dr. David René Romero Camarena
Dr. José Luis Puente García

El comité revisor de tesis y jurado estuvo conformado por:

Dr. Mario Soberón Chávez
Dra. Bertha María J. González Pedrajo
Dra. María de Lourdes Girard Cuesy
Dr. José Antonio Ibarra García
Dr. José Alberto Hernández Eligio

Durante el desarrollo del presente trabajo obtuve el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, No. de registro 165332.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Biotecnología UNAM, por el aprendizaje tan enriquecedor adquirido, porque tuve el honor de conocer y aprender de tantos científicos reconocidos a nivel internacional y porque representa un orgullo enorme haber pertenecido a su comunidad.

A mi asesor José Luis Puente, por la oportunidad que me brindaste al recibirme en tu grupo de trabajo y por todo el apoyo para realizar mis estudios de maestría y doctorado, porque a pesar del largo tiempo finalmente agradezco que culmináramos este trabajo. Gracias, porque tu guía y consejos influenciaron mi crecimiento tanto académico como personal.

Al Dr. Edmundo Calva, por sus valiosas enseñanzas tanto académicas como culturales. Un abrazo hasta el cielo.

A mis compañeros del laboratorio Calva/Puente, Toñukys, Abrahamsukys, Alejandrukys, Carmelukys, Almukys, Dianukys, Panchukys, Richard, Ale, por los agradables momentos que pasamos, por el apoyo que me brindaron y por la amistad que ha perdurado hasta estos tiempos.

Al Dr. Jorge A. Yáñez y a mis compañeros del Centro de Detección Biomolecular BUAP, por el agradable equipo de trabajo que formamos y por el apoyo que siempre he recibido de ustedes. Trabajar en el CDB es una gran satisfacción y un reto diario que disfruto con mucha pasión.

A mis queridos alumnos tesistas, porque me han permitido que me convirtiera en su guía durante una etapa de su vida, pero principalmente porque de cada uno he aprendido grandes lecciones de vida.

A la Dra. Guadalupe Espín y al Dr. David Romero por sus valiosas aportaciones durante el desarrollo del presente trabajo y por ser excelentes guías en mi formación académica.

A los miembros del jurado, Dra. Bertha González, Dra. María de Lourdes Girard, Dr. Mario Soberón, Dr. José Antonio Ibarra y Dr. José Alberto Hernández por sus críticas y sugerencias que pulieron la versión final de este trabajo.

DEDICATORIA

Para los ángeles de mi vida:

A la Dra. Lilia Cedillo por todo el apoyo tanto profesional como personal que me ha brindado cada vez que he necesitado, es usted una mujer con un corazón enorme a quien le debo también la culminación de esta etapa profesional de mi vida. Mi eterno agradecimiento por encontrarla en mi camino.

Al Dr. Nacho, porque te debo todas las oportunidades académicas que han llegado a mi vida, por recibirme como tu estudiante en la maestría, por abrirme el camino para llegar al IBT/UNAM y por darme la oportunidad de trabajar en el CDB/BUAP. Sin embargo, lo más significativo implica que esas oportunidades llegaron en momentos complicados de mi vida y tú sin saberlo siempre has aparecido en mi camino para extenderme tu mano. Eres una bendición en mi vida Nacho.

Para mi Familia:

A mi Michi por el amor y apoyo incondicional que siempre me has dado, por todo tu esfuerzo para verme sonreír, pero sobre todo por no soltar nunca la mano de esa niña que siempre disfrutará de ti.

A mi hermana Ana Isabel, una segunda madre, por todo el cariño y consejos. Por la muestra de amor y sacrificio que nos hiciste en estos momentos difíciles. Eres un pilar en mi vida.

A Enrique, Yami (Matías-Christian) y Kike, muchas gracias por su cariño y por estar presentes en cada etapa de mi vida.

A Jorge por el apoyo invaluable que siempre me has brindado.

A Héctor y Katya, siempre los llevo en el corazón.

A mi Padre, por darme el mejor ejemplo de trabajo, constancia, dedicación y amor. Porque siempre creíste en mí y me impulsaste a luchar por mis sueños. Por inculcarme valores y la importancia de la familia. Porque junto con mi mamá me enseñaron a ser una mujer fuerte e independiente y ahora entiendo la importancia de ese legado. Espero no haberte defraudado y que desde donde te encuentres sigas orgulloso de la mujer que soy porque para mí fuiste el mejor Padre que la vida me pudo dar. Te amo por siempre mi Michito.

A mi Cachito, porque eres el regalo divino más hermoso que he recibido, desde la primera vez que supe de ti transformaste mi vida, eres mi inspiración para esforzarme día tras día y convertirme en el mejor ejemplo para que seas el hombre más feliz, lo demás estoy convencida que lo lograrás. Gracias por la paciencia que tuviste durante todos estos años y que a pesar de tu corta edad siempre entendiste mi ausencia. Porque me has dado muchas lecciones de vida que hacen que cada día te admire más y me enorgullezca del hombre en el que te estás convirtiendo. Te amo con todo mi ser mi bebecito.

ÍNDICE

Lista de abreviaturas	VII
Lista de figuras	IX
Lista de tablas	X
Resumen	XI
Abstract	XII
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Familia de patógenos AE	3
1.2 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)	5
1.3 Mecanismo de patogenicidad de EPEC	8
1.3.1 Adherencia inicial	9
1.3.2 Transducción de señales	11
1.3.3 Adherencia íntima	13
1.4 La isla de patogenicidad LEE	14
1.4.1 Organización genética	14
1.4.2 Regulación genética	16
1.4.2.1 Factores ambientales	17
1.4.2.2 Reguladores locales codificados en la isla LEE	19
1.4.2.2.1 Ler	19
1.4.2.2.2 El complejo regulador GrIR-GrIA	21
1.4.2.3 Reguladores globales endógenos de <i>E. coli</i>	22
1.4.2.3.1 Proteínas asociadas al nucleoide (NAPs)	22
1.4.2.3.2 El sistema de percepción de quorum ("Quorum sensing")	23
1.4.2.3.3 La respuesta SOS	24
1.4.2.3.4 Reguladores de resistencia al ácido	24
1.4.2.3.5 El sistema Cpx	25
1.4.2.4 Reguladores codificados en el plásmido EAF	26
1.4.2.4.1 PerC/Pch	26
2. ANTECEDENTES	28
3. HIPÓTESIS	32
4. OBJETIVOS	32
4.1 Objetivo general	32
4.2 Objetivos particulares	32
4.3 Objetivos específicos	32
5. MATERIALES Y MÉTODOS	33
5.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	33
5.2 Manipulaciones de DNA	33
5.3 Construcción de plásmidos	33
5.4 Construcción de la cepa EPEC <i>grIR::FLAG</i>	35
5.5 Construcción de mutantes de GrIR por eliminaciones	35
5.6 Determinación de la actividad de la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT)	36
5.7 Expresión y purificación de 6XH-GrIR	37

5.8 Generación de anticuerpos contra GrIR	38
5.9 Detección de proteínas por Western blot	39
5.10 Ensayo de proteínas secretadas	40
5.11 Ensayos de "Pull-down" para evaluar interacción proteína-proteína	40
5.12 Ensayo de 2 híbridos en bacterias basado en LexA	42
5.13 Identificación de complejos proteicos por electroforesis en geles nativos	42
5.14 Ensayo de cambio de la movilidad electroforética (EMSA)	43
6. RESULTADOS	50
6.1 GrIR reprime la expresión de los operones del LEE en ausencia de Ler y GrIA	50
6.2 GrIR preferencialmente modula de manera negativa la expresión de los genes del LEE en condiciones de represión	54
6.3 GrIR tiene un efecto predominante sobre la expresión de los genes de la isla LEE, con respecto a H-NS, bajo condiciones de represión	56
6.4 GrIR y H-NS tienen un papel diferencial sobre la regulación del LEE bajo diferentes condiciones de crecimiento	57
6.5 H-NS y GrIR integran un mecanismo de regulación negativo que funciona para reprimir la expresión de los genes de la isla LEE	59
6.6 GrIR no interactúa con H-NS, StpA o Ler	62
6.7 GrIA además de activar a Ler, contrarresta la represión ejercida por GrIR sobre los genes de LEE	63
6.8 El efecto represor de GrIR es contrarrestado por GrIA a través de la interacción proteína-proteína	66
6.9 El complejo GrIR ₂ -GrIA está presente en condiciones de inducción y de represión de los genes LEE	72
7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	75
8. PERSPECTIVAS	86
9. BIBLIOGRAFÍA	87
10. ANEXOS	96

LISTA DE ABREVIATURAS (significado en inglés – traducción al español)

AE	<i>Attaching and Effacing</i> - Adherencia y destrucción
BSA	<i>Bovin Serum Albumin</i> - Albúmina sérica bovina
CAT	<i>Chloramphenicol acetyltransferase</i> -Cloranfenicol acetil transferasa
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> - Medio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido desoxirribonucleico
DTNB	5, 5-dithio-bis- (2-nitrobenzoic acid) - Ácido 5, 5' dithio-bis (2-ácido nitrobenzoico)
DTT	Ditiotreitol
EHEC	Enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i> - <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> - Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> - Ensayo de retardamiento en gel de la movilidad electroforética
EPEC	Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> - <i>Escherichia coli</i> enteropatógena
GrIA	<i>Global Regulator of LEE- Activator</i> - Regulador global del LEE (Activador)
GrIR	<i>Global Regulator of LEE- Repressor</i> - Regulador global del LEE (Represor)
GST	Glutación-S-transferasa
HGT	Horizontal Gene Transfer- Transferencia horizontal de genes
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
LB	<i>Lysogeny Broth</i> - Medio de lisogenia también conocido como Luria Broth o Luria-Bertani.
LEE	<i>Locus of Enterocyte Effacement</i> - Locus de destrucción del enterocito
Ler	<i>LEE encoded regulator</i> - Regulador codificado en LEE
M	Molar
MBP	<i>Maltose Binding Protein</i> - Proteína unidora de maltosa
NAPs	<i>Nucleoid Associated Proteins</i> - Proteínas asociadas al nucleoide
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i> - Solución amortiguadora de fosfatos salino
PBS-T	Solución amortiguadora de fosfatos salino con Tween
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> - Reacción en cadena de la polimerasa
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> - Ácido ribonucleico
RNAP	RNA polimerasa

rpm	Revoluciones por minuto
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> - Dodecilsulfato sódico
SDS- PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulfate-Poliacrylamide Gel Electrophoresis</i> - Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico
TAE	Tris-Acetatos-EDTA
TBE	Tris-Boratos-EDTA
SST3	Sistema de Secreción Tipo III
U	Unidades
V	Voltios
WT	<i>Wild Type</i> - Tipo silvestre

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	La lesión AE	5
Figura 2.	Mecanismo de formación de la lesión AE por EPEC	11
Figura 3.	Esquema del aparato de secreción tipo III de EPEC	12
Figura 4.	Organización genética de la isla LEE de EPEC	16
Figura 5.	Modelo de la regulación transcripcional de los genes de la isla LEE en EPEC	18
Figura 6.	Estructura de GrIR	29
Figura 7.	Estructura del complejo heterotrimérico GrIR ₂ -GrIA	31
Figura 8.	GrIR reprime la expresión de los operones de la isla LEE en presencia y ausencia de H-NS	52
Figura 9.	GrIR reprime la expresión y secreción de proteínas codificadas en la isla LEE bajo condiciones en las que GrIA no es el principal activador de <i>ler</i>	53
Figura 10.	GrIR reprime la expresión de los operones <i>LEE1</i> y <i>LEE2</i> en ausencia de H-NS, GrIA y Ler	54
Figura 11.	La ausencia de GrIR desreprime la expresión de los operones del LEE principalmente en condiciones de represión	55
Figura 12.	En la condición de represión, GrIR ejerce un efecto negativo predominante sobre los genes de la isla LEE con respecto a H-NS	56
Figura 13.	GrIR reprime la expresión de <i>LEE2</i> y la secreción de proteínas cuando EPEC es crecida en DMEM/30°C y en menor grado en DMEM/NH ₄	58
Figura 14.	GrIR y H-NS reprimen la expresión del LEE por mecanismos indirectamente cooperativos	61
Figura 15.	GrIR interactúa con GrIA pero no lo hace con otros reguladores que modulan la isla LEE	63
Figura 16.	La sobreexpresión de GrIA evita que GrIR reprima a los genes del LEE principalmente en condiciones de inducción	64
Figura 17.	GrIA además de activar a <i>ler</i> contrarresta el efecto represor de GrIR	66
Figura 18.	GrIR y GrIA están presentes en EPEC durante toda la fase de crecimiento en condiciones de inducción y de represión de los genes LEE	68
Figura 19.	GrIR interactúa con GrIA en un fondo genético distinto de EPEC	69
Figura 20.	El efecto negativo de GrIR es contrarrestado por GrIA	70
Figura 21.	Una mutante de GrIA inactiva para regular a <i>ler</i> es capaz de contrarrestar el efecto de GrIR	72
Figura 22.	El complejo GrIR ₂ -GrIA está presente en condiciones de inducción y de represión de los genes LEE en EPEC	74

Figura 23.	Modelo propuesto del papel de GrIR y del complejo GrIR ₂ -GrIA en la regulación de los genes de la isla LEE	85
-------------------	--	----

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Características principales de las <i>E. coli</i> diarreogénicas	7
Tabla 2.	Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo	44
Tabla 3.	Oligonucleótidos utilizados en este trabajo	48

RESUMEN

EPEC pertenece a una familia de patógenos que tienen la capacidad de inducir la formación de lesiones intestinales únicas llamadas AE (“Attaching and Effacing”). La lesión AE se caracteriza por la destrucción y reorganización de las microvellosidades del borde en cepillo del enterocito y por cambios del citoesqueleto que originan la acumulación de actina polimerizada y la formación de una estructura típica en forma de “copa o pedestal”, sobre la cual la bacteria se adhiere íntimamente al epitelio intestinal. Los genes requeridos para formar la lesión AE están localizados dentro de la isla de patogenicidad LEE (“Locus of Enterocyte Effacement”). La expresión de los genes del LEE está sujeta a la acción de tres reguladores codificados en esta isla, Ler, que contrarresta la represión por H-NS sobre los operones; GrIA, una proteína que activa a *ler*; y GrIR, la cual reprime la expresión de los operones de la isla. En este trabajo analizamos la vía que GrIR utiliza para funcionar como represor y el papel que tiene la interacción con GrIA en la regulación de los genes de la isla LEE en EPEC. Demostramos que GrIR reprime la transcripción de los operones del LEE en EPEC WT y de manera extraordinaria en ausencia de H-NS, incluso es capaz de regular negativamente a genes de la isla en un fondo genético distinto de EPEC en ausencia de GrIA. Esto sugiere que su función como regulador negativo ocurre mediante una vía alterna a la interacción con GrIA, posiblemente actuando de forma directa, o a través de otra proteína conservada en *E. coli* no patógenas. El efecto negativo que GrIR ejerce sobre los operones del LEE es predominante sobre la función del regulador H-NS, específicamente cuando EPEC es cultivada en condiciones de represión de los genes del LEE (LB/37°C). De manera significativa, identificamos que GrIA juega un papel dual como regulador positivo de los genes de la isla debido a que además de eliminar la represión por H-NS y activar a *ler*, también antagoniza el efecto represor de GrIR mediante la interacción proteína-proteína. En contraste con la noción establecida de que GrIR actúa como represor vía su interacción con GrIA, demostramos que el complejo GrIR₂-GrIA está presente tanto en condiciones de inducción como de represión de los genes de la isla y su formación tiene un papel relevante en la regulación porque funciona no solo para inactivar a GrIA sino que también inhibe el efecto negativo de GrIR. Por tanto, en este trabajo proponemos que la expresión de los genes de la isla LEE están sujetos a un mecanismo de regulación negativa conformado por 2 niveles, el primero establecido por el regulador global H-NS y el segundo nivel por el represor local GrIR. Cuando EPEC crece en condiciones de inducción, Ler contrarresta la represión por H-NS y favorece la expresión del operón *grlRA*, GrIA desreprime el efecto de H-NS sobre *LEE1* y contrarresta la represión que GrIR ejerce sobre los operones, atrapándolo en el complejo GrIR₂-GrIA e induciendo la expresión de los operones del LEE. En condiciones de represión, Ler contrarresta a H-NS lo que resulta en la expresión de *grlRA*, GrIA desreprime a *LEE1* del efecto de H-NS y se activa nuevamente el circuito Ler-GrIA, sin embargo, este circuito no es suficiente para activar la expresión de los operones del LEE debido a que GrIR es el principal represor en estas condiciones y, porque el efecto de GrIA no es suficiente para contrarrestar la represión por GrIR, lo que mantiene a los genes de la isla reprimidos. En conclusión, nuestro trabajo proporciona elementos novedosos para sugerir que la regulación de los genes de la isla LEE se fortaleció por la acción orquestada de una vía alternativa adicional a cargo de un regulador negativo propio de la isla, GrIR, junto con un regulador global, H-NS, con la finalidad de prevenir la expresión temprana de los genes que traería consecuencias negativas en la fisiología bacteriana.

ABSTRACT

EPEC belongs to a family of pathogens that have the ability to induce the formation of unique intestinal lesions called AE ("Attaching and Effacing"). The AE lesion is characterized by the destruction and reorganization of the microvilli of the brush border of the enterocyte and by changes in the cytoskeleton leading to the accumulation of polymerized actin and the formation of a typical "cup or pedestal" structure, on which the bacterium adheres intimately to the intestinal epithelium. The genes required to form the AE lesion are located within the pathogenicity island LEE ("Locus of Enterocyte Effacement"). The expression of the LEE genes is subject to the action of three regulators encoded in this island, Ler, which counteracts the repression by H-NS on the operons; GrIA, a protein that activates *ler*; and GrIR, which represses the expression of the island operons. In this work we analyze the pathway that GrIR uses to function as a repressor and the role of interaction with GrIA in the regulation of LEE island genes in EPEC. We show that GrIR represses transcription of LEE operons in EPEC WT and remarkably in the absence of H-NS, it is even able to negatively regulate island genes in a distinct EPEC genetic background in the absence of GrIA. This suggests that its function as a negative regulator occurs through an alternate pathway to interaction with GrIA, possibly acting directly, or through another conserved protein in non-pathogenic *E. coli*. The negative effect that GrIR exerts on LEE operons is predominantly on the function of the H-NS regulator, specifically when EPEC is cultured under conditions of LEE gene repression (LB/37°C). Significantly, we identified that GrIA plays a dual role as a positive regulator of the island genes because in addition to eliminating repression by H-NS and activating *ler*, it also antagonizes the repressor effect of GrIR through the previously reported protein-protein interaction. In contrast to the established notion about GrIR acting as a repressor via its interaction with GrIA, we demonstrate that the GrIR₂-GrIA complex is present both under conditions of induction and repression of island genes and its formation has a relevant role in the regulation because it functions not only to inactivate GrIA but also inhibits the negative effect of GrIR. Therefore, in this work we propose that the expression of LEE island genes is subject to a negative regulatory mechanism consisting of 2 levels, the first one established by the global regulator H-NS and the second level by the local repressor GrIR. When EPEC grows under induction conditions, Ler counteracts repression by H-NS and favors expression of the *grIRA* operon, GrIA de-represses the effect of H-NS on *LEE1* and counteracts the repression that GrIR exerts on the operons, trapping it in the GrIR₂-GrIA complex and inducing expression of the LEE operons. Under repression conditions, Ler counteracts H-NS resulting in the expression of *grIRA*, GrIA de-represses *LEE1* from the effect of H-NS and the Ler-GrIA circuit is activated again, however, this circuit is not sufficient to activate the expression of LEE operons because GrIR is the main repressor under these conditions and, because the effect of GrIA is not sufficient to counteract the repression by GrIR which keeps the island genes repressed. In conclusion, our work provides novel elements to suggest that the regulation of LEE island genes was strengthened by the orchestrated action of an additional alternative pathway by an island-specific negative regulator, GrIR, together with a global regulator, H-NS, to prevent early gene expression that would bring negative consequences in bacterial physiology.

1. INTRODUCCIÓN

Se estima que las bacterias han habitado la Tierra desde hace más de 3 billones de años, esto significa que los organismos eucariotas han tenido que adaptarse a una biósfera dominada por bacterias y coexistir con ellas a través de una estrecha relación. Un ejemplo extraordinario de dicha asociación es la establecida entre los seres humanos y su microbiota. Las superficies mucosas de los humanos y otros mamíferos están colonizadas por una extensa, compleja y dinámica colección de microorganismos. De hecho, numéricamente se considera que un humano adulto posee 10 veces más células de origen procarionta que eucariota (Bäckhed *et al.*, 2005), aunque esta estimación ha sido recientemente cuestionada al proponer que en realidad se trata de una proporción uno a uno (Sender *et al.*, 2016). Se calcula que tan sólo en la cavidad oral residen aproximadamente 10^8 bacterias/ml, mientras que en el estómago habitan cerca de 10^4 a 10^6 células/g (Zhang *et al.*, 2015). Sin embargo, conforme se aleja de la zona gástrica la población microbiana se incrementa, es así como 10^8 bacterias/ml están presentes en el contenido ileal mientras que cerca de 10^{11} a 10^{12} bacterias/g se encuentran habitando el colon (Zhang *et al.*, 2015). Es importante resaltar que en dicha zona no sólo es relevante la abundancia microbiana sino también la diversidad que prevalece, ya que se han identificado cerca de 1500 especies distintas que se agrupan esencialmente en 6 divisiones bacterianas: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Fusobacteria* (Bäckhed *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2015).

El impacto que ejercen estas comunidades microbianas sobre la fisiología del ser humano es primordialmente a nivel del tracto gastrointestinal, sitio donde desempeñan un papel esencial sobre diversos procesos biológicos, tales como: mejoría de la disponibilidad de nutrientes, degradación de compuestos de la dieta no digeribles, aporte de nuevos nutrientes, eliminación de compuestos perjudiciales y el mantenimiento del sistema inmune innato (Bäckhed *et al.*, 2005).

Uno de los microorganismos presentes en la microbiota intestinal es *Escherichia coli*, que inicialmente fue descrita por el pediatra Alemán Theodor

Escherich en 1886 quien la aisló de muestras fecales de niños sanos y la nombró “*Bacterium coli commune*” [revisado en (Chen and Frankel, 2005)]. *E. coli* es una bacteria comensal que suele habitar la capa mucosa del ciego y del colon de los mamíferos en donde representa el microorganismo anaerobio facultativo más común. No obstante, existen ciertas cepas pertenecientes a esta especie que han adquirido la capacidad de causar una gran diversidad de enfermedades que afectan tanto a animales como a seres humanos (Denamur *et al.*, 2021). Datos obtenidos de la secuenciación de 1500 genomas de diferentes aislados han revelado que las cepas de *E. coli* tienen un genoma en común que comprende aproximadamente 2,000 genes (20%) y un genoma accesorio de cerca de 75,000 genes que ha generado la diversidad genética presente en los aislados que inducen enfermedades (Touchon *et al.*, 2020). Este amplio y heterogéneo repertorio de genes con los que cuentan las cepas patogénicas les permitió colonizar y adaptarse a diferentes nichos y ambientes, por lo que pueden pasar de un estado de vida libre a ser comensales y mutualistas del colon o incluso patógenos en los animales de sangre caliente.

Las *E. coli* patogénicas también llamadas “patotipos o patovares”, son cepas de *E. coli* capaces de causar una gran diversidad de padecimientos en individuos sanos (Denamur *et al.*, 2021). De manera general, las enfermedades generadas suelen limitarse a las superficies mucosas, aunque también pueden diseminarse a todo el organismo. Al respecto, se han descrito 3 síndromes clínicos en humanos generados por la infección con algunos de los patotipos de *E. coli*: 1) enfermedades diarreicas, 2) infecciones del tracto urinario y 3) sepsis o meningitis (Croxen and Finlay, 2010).

Las infecciones del tracto urinario son las enfermedades extraintestinales más comunes generadas por esta bacteria y son causadas por UPEC (por sus siglas en inglés, “Uropathogenic E. coli”), mientras que el patotipo MNEC (“Meningitis-associated E. coli”) es responsable de causar meningitis en neonatos y SEPEC (“Sepsis-associated E. coli”) sepsis. Dichos patotipos causantes de infecciones

extraintestinales se denominan ExPEC (“Extraintestinal pathogenic E. coli”) (Denamur *et al.*, 2021).

Las enfermedades diarreicas representan un grave problema de salud pública a nivel mundial, especialmente en países subdesarrollados, donde se estima que cada año mueren cerca de 370,000 niños menores de 5 años de edad por este padecimiento (WHO, 2019). De hecho, la diarrea ocupa el segundo lugar como causante de mortalidad infantil después de la neumonía en este grupo de edad (WHO, 2019). Entre los principales agentes etiológicos, de origen bacteriano, causantes de enfermedades diarreicas en humanos se encuentran los patotipos de *E. coli* diarreogénicos también llamados DEC (“Diarrheagenic E. coli”) (Croxen *et al.*, 2013). Estas variantes patogénicas han sido clasificadas en virtud de las manifestaciones clínicas que originan, serotipos, grupos de edad afectados y factores de virulencia que contienen; e incluyen: *E. coli* enteropatógena (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroagregativa (EAEC), enteroinvasiva (EIEC), difuso adherente (DAEC) y las recientemente reportadas *E. coli* adherente invasiva (AIEC) y enteroagregativa productora de toxina Shiga (STEAE) (Donnenberg, 2013). En la tabla 1 se resumen las principales características de las DEC.

1.1 Familia de patógenos AE

EPEC y EHEC son los únicos patotipos diarreogénicos de *E. coli* que colonizan la mucosa intestinal mediante unas lesiones típicas llamadas de adherencia y destrucción o AE (“Attaching-Effacing Lesions”) (Croxen *et al.*, 2013). Esta lesión representa el evento final de uno de los mecanismos de virulencia más interesantes y extraordinarios que ha desarrollado un grupo de organismos patógenos identificados también como AE o AEEC (“Attaching-Effacing E. coli”). Además de estas bacterias, *Citrobacter rodentium*, un patógeno de ratón causante de hiperplasia transmisible del colon y *Escherichia albertii* son considerados patógenos AE por su capacidad de inducir este tipo de lesiones en sus hospederos (Luperchio, 2000; Collins *et al.*, 2014).

La lesión AE fue descrita por primera vez en 1969, aunque no se nombró como tal en ese momento y fue observada en cerdos recién nacidos inoculados con una cepa de *E. coli* humana [revisado en (Croxen *et al.*, 2013)]. Más tarde, en 1978 se describió una lesión similar en conejos causada por la cepa RDEC-1, una variante de *E. coli* que provoca diarrea en estos mamíferos [revisado en (Wales *et al.*, 2005)]. Posteriormente, las mismas lesiones fueron también descritas en biopsias intestinales de niños infectados con EPEC (Rothbaum *et al.*, 1983). Fue hasta 1983 que Moon y colaboradores describieron lesiones similares a las previamente reportadas y a las que nombraron como lesiones AE (Moon, 1983). Numerosos reportes desde entonces confirmaron este fenotipo característico generado exclusivamente por los patógenos AE, tanto en cultivos “*in vivo*” (en biopsias obtenidas de animales infectados y de niños con diarrea), como “*in vitro*” (cultivos de una amplia variedad de líneas celulares). Las descripciones histopatológicas de las lesiones intestinales inducidas por los patógenos AE son indistinguibles, aunque varían únicamente en el sitio del tracto intestinal donde las forman. EPEC suele colonizar el intestino delgado, mientras que EHEC y *C. rodentium* colonizan el intestino grueso [revisado en (Donnenberg, 2013)].

La lesión AE se caracteriza por la destrucción y reorganización dramática de las microvellosidades del borde en cepillo del enterocito y por cambios profundos del citoesqueleto que originan la acumulación de actina polimerizada y la formación de una estructura típica en forma de “copa o pedestal”, sobre la cual la bacteria se adhiere íntimamente al epitelio intestinal (Figura 1) [revisado en (Donnenberg, 2013)]. Estas estructuras suelen elevarse aproximadamente 10 μm por encima de la célula adoptando unas conformaciones parecidas a pseudópodos (Figura 1) (Rosenshine *et al.*, 1996a; Rosenshine *et al.*, 1996b). Los pedestales no permanecen como estructuras estáticas, se ha observado que constantemente cambian de longitud, forma y posición; tales particularidades parecen además impulsar el desplazamiento de EPEC sobre la superficie celular a una velocidad aproximada de 4.2 μm por minuto, lo que posiblemente facilita la diseminación de

la bacteria a los enterocitos adyacentes favoreciendo su persistencia en el hospedador (Sanger *et al.*, 1996).

En este sentido, representa un hecho indiscutible que los microorganismos que son capaces de formar las lesiones AE tienen asegurada la colonización exitosa en su hospedero, así como la diseminación y multiplicación bacteriana para el desarrollo de la enfermedad. Es así como los patógenos AE representan un ejemplo extraordinario de adaptación pues han desarrollado estrategias para subvertir desde el exterior la maquinaria de la célula hospedera para propósitos de sobrevivencia y, a diferencia de bacterias como *Salmonella*, *Shigella* o *Listeria*; los patógenos AE continúan manteniéndose como patógenos extracelulares.

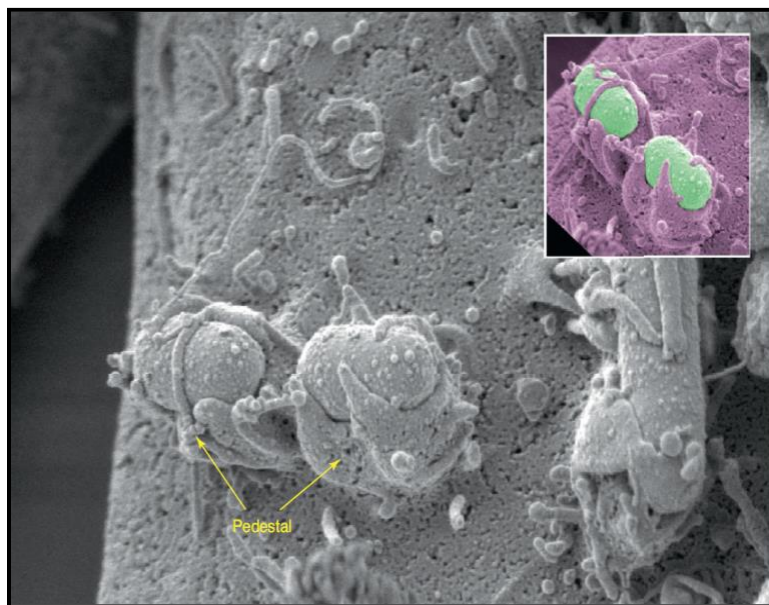


Figura 1. La lesión AE. Micrografía electrónica de pedestales inducidos por EPEC (señalados con flechas) sobre células infectadas de mamíferos. En el recuadro pequeño se muestra una imagen coloreada de 2 bacterias EPEC (verde) infectando células HeLa (morado). Imagen obtenida de (Bhatt *et al.*, 2011).

1.2 *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

EPEC fue el primer grupo de cepas patógenas de *E. coli* referidas como la causa de brotes de diarrea infantil entre los años de 1940 a 1950 en los países desarrollados, por lo que representa el prototipo de la familia de patógenos AE [revisado en (Donnenberg, 2013)]. Clasificada en términos de la incapacidad para

producir enterotoxinas o de generar invasividad, Neter en 1955 la nombró EPEC [revisado en (Clarke *et al.*, 2003)].

Las cepas que pertenecen a este patotipo han sido subdivididas a su vez en EPEC típicas y atípicas en función de la presencia o no del plásmido EAF (“EPEC Adherence Factor”), un elemento genético importante en la patogenicidad de esta bacteria y que favorece principalmente la adherencia al enterocito (Baldini *et al.*, 1983; Nataro *et al.*, 1985). Las bacterias incluidas como típicas portan el plásmido EAF, el cual alberga los genes requeridos para la producción de los pili tipo IV llamados BFP (“Bundle-Forming Pilus”), que median la adherencia localizada de la bacteria a la célula epitelial (Giron *et al.*, 1991; Donnenberg *et al.*, 1992; Bieber *et al.*, 1998; Knutton *et al.*, 1999). En contraste, las EPEC atípicas se caracterizan por no contener el plásmido EAF y se adhieren a través de adhesinas distintas del BFP (Hu and Torres, 2015). La cepa prototipo sobre la que se basan una gran cantidad de estudios es la E2348/69 serotipo O127:H6, una EPEC típica aislada a partir de un brote diarreico en niños generado en Taunton, Reino Unido en 1969 [revisado en (Donnenberg, 2013)].

En la actualidad, EPEC continúa siendo uno de los principales agentes etiológicos de diarrea y de mala absorción que afecta a niños menores de 6 meses de edad en todo el mundo, predominando en países en vías de desarrollo donde es causante de millones de muertes cada año (Pakbin *et al.*, 2021). La enfermedad producida por esta bacteria se caracteriza por diarrea acuosa aguda de variada severidad, aunque se tienen reportados casos de diarrea persistente. La diarrea suele estar acompañada por vómito, fiebre, malestar general y pérdida de fluidos (Pakbin *et al.*, 2021). En adultos sanos, EPEC es capaz de causar diarrea cuando es administrada en dosis altas (10^8 a 10^{10} UFC); sin embargo, se estima que la dosis infectiva en enfermedades ocurridas naturalmente es mucho más baja (Croxen *et al.*, 2013).

Tabla 1. Características principales de las *E. coli* diarreogénicas

Patotipo	Hospedero (s)	Sitio de colonización	Enfermedad	Reservorios/ Fuentes de contaminación	Mecanismo de Patogenicidad	Marcadores genéticos para PCR
EPEC	Niños menores de 5 años y adultos con dosis infectivas altas	Intestino delgado	Diarrea aguda y en menor grado persistente	Humanos y animales	Adherencia y destrucción	<i>eae, bfp*</i>
EHEC	Todas las edades con dosis infectivas bajas	Íleon distal y colon	Diarrea aguda, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico	Humanos, animales, agua y alimentos	Adherencia y destrucción, toxina Shiga	<i>eae, stx</i>
EIEC	Todas las edades, inmuno-comprometidos	Colon	Diarrea aguda, Disentería bacilar	Humanos, animales, agua y alimentos	Invasiva	<i>ipaH, ial</i>
EAEC	Todas las edades, inmuno-comprometidos, viajeros	Intestino delgado y colon	Diarrea del viajero, diarrea aguda y persistente en niños.	Alimentos y adultos portadores	Adherencia agregativa	<i>aggR, aatA, aap</i>
ETEC	Niños menores de 5 años, inmuno-comprometidos, viajeros	Intestino delgado	Diarrea del viajero. Diarrea aguda y persistente.	Humanos, animales, agua y alimentos	Adherencia mediada por CFs. Toxinas ST y LT	CFs, LT, ST, <i>etpA</i>
DAEC	Todas las edades (mayor severidad en niños menores de 5 años)	Intestino delgado y grueso	Diarrea persistente en niños.	Humanos, animales, agua y alimentos	Adherencia difusa	<i>Afa/Dr</i>
AIEC	Todas las edades	Intestino delgado y grueso	Asociado a enfermedad de Crohn	Presente en humanos sanos y animales	Invasiva. Predisposición genética del hospedero	ND
STEAEC	Todas las edades	ND	Diarrea aguda, síndrome urémico hemolítico	Alimentos contaminados	Adherencia agregativa y toxina Shiga	<i>aggR, stx</i>

Modificado de Croxen *et al.*, 2013. **eae**: intimina; **bfp**: codifica la fimbria BFP; **stx**: toxina Shiga; **ipaH**: antígeno H del plásmido de invasión; **ial**: locus asociado a invasión; **aggR**: Regulador AggR; **aatA**: Proteína de membrana externa del sistema ABC; **aap**: dispersina; **CFs**: antígenos de superficie; **LT**: toxina termolábil; **ST**: toxina termoestable; **etpA**: adhesina del flagelo; **Afa/Dr**: familia de adhesinas. *ausente en EPEC atípica, ND: no determinada.

La diarrea ocasionada por EPEC ocurre como resultado de la alteración en la absorción y secreción de iones y solutos a lo largo del epitelio intestinal, seguido por el movimiento de agua con la finalidad de restaurar las concentraciones óptimas de iones (Viswanathan *et al.*, 2009). A pesar de los grandes avances que se han realizado para entender los mecanismos de patogenicidad de las bacterias AE y cómo influyen a nivel celular y genético, la fisiopatología de la diarrea generada por EPEC es un proceso muy complejo que no ha sido todavía comprendido en su totalidad. Eventos como la pérdida dramática de las microvellosidades del epitelio intestinal y la consecuente disminución del área de superficie de absorción, ciertamente contribuyen a la generación de diarrea. Sin embargo, diversos reportes proponen que la inducción de diarrea por estos patógenos es consecuencia de múltiples mecanismos que incluyen: pérdida de la superficie de absorción, incremento de la permeabilidad intestinal por afectación de las uniones estrechas, así como la alteración en el funcionamiento y transporte de los canales iónicos (Dean *et al.*, 2006; Guttman *et al.*, 2006; Guttman *et al.*, 2007; Viswanathan *et al.*, 2009).

El proceso de la diarrea inducida por EPEC y los patógenos AE representa un mecanismo que les confiere una ventaja competitiva sobre la microbiota intestinal normal, tomando en cuenta que estos patógenos son capaces de establecer una interacción íntima con los enterocitos sobre los que permanecen adheridos a la superficie intestinal, mientras que otras bacterias con habilidades de colonización inferiores terminan arrastradas por el flujo intestinal.

1.3 Mecanismo de Patogenicidad de EPEC

El mecanismo que utiliza EPEC para colonizar las células epiteliales del hospedero e inducir la formación de la lesión AE representa uno de los procesos más estudiados en la patogénesis de las enterobacterias. Hasta el momento, el proceso de formación de la lesión es controversial, algunos autores sugieren que dicho evento sucede en 3 etapas y otros proponen 4 eventos (Hicks *et al.*, 1998; Knutton *et al.*, 1998). En este trabajo nos vamos a referir a un mecanismo de

formación de la lesión AE, propuesto por Donnenberg y Kaper en 1992, que sucede en 3 etapas: a) Adherencia inicial, b) Transducción de señales y c) Adherencia íntima (Figura 2).

1.3.1 Adherencia inicial:

El proceso inicial del mecanismo de patogenicidad de EPEC representa un evento importante para los procesos de señalización que conducen a la formación de la lesión AE. Consiste en la unión no íntima de la bacteria con la célula hospedera formando microcolonias distribuidas de manera localizada sobre la superficie del epitelio intestinal, este fenotipo característico de interacción es llamado adherencia localizada o LA (“Localized Adherence”) y ha sido ampliamente usado como una herramienta diagnóstica para la identificación de las EPEC típicas (Tobe and Sasakawa, 2001; Chen and Frankel, 2005).

Para el desarrollo de la LA se requiere de la expresión del BFP, un pilus tipo IV de la clase B que forma mechones y, a su vez, redes o haces con los BFPs de otras EPEC favoreciendo la agregación bacteriana y la formación de microcolonias que potencian la capacidad de adherirse inicialmente a la célula intestinal (Figura 2) (Giron *et al.*, 1991; Donnenberg *et al.*, 1992; Tobe and Sasakawa, 2001).

Los genes requeridos para la expresión del BFP se encuentran organizados en 2 operones ubicados en el plásmido EAF (Nataro *et al.*, 1985). Uno de ellos es el operón *bfp* formado por 14 genes los cuales son requeridos para la biogénesis de la fimbria (Donnenberg *et al.*, 1992; Sohel *et al.*, 1993; Sohel *et al.*, 1996; Hwang *et al.*, 2003). El otro clúster está conformado por los genes *perABC* que codifican para reguladores transcripcionales que modulan la expresión del BFP y de genes de virulencia localizados en una isla de patogenicidad cromosomal (Gomez-Duarte and Kaper, 1995; Tobe *et al.*, 1996; Bustamante *et al.*, 1998; Martinez-Laguna *et al.*, 1999; Mellies *et al.*, 1999; Ibarra *et al.*, 2003).

Además del BFP, el pilus ECP (“E. coli common pilus”) ha sido igualmente implicado durante esta etapa del mecanismo de patogenicidad, ECP es un factor importante para la colonización a células epiteliales de cepas de *E. coli* tanto

comensales como patógenas (Rendon *et al.*, 2007). En EPEC se ha observado que ECP es coexpresado con BFP durante el desarrollo de la LA sobre un cultivo celular, funcionando como un factor de adherencia accesorio que promueve la unión a la célula y las interacciones bacteria-bacteria (Saldana *et al.*, 2009). Así mismo, se ha reportado la participación de otras proteínas codificadas en el cromosoma de esta bacteria que son también capaces de promover la adhesión a la célula eucariota. Una de ellas es EspA, la cual forma una estructura filamentosa que es una extensión del sistema de secreción tipo III (SST3), mediante el cual la bacteria transloca proteínas efectoras al interior de la célula hospedera (Figura 3). Se le atribuye el rol de adhesina debido a que los filamentos de EspA se requieren en etapas tempranas de la formación de la lesión AE y, porque en ausencia del BFP, dicho filamento es capaz de promover, aunque en menor grado, la interacción inicial de la bacteria con la célula hospedera (Cleary *et al.*, 2004; Chen and Frankel, 2005). Otra molécula implicada es intimina, una proteína de membrana externa de los patógenos AE que tiene un papel fundamental en la etapa de adherencia íntima con la célula hospedera. Intimina interactúa con Tir (“Translocated Intimin Receptor”), una proteína de la bacteria que es translocada por el SST3 al enterocito (Kenny *et al.*, 1997b). Además de esta interacción, intimina se une a los receptores β_1 -integrina y nucleolina, presentes en las células epiteliales del hospedero. Debido a tales interacciones se propone que intimina determina el tropismo tisular que poseen los diferentes patógenos AE, ya que se han identificado distintas variantes en función de la preferencia del tejido a colonizar (Donnenberg, 2013).

Numerosos grupos han propuesto que el flagelo, curli, Efa 1/LifA, LPF, ToxB, StcE, Iha, OmpA y otras variantes de pili tipo IV pudieran estar implicados en la adherencia de los patógenos AE a sus hospederos [revisado en (Humphries and Armstrong, 2010; Pearson *et al.*, 2016)]. Ante tales evidencias es claro que el mecanismo de adherencia inicial de EPEC a los enterocitos, y del resto de los patógenos AE, representa un proceso multifactorial en el que las numerosas proteínas de superficie celular con las que cuentan estos patógenos para la interacción con su hospedero, posiblemente funcionan de manera sinérgica como

una estrategia para asegurar una colonización exitosa y, al mismo tiempo, favorecer que éstos puedan unirse al enterocito bajo una gran variedad de condiciones ambientales.

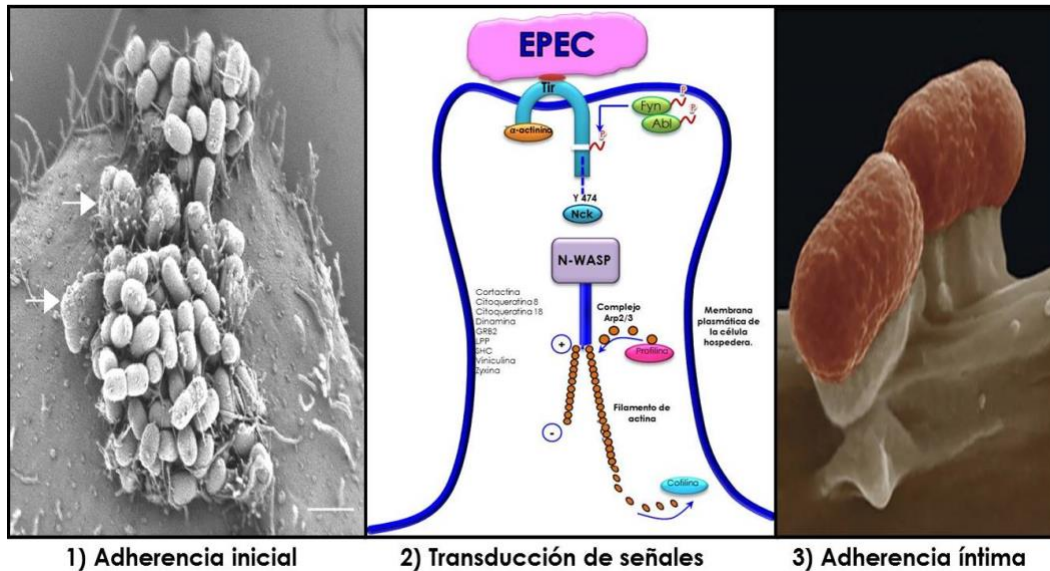


Figura 2. Mecanismo de formación de la lesión AE por EPEC. 1) Adherencia inicial: EPEC se adhiere inicialmente al enterocito formando microcolonias mediante el pilus BFP, ECP y en menor grado usando el flagelo y EspA, entre otras adhesinas. Imagen tomada de (Saldana *et al.*, 2009). 2) Transducción de señales: en esta etapa se lleva a cabo la translocación de proteínas efectoras a través del SST3. Estas proteínas subvierten las vías de transducción de señales del hospedero. 3) Adherencia íntima: intimina, la proteína de membrana externa de EPEC, interactúa con Tir en la membrana de la célula epitelial; tal interacción induce rearrreglos del citoesqueleto de actina bajo el sitio donde la bacteria se adhiere, resultando en la formación de una estructura de tipo copa o pedestal. Modificado de: https://digital.wwnorton.com/ebooks/epub/microbio4/OEBPS/images/sfmb4e_2526.jpg

1.3.2 Transducción de señales

Una vez que la bacteria ha logrado adherirse al enterocito, inicia la translocación de una serie de proteínas llamadas “efectoras” que tienen como destino final la subversión de las vías de transducción de señales de la célula hospedera (Figura 2). Estas proteínas se encuentran codificadas en la isla de patogenicidad LEE (Figura 4), así como en otros elementos genéticos localizados en regiones dispersas del genoma (Croxen *et al.*, 2013).

Al igual que otros patógenos entéricos, EPEC utiliza un SST3 para translocar las proteínas efectoras al enterocito. Esta maquinaria molecular codificada también en

la isla LEE, consiste de aproximadamente 20 proteínas que se agrupan para formar 3 componentes principales (Figura 3): 1) un cuerpo basal embebido en la membrana interna y externa formando un conducto que atraviesa el espacio periplásmico; 2) componentes citosólicos que incluyen el complejo de la ATPasa, el anillo C, proteínas chaperonas y efectoras; y 3) componentes extracelulares que emergen de la superficie de la bacteria y que incluyen el translocón (forma un poro en la membrana del enterocito), el filamento y la aguja [revisado en (Gaytan *et al.*, 2016; Slater *et al.*, 2018)].

El ensamblaje del SST3 y sus efectoras son elementos esenciales para la virulencia de EPEC, proteínas codificadas en el LEE como EspG, EspH, EspF, EspZ, EspB, Map y Tir son inyectadas en el citoplasma del enterocito mediante este sistema. De manera interesante, existen proteínas que no se encuentran codificadas en la isla LEE pero que son sustrato de esta maquinaria y por tanto sujetas a llegar al interior de la célula blanco. Estos efectoras, conocidos como Nle's ("Non-LEE encoded effectors"), incluyen a NleA/EspI, NleB, NleC, NleD, NleE, EspJ, NleH, EspG2, EspM y Cif; entre otros [revisado en (Pearson *et al.*, 2016)].

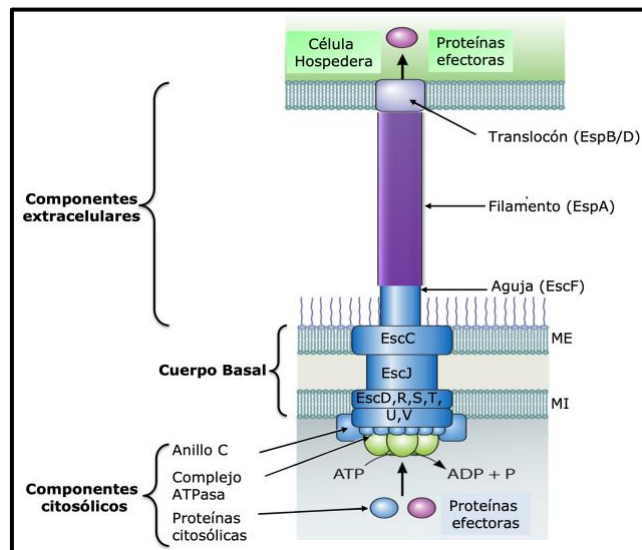


Figura 3. Esquema del aparato de secreción tipo III de EPEC. El SST3 está formado por 3 subestructuras: 1) componentes extracelulares que emergen de la superficie de la bacteria y hacen contacto con la célula hospedera, incluye: translocón, filamento y aguja; 2) cuerpo basal: consiste de anillos que se insertan en la membrana externa e interna conectadas a través de un conducto que atraviesa el espacio periplásmico; y 3) componentes citosólicos que incluyen: complejo de la ATPasa, el anillo C y proteínas citosólicas (efectoras y chaperonas). Imagen modificada de (Buttner, 2012). ME: membrana externa, MI: membrana interna.

De manera general, los efectos inducidos en el enterocito por la translocación de efectores involucran la subversión de las vías de transducción de señales implicadas en la reorganización del citoesqueleto, alteración de la integridad de las uniones estrechas, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, tráfico vesicular, inhibición de la transición de la fase G₂/M del ciclo celular, alteración de apoptosis y modulación de la respuesta inmune del hospedero [revisado en (Donnenberg, 2013)].

1.3.3 Adherencia íntima

El sello distintivo de los patógenos AE es su capacidad de adherirse íntimamente a la superficie del enterocito, este proceso es dependiente de la interacción entre las proteínas Tir e intimina (Figura 2). Tir dentro de la célula hospedera sufre una serie de modificaciones post-traduccionales que involucran eventos de fosforilación catalizadas principalmente por las cinasas eucariotas C-Fyn y Abl (Phillips *et al.*, 2004; Swimm *et al.*, 2004), Tir de EPEC es fosforilada en diversos residuos de serina y treonina y se propone que la energía adquirida con estas modificaciones suplen el cambio conformacional requerido para su inserción en la membrana plasmática del enterocito (Kenny *et al.*, 1997b). Además, otro evento de fosforilación sobre un residuo de tirosina en la posición 474 representa un mecanismo trascendental para promover los eventos de señalización posteriores que conducen a la formación del pedestal (Kenny, 1999).

Una vez que Tir se inserta en la membrana plasmática del enterocito adopta una estructura parecida a una horquilla con un dominio extracelular por medio del cual se une a intimina, mientras que los extremos amino y carboxilo residen en el citoplasma de la célula hospedera en donde interactúan con diversas proteínas del citoesqueleto y componentes de señalización (Rosenshine *et al.*, 1996b; Kenny, 1999). El extremo amino de Tir interactúa y recluta proteínas de adhesión focal tales como: α -actinina, talina y vinculina; esto significa que este segmento de Tir funciona para mantener conectado el citoesqueleto de actina con la membrana de EPEC, pero no es necesario para la formación del pedestal (de Grado *et al.*, 1999; Kenny,

1999; Goosney *et al.*, 2000; Kenny and Warawa, 2001). Por el contrario, el fragmento hacia el extremo carboxilo terminal sí posee un papel fundamental durante el proceso de la adherencia íntima (DeVinney *et al.*, 2001). En EPEC, dicha región incluye la Y474 que una vez fosforilada induce la interacción con Nck, una proteína adaptadora que recluta y activa a N-WASP (Gruenheid *et al.*, 2001; Campellone *et al.*, 2002), ésta a su vez activa al complejo heptamérico Arp2/3 que promueve la nucleación de actina a través de la generación de redes dendríticas de filamentos de actina que en conjunto conducen a la formación del pedestal [revisado en (Lai *et al.*, 2013)].

Los hallazgos acerca del papel de Tir en la patogénesis de EPEC revelan a un efector multifuncional que está involucrado en los siguientes eventos: 1) sirve como el receptor de intimina para establecer la adherencia con la finalidad de unir íntimamente la bacteria extracelular al citoesqueleto de la célula, 2) sirve como un transmisor de señales adicionales debido a que en conjunto con otros efectores altera la integridad de las uniones estrechas y las adhesiones focales afectando la exfoliación celular, contribuyendo a la diarrea; y por último, 3) actúa como un mediador esencial en la subversión de las cascadas de señalización del pedestal de actina favoreciendo el reclutamiento de múltiples efectores justo debajo del sitio de colonización de la bacteria, posiblemente para tener un control de sus funciones efectoras en virtud de los requerimientos del patógeno (Lai *et al.*, 2013).

1.4 La isla de patogenicidad LEE

1.4.1 Organización genética

El proceso de formación de la lesión AE requiere de la acción concertada de un grupo de genes ubicados dentro de la isla de patogenicidad LEE que está presente en el genoma de los patógenos AE. Sin embargo, en los últimos años con el incremento en las lecturas de un mayor número de genomas por las tecnologías de secuenciación masiva, se identificó a este elemento genético en 2 aislados de *Salmonella enterica* subespecie *salamae*, por lo que es probable que esté presente en otras enterobacterias (Chandry *et al.*, 2012).

La isla LEE fue identificada inicialmente en 1995 en la cepa prototipo de EPEC (McDaniel *et al.*, 1995) y más tarde identificada en otros patógenos AE . Posee un contenido de GC de 38%, más bajo que el encontrado en el resto del cromosoma (50.8%), lo que demuestra un origen distinto de *E. coli* (McDaniel and Kaper., 1997; Perna *et al.*, 1998). En este sentido, se ha establecido que los patógenos AE adquirieron el LEE de un origen común a través de eventos de transferencia horizontal (Chen and Frankel, 2005); sin embargo, se desconoce su origen y el mecanismo a través del cual ocurrió la transferencia.

En EPEC (en particular la cepa E2348/69), el LEE tiene un tamaño de 35,624 pb y está insertado cerca del locus de RNA_t para selenocisteína (McDaniel and Kaper., 1997; Elliott *et al.*, 1998). A pesar de las diferencias en tamaño y contenido genético entre los patógenos AE, el locus conserva una estructura básica. Comprende 41 genes que se encuentran organizados principalmente en 5 operones policistrónicos *LEE1*, *LEE2*, *LEE3*, *LEE4*, *LEE5*; 2 bicistrónicos: *LEE6* y *LEE7*; y 4 entidades monocistrónicas: *etgA*, *cesF*, *map* y *escD* (Figura 4). Los operones *LEE1*, *LEE2* y *LEE3* codifican para los componentes estructurales del SST3 y para el regulador transcripcional Ler (“LEE encoded regulator”) (Figura 4) (Elliott *et al.*, 1998; Mellies *et al.*, 1999; Elliott *et al.*, 2000). En el *LEE5*, se localizan los genes necesarios para la adherencia íntima. El gen *eae* codifica para la adhesina intimina, *tir* para el receptor de intimina y *cesT* para la chaperona de Tir (Figura 4) (Elliott *et al.*, 1998; Elliott *et al.*, 2000; Sanchez-SanMartin *et al.*, 2001).

En el operón *LEE4* se ubican los genes *espADB* (“EPEC secreted protein”) (Figura 4), que codifican para las proteínas translocadoras que forman un conducto o poro en la membrana celular a través del cual el SST3 inyecta las proteínas efectoras al enterocito (Kenny *et al.*, 2002). *LEE6* está integrado por los genes *espG* y *rorf1* que codifican para una proteína efectora y una proteína de función desconocida (Shaw *et al.*, 2005).

Además de Ler, existen otras 2 proteínas reguladoras codificadas en el LEE, GrIR (“Global regulator of LEE repressor”), y GrIA (“Global regulator of LEE activator”), que actúan como un regulador negativo y positivo, respectivamente. Los

genes *grlR* y *grlA* que codifican dichas proteínas se encuentran organizados conformando el operón *LEE7* (Figura 4) (Deng *et al.*, 2004; Barba *et al.*, 2005).

El resto de los genes que codifican para las proteínas efectoras involucradas en la subversión de algunas vías de transducción de señales del hospedero y sus chaperonas se encuentran distribuidos a lo largo del LEE, así como en profagos y otras islas de patogenicidad ubicadas a lo largo del cromosoma de EPEC (Pearson *et al.*, 2016; Serapio-Palacios and Finlay, 2020).

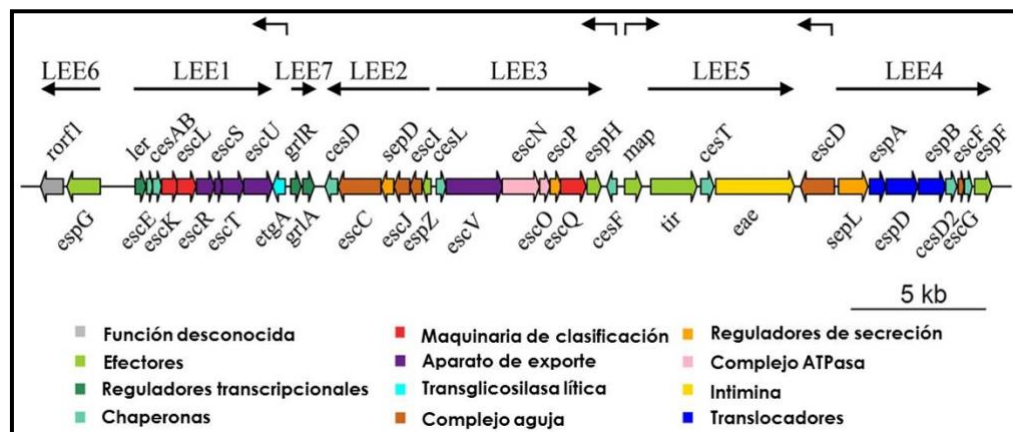


Figura 4. Organización genética de la isla LEE de EPEC. El arreglo y la dirección de la transcripción de genes que codifican para el SST3, proteínas efectoras, chaperonas, reguladores y otras funciones son mostradas (Ver texto para más detalle). Imagen modificada de (Gaytan *et al.*, 2016).

1.4.2 Regulación genética

Una bacteria no es más virulenta que otra sólo por poseer una cantidad mayor y heterogénea de factores de virulencia, sino que, además debe poseer un mecanismo de control muy estricto que permita la expresión debidamente sincronizada de cada uno de ellos durante los diferentes estadios de la infección. Esto con la finalidad de evitar un gasto metabólico intenso, pero especialmente para evitar alertar al sistema inmunológico del hospedero antes de que el patógeno pueda establecer una colonización exitosa. Es así como la expresión coordinada de los genes de virulencia es dependiente de factores o proteínas reguladoras que tienen la función de prender o apagar los genes necesarios en el momento preciso de la etapa de la infección.

En este sentido, la isla LEE contiene diversos genes que codifican para proteínas reguladoras que modulan la expresión de genes ubicados en esta misma isla y también de varios localizados fuera de ésta (Pearson *et al.*, 2016). Asimismo, la expresión de los genes del LEE no está sujeta únicamente a la acción de los reguladores locales debido a que también es influenciada por proteínas que se encuentran codificadas fuera de ésta (Franzin and Sircili, 2015). Tal fenómeno es consecuencia de los diversos eventos de adaptación que ha sufrido la isla a lo largo de la evolución con la finalidad de permanecer en la bacteria y así conferirle al patógeno una nueva ventaja competitiva.

El proceso de formación de las lesiones AE representa un caso interesante de una exitosa expresión espacio temporal sumamente coordinada de la isla LEE por los patógenos AE. Sin embargo, esto no es un fenómeno simple debido a que una gran cantidad de factores están involucrados en la expresión de sus genes a nivel transcripcional, post-transcripcional, traduccional y post-traduccional. En este trabajo nos enfocaremos en 4 tipos de elementos reguladores que actúan principalmente a nivel transcripcional y que incluyen los siguientes: 1) Factores ambientales, 2) Una jerarquía reguladora local, 3) Un sistema de reguladores globales endógenos de *E. coli* y 4) Un grupo de reguladores adquiridos por transferencia horizontal (Figura 5).

1.4.2.1 Factores ambientales

Una vez que EPEC inicia la infección en el hospedero se enfrenta durante su camino a cambios en pH, osmolaridad, temperatura, cationes, estrés de membrana e inanición por nutrientes. Ante tales eventos la bacteria debe controlar la expresión y secreción de sus determinantes de virulencia, además de realizar ajustes en diversos procesos metabólicos. Numerosos grupos han documentado que las condiciones óptimas requeridas para la formación *in vitro* de las lesiones AE por EPEC, son aquellas que mimetizan el escenario existente en el intestino delgado (Kenny *et al.*, 1997a). Es así que el medio de cultivo mínimo DME (“Dulbecco’s Eagle’s Medium”) para células eucariotas, la fase exponencial de

crecimiento, temperatura de 37°C, pH 7 y osmolaridad fisiológica; son condiciones ideales para la formación de los pedestales y consecuentemente para la expresión y secreción de proteínas codificadas en la isla LEE (Puente *et al.*, 1996; Rosenshine *et al.*, 1996a; Kenny *et al.*, 1997a; Martinez-Laguna *et al.*, 1999). Asimismo, la secreción de proteínas de la isla es también dependiente de la presencia de hierro, calcio y bicarbonato de sodio (Kenny *et al.*, 1997a; Abe *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2008), incluso este último compuesto es suficiente para promover la secreción de determinantes de virulencia en medio de cultivo rico como el LB (Luria–Bertani) (Abe *et al.*, 2002), donde la expresión de los genes *LEE* es generalmente indetectable.

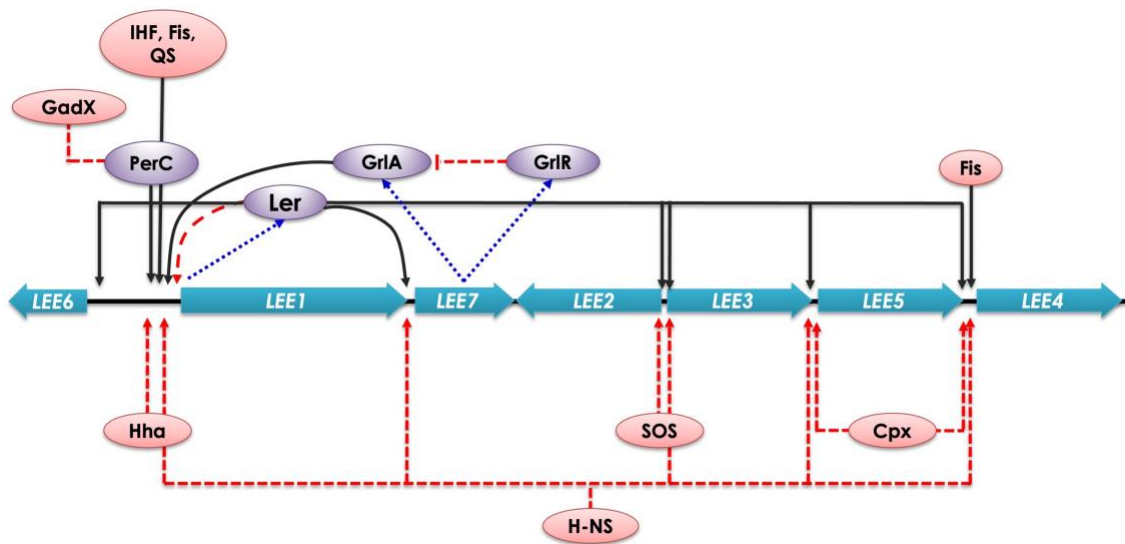


Figura 5. Modelo de la regulación transcripcional de los genes de la isla LEE en EPEC. Las flechas continuas representan las redes reguladoras positivas y las flechas discontinuas las redes reguladoras negativas. Reguladores globales endógenos de *E. coli* se indican en óvalos en rojo y los reguladores adquiridos por transferencia horizontal en morado. Ver texto para más detalle.

El efecto contrario ocurre en presencia de sales de amonio y zinc (Puente *et al.*, 1996; Kenny *et al.*, 1997a; Martinez-Laguna *et al.*, 1999; Crane *et al.*, 2007). El amonio representa una molécula clave de señalización negativa para la virulencia de EPEC, cuando esta bacteria se encuentra en un ambiente con altas concentraciones de amonio (colon), es un indicativo que ha fracasado en establecerse en su hábitat ideal para la sobrevivencia y replicación y, por lo consiguiente, requiere apagar la expresión de los factores de virulencia hasta

encontrar nuevamente su sitio ideal de colonización (Puente *et al.*, 1996; Kenny *et al.*, 1997a; Martinez-Laguna *et al.*, 1999). Respecto del zinc, actúa como un removedor de fosfatos en el lumen intestinal limitando su disponibilidad y uso en las funciones esenciales para la sobrevivencia de EPEC, lo que genera la disminución en la proliferación de las poblaciones bacterianas (Crane *et al.*, 2007; Mellies *et al.*, 2012). El uso de suplementos de zinc representa una estrategia exitosa que se ha implementado para el tratamiento de la diarrea causada por EPEC así como la inducida por diversos patógenos.

1.4.2.2 Reguladores locales codificados en la isla LEE

1.4.2.2.1 Ler

Ler es una proteína de 15 kDa que tiene similitud a nivel de la secuencia de aminoácidos con la familia de proteínas de unión a DNA de H-NS (“Histone-like nucleoid-structuring protein”) (Elliott *et al.*, 1998). No obstante, aunque la más grande similitud con esta proteína es hacia el extremo carboxilo terminal donde se encuentra el dominio de unión a DNA, Ler no comparte las mismas características de represión transcripcional que determina a los miembros de esta familia (Sperandio *et al.*, 2000; Mellies *et al.*, 2007a).

Ler es un regulador esencial en el proceso de formación de la lesión AE, su función es favorecer la transcripción de los operones *LEE2*, *LEE3*, *LEE4*, *LEE5*, *LEE6* y *LEE7*; así como de los genes *etgA*, *cesF*, *cesT*, *escD* y *map* (Figura 5) (Mellies *et al.*, 1999; Elliott *et al.*, 2000; Sperandio *et al.*, 2000; Bustamante *et al.*, 2001; Sanchez-SanMartin *et al.*, 2001; Haack *et al.*, 2003; Barba *et al.*, 2005; Yerushalmi *et al.*, 2014). Además de regular genes ubicados en el LEE, Ler también incrementa la transcripción de genes localizados fuera de ella, tales como: *espC*, situada en una segunda isla de patogenicidad de EPEC, que codifica para una proteína del mismo nombre y funciona como una enterotoxina (Elliott *et al.*, 2000); *rcaA* que codifica para un regulador positivo del antígeno capsular tipo I específico de grupo (Bingle *et al.*, 2014); y diversas proteínas Nle’s (Garcia-Angulo *et al.*, 2008; Holmes *et al.*, 2012).

El mecanismo que utiliza este regulador para incrementar la transcripción de sus genes blanco ha sido objeto de gran interés para diversos grupos de investigación. Hasta el momento no hay evidencia de que Ler interactúe con la maquinaria transcripcional para mejorar la expresión de los genes blanco, por lo que se descarta que esta proteína funcione como un activador transcripcional clásico. Más bien, diversos grupos coinciden en que Ler actúa como un desrepressor del silenciamiento transcripcional ejercido por el regulador global H-NS (Sperandio *et al.*, 2000; Bustamante *et al.*, 2001; Haack *et al.*, 2003). Ler no reconoce una secuencia consenso en el DNA, sólo se ha determinado que se une a secuencias ricas en A-T como lo hace H-NS (Haack *et al.*, 2003). De hecho, estudios con Ler de EPEC indican que esta proteína se une a las mismas regiones que H-NS, localizadas río arriba de los promotores *LEE2* y *LEE5*, desestabilizando los complejos nucleoproteicos formados por H-NS y exponiendo las secuencias promotoras de los operones para la transcripción (Bustamante *et al.*, 2001; Haack *et al.*, 2003). Esta función de Ler como antagonista de H-NS no aplica con todos los genes reprimidos por este represor, un análisis por microarreglos del transcriptoma de EPEC identificó que Ler solo es capaz de regular el 2% del genoma, lo que evidencia que funciona como un regulador específico de genes de -o asociados a virulencia, en lugar de un antagonista general de H-NS (Bingle *et al.*, 2014).

Dada la función central de Ler, su expresión está sujeta a la acción de diferentes reguladores. La transcripción del operón *LEE1* es controlada por reguladores positivos tales como: IHF, Fis, BipA, QseA, PerC, y GrlA (Figura 5) (Friedberg *et al.*, 1999; Mellies *et al.*, 1999; Sperandio *et al.*, 1999; Goldberg *et al.*, 2001; Grant *et al.*, 2003; Barba *et al.*, 2005; Islam *et al.*, 2011). Mientras que entre los reguladores negativos se encuentran H-NS, Hha y GrlR (Figura 5) (Umanski *et al.*, 2002; Deng *et al.*, 2004; Sharma and Zuerner, 2004).

Aunado a la acción de todos los reguladores sobre *LEE1*, Ler es capaz también de reprimir la expresión de este operón, es decir, funciona como un auto-regulador negativo con la finalidad de mantener su concentración a niveles

adecuados para los diferentes blancos que forman parte del regulón de Ler (Berdichevsky *et al.*, 2005).

1.4.2.2.2 El complejo regulador GrIR-GrIA

Un análisis sistemático de mutantes del LEE en *C. rodentium* realizado por Deng y cols., en el 2004, dio lugar a la identificación de GrIR y GrIA, proteínas codificadas en esta isla e involucradas también en la regulación transcripcional de los genes. GrIA fue identificada como un regulador positivo porque en una cepa mutante en el gen que codifica para esta proteína se observó una reducción drástica en la expresión de EspB y Tir, así como en la transcripción del operón *LEE1*. En contraste, en una cepa mutante en *grIR* se registró un incremento de la transcripción del mismo operón indicando que GrIR funciona como un modulador negativo. Más tarde, en nuestro grupo se demostró que estos genes se encuentran organizados conformando el operón *grIRA (LEE7)* (Barba *et al.*, 2005). También identificaron que GrIA activa directamente la expresión de *ler* porque contrarresta la represión ejercida por H-NS, a su vez, Ler activa la expresión del operón *grIRA* estableciendo un circuito regulador positivo que ha sido demostrado en *C. rodentium* y EPEC (Figura 5)(Barba *et al.*, 2005; Jimenez *et al.*, 2010).

Por otra parte, experimentos de interacción de 2 híbridos en levadura y análisis por cristalografía revelaron que GrIR interactúa consigo misma y con GrIA (Creasey *et al.*, 2003; Jobichen *et al.*, 2007; Padavannil *et al.*, 2013). Con base en tales datos, numerosos grupos han propuesto que la relevancia de dicha interacción es evitar que GrIA funcione como el activador de *ler*, es decir, GrIR actúa como un regulador negativo de los genes de la isla solo porque evita que GrIA active (Figura 5)(Creasey *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2004; Lio and Syu, 2004; Jobichen *et al.*, 2007; Padavannil *et al.*, 2013). Más adelante se discutirá tal mecanismo.

El complejo regulador GrIR/GrIA ha sido también involucrado en la regulación de la expresión de otros factores de virulencia codificados fuera de la isla LEE en EHEC, como el aparato flagelar y enterohemolisina (Iyoda *et al.*, 2006; Saitoh *et al.*, 2008).

1.4.2.3 Reguladores globales endógenos de *E. coli*

1.4.2.3.1 Proteínas asociadas al nucleóide (NAPs)

H-NS es una de las proteínas más abundantes de unión a DNA en *E. coli* con cerca de 20,000 copias por célula (Dorman, 2004). Esta proteína se encuentra en enterobacterias y especies relacionadas donde además de actuar como un remodelador del nucleóide bacteriano es también capaz de reconocer y silenciar selectivamente la expresión de DNA “extraño” con un contenido de A-T superior al del resto del genoma. Tal propiedad funcional ha distinguido a H-NS como un regulador universal de los determinantes de virulencia presentes en bacterias entéricas (Dorman, 2007; Navarre *et al.*, 2007).

Como ya se mencionó, la isla LEE al ser un determinante de virulencia es regulada por H-NS sobre la que ejerce un papel primordial en el silenciamiento de los operones de la isla (Figura 5) (Mellies *et al.*, 1999; Elliott *et al.*, 2000; Sperandio *et al.*, 2000; Bustamante *et al.*, 2001; Sanchez-SanMartin *et al.*, 2001; Haack *et al.*, 2003; Barba *et al.*, 2005). En EPEC, H-NS reprime la expresión del operón *LEE1* a 27°C pero no a 37°C; mientras que al resto de los operones la represión es ejercida en ambas temperaturas (Umanski *et al.*, 2002). Esto indica que cuando EPEC cambia de un ambiente de 27°C a 37°C, Ler es expresada y antagoniza la represión mediada por H-NS sobre los operones del LEE, desencadenando el proceso de formación de las lesiones AE (Umanski *et al.*, 2002). Respecto del mecanismo que H-NS emplea para silenciar los operones del LEE, estudios genéticos y bioquímicos indican que requiere unirse a regiones “río arriba” y “río abajo” de los promotores para formar un complejo núcleo-represor que podría atrapar (o no) a la RNA polimerasa. Este complejo es alterado cuando Ler se une la región “río arriba” del promotor favoreciendo, por lo consiguiente, la transcripción y expresión de los genes (Bustamante *et al.*, 2001; Haack *et al.*, 2003).

Otras NAPs han sido igualmente implicadas en la regulación del LEE, IHF (“Integration host factor”) se une a una región “río arriba” del promotor de *LEE1* favoreciendo el desplazamiento de H-NS y promoviendo la transcripción del operón, así como del resto de los genes LEE dependientes de Ler (Friedberg *et al.*, 1999).

Fis (“Factor for inversión stimulation”) actúa como un regulador positivo para la expresión de *ler* y del *LEE4* (Figura 5) (Goldberg *et al.*, 2001). En contraste, Hha (“High haemolysin activity”) se une a la región promotora de *LEE1* para reprimir su transcripción y mantener apagado, junto con H-NS, la isla LEE (Figura 5) (Sharma and Zuerner, 2004).

1.4.2.3.2 El sistema de percepción de quorum (“Quorum sensing”)

El sistema de percepción de quorum es un mecanismo de señalización célula-célula que se basa en la producción de componentes conocidos como autoinductores que permiten a la bacteria detectar su propia población, así como la de otras bacterias en un ambiente dado (Sperandio *et al.*, 2003). Este tipo de comunicación intercelular representa un mecanismo para la regulación de la expresión genética con la finalidad de que organismos unicelulares como *E. coli* lleguen a comportarse como organismos multicelulares. Muchos procesos importantes en diversas especies bacterianas son regulados por este sistema, algunos de éstos son: virulencia, producción de metabolitos secundarios, simbiosis, formación de biopelícula y esporulación (Azimi *et al.*, 2020).

La regulación por este mecanismo sobre la isla LEE en EPEC y EHEC fue inicialmente descrita por Sperandio y cols., en 1999. La transcripción de los genes del LEE es activada por la molécula bacteriana autoinductor-3 (AI-3), así como por las hormonas del hospedero epinefrina y norepinefrina presentes en el tracto gastrointestinal (Sircili *et al.*, 2004; Walters and Sperandio, 2006). En EPEC, la señal AI-3 es detectada a través de QseC, una proteína cinasa sensora que se autofosforila e inicia una cascada de señalización compleja que regula la expresión de genes involucrados en la formación de la lesión AE y del flagelo (Clarke and Sperandio, 2005a, b; Clarke *et al.*, 2006). QseC activa el sistema de 2 componentes QseEF y éste activa a la proteína QseA, un miembro de la familia LysR (Reading *et al.*, 2007). QseA tiene como destino final activar directamente la transcripción del operón *LEE1* (Figura 5) (Sharp and Sperandio, 2007).

1.4.2.3.3 La respuesta SOS

Las bacterias cuentan con un gran número de proteínas y sistemas específicos de reparación que ayudan a mantener la estructura correcta del DNA cromosomal, uno de estos sistemas es la respuesta SOS. Este mecanismo comprende más de 40 genes que codifican principalmente para proteínas involucradas en protección, reparación, replicación, mutagénesis y metabolismo del DNA (Maslowska *et al.*, 2019). Los factores capaces de inducir esta respuesta son: radiación por UV, metil metano sulfonato (MMS), mitomicina C, entre otros; provocando alteraciones en la replicación del DNA, división celular y la acumulación de DNA de cadena sencilla (Maslowska *et al.*, 2019). Interesantemente, existen varios reportes que evidencian la participación del sistema SOS en el control de fenotipos asociados a virulencia en patógenos Gram-positivos y Gram-negativos.

Mellies *et al.*, en el 2007b, demostraron en EPEC que los genes del LEE son regulados por la respuesta SOS en una manera dependiente de LexA y RecA. Específicamente la actividad transcripcional de los operones *LEE2* y *LEE3* se incrementa en la presencia de mitomicina C, el incremento es dependiente de la proteasa RecA que degrada al represor LexA cuando se une a una caja SOS localizada dentro de la región sobrelapante de los promotores *LEE2-LEE3* (Figura 5). En este mismo trabajo se identificó que la transcripción de *nleA*, un gen que codifica para un efector no codificado en LEE pero que es secretado por el SST3, se incrementa también por la activación de la respuesta SOS (Mellies *et al.*, 2007b).

1.4.2.3.4 Reguladores de resistencia al ácido

Los patógenos intestinales han tenido que evolucionar estrategias para sobrevivir al estrés que involucra el tránsito por el ambiente ácido del estómago y de esta manera establecer la infección en el nicho intestinal apropiado. Al respecto, con la finalidad de colonizar y causar las lesiones de adherencia y eliminación, los patógenos AE cuentan con mecanismos que le permiten resistir los cambios del pH durante el paso del estómago al intestino, a través de la coordinación de la expresión de sus genes de tolerancia al ácido y represión de sus genes de virulencia

con la finalidad de permanecer en el hospedero. En EPEC se ha reportado que la proteína GadX, un activador de genes involucrados en la tolerancia al ácido reprime la expresión del operón *perABC* ubicado en el plásmido EAF (Shin *et al.*, 2001). GadX se une a la región promotora de este operón para reprimirlo en un ambiente con pH ácido previniendo la adherencia localizada de EPEC y de manera indirecta la formación de la lesión AE a través de *LEE1* (Figura 5) (Shin *et al.*, 2001).

1.4.2.3.5 El sistema Cpx

Uno de los mecanismos que *E. coli* utiliza para monitorear y mantener la integridad de sus membranas es el sistema de respuesta a estrés de la envoltura celular conocido como Cpx (“Conjugative plasmid expression”) (Hunke *et al.*, 2011). Consiste de CpxA, una cinasa sensora unida a la membrana interna y CpxR, un regulador de respuesta situado en el citoplasma. En ausencia de estrés, la actividad de autocinasa de CpxA es inhibida por CpxP (proteína periplásmica). Ante situaciones que generan el estrés de la bacteria, CpxP es degradada y CpxA se autofosforila y fosforila a CpxR; éste a su vez regula una gran cantidad de genes involucrados en la regeneración de la envoltura celular, así como también reprime la expresión y ensamblaje de estructuras asociadas a virulencia (Hunke *et al.*, 2011).

El SST3 de EPEC es regulado negativamente por el sistema Cpx, una de las vías que utiliza es reprimir a nivel transcripcional la expresión de los operones *LEE4* y *LEE5* en una manera independiente de Ler (Figura 5) (MacRitchie *et al.*, 2008). Otra vía que emplea es bloqueando a nivel post-transcripcional el ensamblaje del translocón a través de la chaperona DegP, asegurando de esta forma la restauración de la integridad de las membranas de la bacteria ante situaciones adversas que podrían afectar la sobrevivencia de la bacteria (MacRitchie *et al.*, 2012).

1.4.2.4 Reguladores codificados en el plásmido EAF

1.4.2.4.1 PerC/Pch

Uno de los primeros elementos genéticos en identificarse y que se asoció a la regulación de los genes de virulencia en EPEC fue el operón *perABC* (Gomez-Duarte and Kaper, 1995; Tobe *et al.*, 1996). Consta de 3 genes: *perA* que codifica para una proteína del mismo nombre que pertenece a la familia de activadores transcripcionales AraC/XylS. PerA activa la expresión del operón *perABC* y del *bfp* (Tobe *et al.*, 1996; Martinez-Laguna *et al.*, 1999; Mellies *et al.*, 1999; Ibarra *et al.*, 2003). El producto de *perB* no ha sido caracterizado en detalle, pero se ha reportado que su mutación provoca un efecto de represión sobre la transcripción del operón *per* (Bustamante *et al.*, 2001). *perC* es el último gen en este operón y la proteína que codifica, PerC, es un activador transcripcional que elimina la represión por H-NS sobre el operón *LEE1* (Figura 5) (Gomez-Duarte and Kaper, 1995; Bustamante *et al.*, 2001; Bustamante *et al.*, 2011). En EPEC, PerC es también esencial para la adaptación a su hábitat debido a que controla la expresión de genes involucrados en la respiración anaeróbica, específicamente en la reducción de nitratos y nitritos (Mellies *et al.*, 2017).

PerC pertenece a la familia Pch ("*perC* homologue"), nombrada así debido a que homólogos de esta proteína han sido identificados en diferentes miembros de patógenos pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*. Es el caso de EHEC, en donde a pesar de no contener el plásmido EAF, posee 5 homólogos de PerC ubicados en regiones parecidas a profagos en el cromosoma. De éstos, sólo PchA, PchB y PchC son capaces de activar la expresión de los genes de la isla LEE a través del regulador Ler (Iyoda and Watanabe, 2004).

Por último, además del control a nivel transcripcional es importante comentar que existen numerosos reportes que resaltan la importancia de los mecanismos post-transcripcionales, traduccionales y post-traduccionales en el control de la expresión de los genes de la isla LEE, muchas de estas vías son ancestrales y se encuentran bastante conservadas con las *E. coli* no patógenas. Proteínas como CsrA, Hfq, ClpXP que controlan movilidad, metabolismo y adaptación a estrés en

las cepas no patógenas modulan las propiedades de virulencia codificadas en la isla LEE (Bhatt *et al.*, 2011). Por tanto, la capacidad de los patógenos AE para causar enfermedad no es exclusiva de elementos genéticos adquiridos por transferencia horizontal sino de la contribución y adaptación de factores nuevos y ancestrales que deben actuar en una manera espacio temporal estrictamente coordinada.

2. ANTECEDENTES

Los genes que codifican para los reguladores GrIR y GrIA están presentes en todos los patógenos AE. A nivel de la secuencia de aminoácidos muestran un alto grado de conservación entre ellos, GrIR de EPEC comparte una identidad del 83 % con la de *C. rodentium* y del 100% con EHEC, mientras que la de GrIA es del 91 % y 100%, respectivamente. Además, ortólogos de GrIA han sido también encontrados en otras bacterias que pertenecen principalmente a la familia *Enterobacteriaceae*, muchos de ellos son ORFs putativos que no han sido caracterizados hasta el momento. La única proteína descrita que muestra homología con GrIA es CaiF, un activador transcripcional de los operones *cai* y *fix* involucrados en el metabolismo de carnitina en *E. coli*, con quien comparte 23% de identidad en el dominio de unión a DNA (Deng *et al.*, 2004; Jimenez *et al.*, 2010).

Mediante una búsqueda en la base de datos del NCBI, se identificaron homólogos de GrIR en diversas especies de los géneros: *Salmonella*, *Proteus*, *Morganella*, *Serratia*, *Klebsiella*, entre otros; con quienes comparte entre 30 al 42% de identidad y del 50 al 60% de similitud; sin embargo, estos ortólogos de GrIR son también proteínas hipotéticas con ninguna función asignada hasta el momento.

GrIR de EPEC es una proteína de 123 aminoácidos con una masa molecular de 13.9 kDa y un pI de 4.77. Un trabajo publicado en el 2007 reveló la estructura cristalográfica de esta proteína de EHEC, consiste de un barril-beta (comprende del aminoácido 5 al 107), formado por 8 cadenas beta anti-paralelas que generan una cavidad hidrofóbica y una estructura parecida a un “enchufe o clavija” ubicada en un extremo del barril (Figura 6A y 6B) (Jobichen *et al.*, 2007). En este mismo estudio identificaron que GrIR se encuentra como homodímero en solución, con una masa molecular de 29 kDa, su estructura homodimérica es mantenida por las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos isoleucina 7, 23 y 25, valina 39 e isoleucina 107 de ambos monómeros, así como por numerosas interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno que mantienen la arquitectura del dímero (Figura 6A y 6C). Un dominio importante para la función de GrIR fue localizado hacia su extremo amino, comprende del residuo glutámico 46 al aspártico 49 (⁴⁶EDED⁴⁹) (Figura 6A),

se propone que este dominio es esencial para su función como represor de los genes *LEE* y, por ende, para la interacción con GrIA (Jobichen *et al.*, 2007).

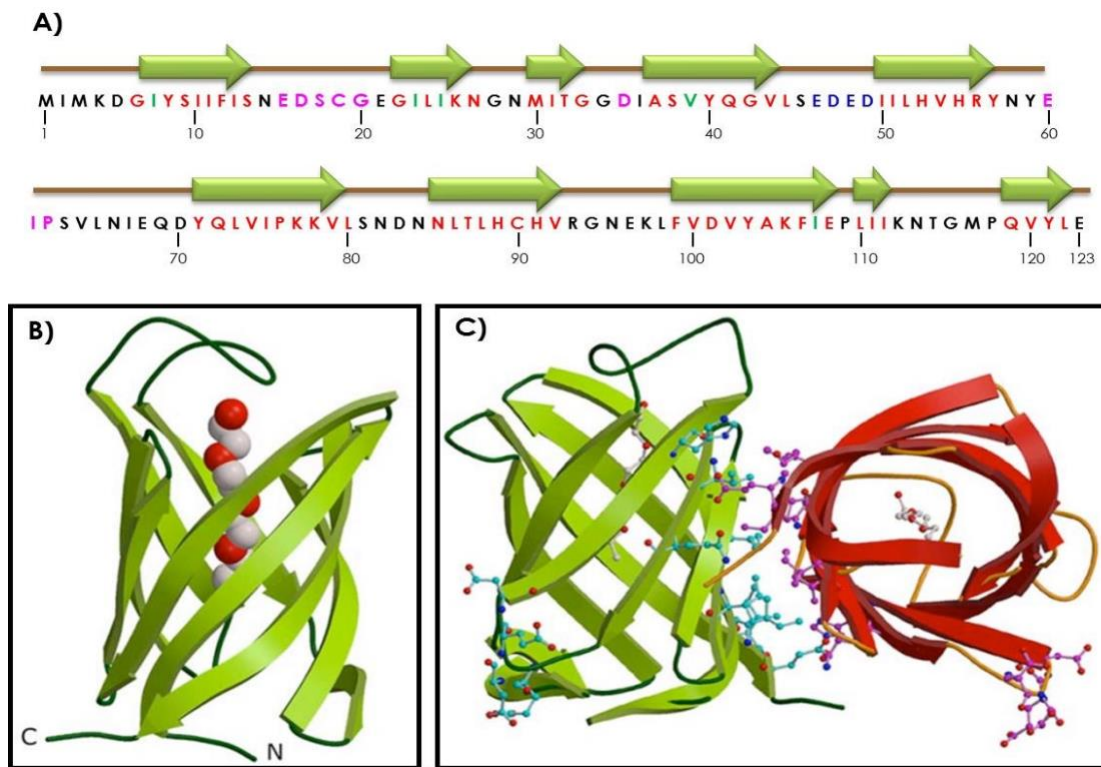


Figura 6. Estructura de GrIR. A) Estructura secundaria y aminoácidos importantes de GrIR. Letras en rojo representan los aminoácidos que forman las láminas beta (indicadas con flechas), en azul el motivo EDED, en verde aminoácidos implicados en la homodimerización y en rosa residuos involucrados en la heterodimerización con GrIA (Jobichen *et al.*, 2007; Padavannil *et al.*, 2013). Basado en el programa PSIPRED. B) Diagrama de listones del monómero de GrIR. En la cavidad del barril-beta se observa una molécula de tritón X100 con el que fue cristalizada la proteína (Jobichen *et al.*, 2007). C) Diagrama de listones del homodímero de GrIR. Monómero 1 es mostrado en verde y 2 en rojo. Los residuos que participan en la homodimerización y que forman el motivo EDED de ambos monómeros son indicados (Jobichen *et al.*, 2007).

Por otra parte, la caracterización funcional de GrIA mediante análisis genéticos y bioquímicos han permitido la identificación de un motivo HTH (“Helix-Turn-Helix”) ubicado en el extremo amino y una región localizada hacia el carboxilo terminal indispensables para su función como activador transcripcional (Jimenez *et al.*, 2010; Padavannil *et al.*, 2013). Mientras que los sitios requeridos para la heterodimerización con GrIR se encuentran en el extremo amino de la proteína empalmado con el sitio de unión a DNA, aunque también se propone que existen

regiones importantes ubicadas en la región carboxilo terminal de GrIA (Jimenez *et al.*, 2010; Padavannil *et al.*, 2013).

En la actualidad, el complejo formado entre GrIR y GrIA ha sido evidenciado por diferentes técnicas (Creasey *et al.*, 2003; Jobichen *et al.*, 2007; Jimenez *et al.*, 2010). Padavannil *et al.*, en el 2013, identificaron la estructura de este complejo mediante técnicas cristalográficas, consiste en un dímero de GrIR unido a un monómero de GrIA (Figura 7) mediante 15 puentes de hidrógeno. La complementación de tales datos con análisis por ultracentrifugación permitió confirmar que la estequiometría del complejo GrIR:GrIA comprende 2 moléculas de GrIR y 1 de GrIA con una masa molecular de 47.3 kDa. Asimismo, identificaron que residuos de aminoácidos ubicados en el extremo amino terminal de GrIR (E16, D17, S18, C19, G20, D35, E60, L61 y P62) hacen contacto con residuos que forman parte del HTH de GrIA. En concordancia con estas observaciones, mutantes en los residuos W31, I44, F48 y I50 de GrIA son incapaces de interactuar con GrIR y de activar la expresión de *ler* (Jimenez *et al.*, 2010). Ante tales hallazgos, se propone que el dímero de GrIR y el DNA de las regiones promotoras de los blancos que regula GrIA compiten por el motivo HTH, por lo que ante la formación del complejo GrIR-GrIA la función del activador es inhibida (Padavannil *et al.*, 2013).

La expresión de este sistema regulador GrIR-GrIA y las condiciones en las que cada uno de ellos ejerce su efecto son aún poco entendidas. Se ha descrito que el complejo ClpXP, un sistema de proteólisis, controla positivamente la expresión del SST3 en EHEC a través de la regulación directa de los niveles de GrIR durante la fase estacionaria de crecimiento (Iyoda and Watanabe, 2005). Otro trabajo involucra a Hfq, una chaperona de RNA, junto con los RNA's pequeños MgrR, RyhB y McaS, los cuales modulan negativamente la expresión de los genes de la isla LEE en EPEC. Dicho efecto es ejercido a nivel post-transcripcional desestabilizando el mRNA *grlRA*, y como consecuencia la expresión de las proteínas GrIR y GrIA (Hansen and Kaper, 2009; Bhatt *et al.*, 2017). Esto evidentemente representa otro nivel de regulación al que están sujetos estas proteínas de la isla LEE lo que genera

una mayor complejidad en la red de regulación de los genes de virulencia de los patógenos AE.

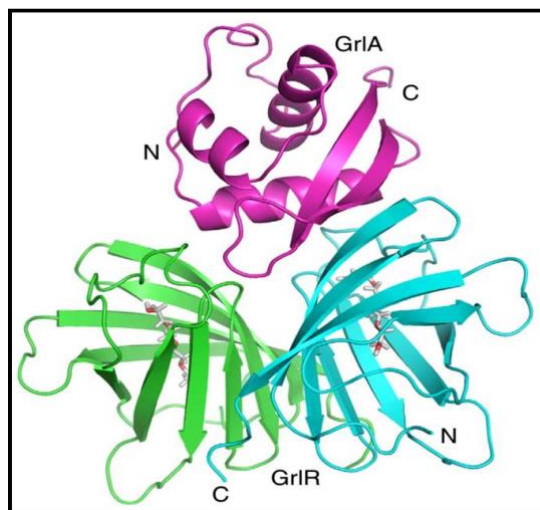


Figura 7. Estructura del complejo heterotrimérico GrIR₂-GrIA. Diagrama de listones del complejo GrIR₂-GrIA, los 2 monómeros de GrIR se muestran en verde y cian. La estructura de GrIA, representada en rosa, comprende del aminoácido 9 al 125 (Padavannil *et al.*, 2013).

Por lo anterior, el mecanismo molecular de la regulación de los genes del LEE mediada por el sistema GrIR/GrIA bajo diferentes condiciones ambientales, es todavía bastante complejo, por lo que se requiere de estudios más detallados que permitan determinar la dinámica que se establece entre estas dos proteínas para activarlos o reprimirlos. En este trabajo, nuestro interés fue investigar la vía que utiliza GrIR para reprimir y el papel que juega la interacción con GrIA en su función como regulador negativo de los genes de la isla LEE.

3. HIPÓTESIS

GrIR modula negativamente la expresión de los genes de la isla LEE a través de la interacción específica con el activador GrIA, inhibiendo la capacidad de GrIA de activar a *Ier*.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Estudiar la regulación de los factores de virulencia en organismos enteropatógenos que desarrollan la lesión de adherencia y destrucción.

4.2 Objetivos particulares

4.2.1 Determinar el mecanismo molecular mediante el cual GrIR regula negativamente la expresión de los genes de la isla de patogenicidad LEE en EPEC.

4.2.2 Caracterizar la interacción entre GrIR y GrIA.

4.3 Objetivos específicos

4.3.1 Definir si GrIR modula negativamente la expresión de los genes del LEE a través de la interacción con GrIA o directamente sobre los genes blanco.

4.3.2 Definir el dominio mínimo y los residuos críticos involucrados en la regulación negativa.

4.3.3 Definir el dominio mínimo y los residuos críticos necesarios para la interacción con GrIA y consigo misma.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

En la tabla 2 se describen las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este estudio. Las bacterias se cultivaron de forma rutinaria en medio Luria-Bertani (LB) (peptona de caseína 10g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l), y en medio de cultivo para células eucariotas DMEM (Gibco-BRL Life Technologies), que contiene glucosa (0.45% [w/v]), L-glutamina (584 mg/l); sin piruvato de sodio, suplementado con 1% de LB y 160 µl de fosfato de piridoxal (25 mg/ml). Según fuera el caso, se adicionaron antibióticos a las siguientes concentraciones: ácido nalidíxico (15 µg/ml), kanamicina (30 µg/ml), ampicilina (100 µg/ml), tetraciclina (12 µg/ml), estreptomina (100 µg/ml) o cloranfenicol (25 µg/ml).

Las bacterias se crecieron en condiciones de agitación en una incubadora orbital (Giromax 929, Amerex Instruments) a 210 rpm y en condiciones estáticas en una estufa con 5% de CO₂. Para los ensayos en esta última condición, los medios DME o LB se pre-equilibraron durante toda la noche a 37°C con 5% de CO₂.

5.2 Manipulaciones de DNA

Las manipulaciones del DNA se realizaron de acuerdo a protocolos estándar de biología molecular (Sambrook and Russell, 2001). Se utilizaron las enzimas de New England Biolabs e Invitrogen de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos utilizados en ensayos de PCR, indicados en la tabla 3, se sintetizaron en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de 100 y 50 µl con *Taq* Platinum Polimerasa (Invitrogen).

5.3 Construcción de plásmidos

Para construir el plásmido pT3GrIR, se amplificó por PCR una secuencia de DNA incluyendo un sitio de unión a ribosoma junto con la región codificante de *grIR*, utilizando el par de oligonucleótidos GREPKE-F/GREPX-R. El producto obtenido se digirió con las enzimas *KpnI-XhoI* y ligó al vector pMPM-T3, previamente digerido.

Para generar los plásmidos pT3GrIRA, pT3GrIRA/I44A y pT3GrIRA/R54A, se amplificaron fragmentos por PCR con los oligonucleótidos XHINTERGRLAF/HIGRLAR, utilizando como molde los plásmidos pTEPGrIA1, pTEPGrIA1/I44A y pTEPGrIA1/R54A (Jimenez *et al.*, 2010), respectivamente. Los productos obtenidos se digirieron con las enzimas *XhoI-HindIII* y clonados en el plásmido pT3GrIR.

El plásmido pDnaK-CAT se generó amplificando por PCR un fragmento que comprende de la posición -394 a +127 del sitio de inicio de la transcripción del gen *dnaK*, utilizando los oligonucleótidos DnaKF/DnaKR, a partir de DNA cromosomal. El producto se digirió con las enzimas *BamHI-HindIII* y clonado en el vector pKK232-8 (Pharmacia Biotech), previamente digerido con las mismas enzimas.

Para generar el plásmido pETGrIR se amplificó la región estructural de *grlR* con los oligonucleótidos GRLRND-Fw/GREPX-R utilizando como molde DNA cromosomal, el fragmento se digirió con las enzimas *NdeI-XhoI* y ligado en el vector pET-28a (+) (Novagen).

El plásmido pGST-GrIR se generó amplificando la región estructural de *grlR* con los oligonucleótidos EP-GRLRBHF/GREPX-R utilizando como molde DNA cromosomal, el fragmento se digirió con las enzimas *BamHI-XhoI* y ligado en fase en el 3' de *gst* en el vector pGEX-4T1 (GE Healthcare life sciences), previamente digerido con las mismas enzimas.

El plásmido pSR659-GrIR se generó mediante la liberación del fragmento de *grlR* del pGST-GrIR con las enzimas *BamHI-XhoI* y ligado en el vector pSR659 (Dmitrova *et al.*, 1998), digerido con las mismas enzimas.

DNA de la cepa de EPEC E2348/69 se empleó como molde para las reacciones de PCR. Todos los plásmidos generados se verificaron por secuenciación de DNA y evaluados en su capacidad de complementar la mutantes correspondientes a través de un perfil de proteínas secretadas o por Western blot contra proteínas de virulencia.

5.4 Construcción de la cepa EPEC *grlR*::FLAG

La construcción de esta cepa que contiene una etiqueta en *grlR* con el epítipo de FLAG, a nivel cromosomal, se realizó de acuerdo con protocolos descritos previamente (Datsenko and Wanner, 2000; Uzzau *et al.*, 2001). Para marcar cromosomalmente a *grlR* con la secuencia de DNA que codifica el triple epítipo de FLAG, se diseñaron los oligonucleótidos *grlR*-FLAGH1P1 y *grlR*-FLAGH2P2 que amplifican parte de la región estructural de *grlR* sin el codón de paro seguido de la secuencia codificante para el triple epítipo de FLAG. El plásmido pSUB11 se utilizó como molde para amplificar el producto de PCR, los fragmentos se transformaron por electroporación en la cepa EPEC silvestre con el pKD46 para generar la cepa EPEC *grlR*::FLAG. La mutación se verificó mediante PCR y secuenciación.

5.5 Construcción de mutantes de GrIR por eliminaciones

Para generar las proteínas mutantes GST-GrIR/1-60 y GST-GrIR/61-123 se diseñaron los oligonucleótidos EP-GRLRBHF/GR1M-XR para amplificar un fragmento de la región estructural de *grlR* que incluye los primeros 180 nucleótidos (codifican para los aminoácidos 1 al 60), y otro par de oligonucleótidos EPGR2MB-F/EP-GRLRXHR para generar una región que comprende los últimos 189 nucleótidos de *grlR* (codifican para los aminoácidos 61 al 123), respectivamente; utilizando como molde el pGST-GrIR. Los productos se cortaron con las enzimas *Bam*HI-*Xho*I y se ligaron en fase en el 3' del gen *gst* en el vector pGEX-4T1, digerido con las mismas enzimas.

Para generar las proteínas mutantes con eliminaciones de 20 aminoácidos de GrIR, se realizaron una serie de PCR's sobrelapados empleando como molde el pT3GrIR. Para esto, se realizaron 2 reacciones de PCR por separado para las mutantes GrIR Δ 21-40, GrIR Δ 41-60, GrIR Δ 61-80 y GrIR Δ 81-100 con los siguientes pares de oligonucleótidos: R21-40Fw/pMPM3-RV y pMPM-FW/R21-40RV; R41-60Fw/pMPM3-RV y pMPM-FW/R41-60RV; R61-80Fw/pMPM3-RV y pMPM-FW/R61-80RV; R81-100Fw/pMPM3-RV y pMPM-FW/R81-100RV;

respectivamente. Una tercera PCR se realizó para cada mutante empleando como molde los 2 fragmentos obtenidos en las reacciones previas de PCR usando los oligonucleótidos GREPKE-F/GREPX-R.

Las proteínas mutantes GrIR Δ 1-20 y GrIR Δ 101-123 se construyeron mediante la amplificación por PCR empleando los siguientes pares de oligos: EP-1-20F/GREPX-R y GREPKE-F/EPR123-RV, respectivamente. Los fragmentos finales obtenidos se digirieron con las enzimas *KpnI-XhoI* y ligados en el vector pMPM-T3 cortado con las mismas enzimas.

Las proteínas mutantes con eliminaciones de 20 aminoácidos de GrIR se fusionaron a la proteína glutatión-S-transferasa (GST), para esto, las secuencias que codifican para cada una de estas proteínas clonadas en el pMPM-T3, se digirieron con las enzimas *EcoRI/XhoI* y ligadas en fase en el extremo 3' de *gst* en el vector pGEX-4T1, previamente cortado con las mismas enzimas.

Todos los fragmentos de DNA clonados se verificaron por secuenciación de DNA en la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

5.6 Determinación de la actividad de la enzima cloranfenicol acetil transferasa (CAT)

La determinación de la actividad de las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* se realizó como se describió previamente (Martinez-Laguna *et al.*, 1999). Las cepas con los plásmidos se cultivaron en 5 ml de LB adicionado con antibióticos y se incubaron en agitación a 37°C toda la noche. Al día siguiente, los cultivos se ajustaron a una DO₆₀₀= 1.0 con regulador salino de fosfatos (PBS) 1X (Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, NaCl 137 mM y KCl 2.7 mM), posteriormente se adicionó 1 ml a 50 ml de los medios LB o DMEM suplementados con antibióticos. Los cultivos inoculados se incubaron a 37°C en agitación o estático con 5% de CO₂. Se tomaron alícuotas de 1 ml a DO₆₀₀= 0.8 y 1.0, las células se centrifugaron a 14,000 rpm durante 2 minutos. Los extractos crudos se prepararon lavando las bacterias en amortiguador TDTT (Tris-HCl 50 mM pH 7.8 y ditiotreitól 30 μ M). Posteriormente, se resuspendieron en 0.5 ml del mismo amortiguador y se lisaron

por sonicación por 5 minutos con pulsos de 10 s por 5 s de descanso. Los extractos solubles se separaron de restos celulares por centrifugación a 12,000 rpm durante 20 min a 4°C.

La concentración de proteínas se determinó con el estuche comercial “BCA Protein Assay Kit” (Pierce), para esto, alícuotas de 10 µl de cada extracto se colocaron por duplicado en una placa de 96 pozos y se adicionaron 200 µl de la mezcla de reacción (25 ml de la solución A + 500 µl de la solución B). Posteriormente se incubó a 37°C por 30 minutos. La lectura de la absorbancia se realizó a una longitud de onda de 562 nm utilizando un lector automático para microplacas CERES 900 C y el programa KC3.

La actividad de CAT se determinó de la siguiente manera: alícuotas de 5 µl de cada extracto se adicionaron por duplicado a una placa de microtitulación de 96 pozos y se ensayaron por la adición de 200 µl de la mezcla de reacción conteniendo: DTNB (Research Organics) 1 mM, Tris-HCl 0.1 M pH 7.8, acetil-CoA (Pharmacia LKB Biotech Inc. Alameda, CA) 0.1 mM y cloranfenicol 0.1 mM (Sigma Chemical Co). Los cambios en la absorbancia a 410 nm se midieron cada 5 s durante 5 minutos de reacción con un lector automático de barrido para microplacas, tipo CERES 900C y el programa KC3 posicionado en modo de cinética. Una curva estándar (de 0 a 2500 U/ml) de cloranfenicol acetil transferasa se usó para interpolar las actividades de cada muestra.

La actividad específica de CAT se obtuvo dividiendo la actividad de CAT entre la concentración de proteína de cada extracto y se expresó como µmol/mg/min.

5.7 Expresión y purificación de 6XH-GrIR

El plásmido pETGrIR se introdujo por electroporación en la cepa BL21 (DE3), la cepa resultante se cultivó en 5 ml de LB suplementado con antibióticos en agitación a 37°C toda la noche. Del cultivo de toda la noche se inoculó en una proporción de 1:100 a un matraz con 100 ml de LB con antibióticos y se incubó en agitación a 37°C en agitación. Cuando el cultivo llegó a una $DO_{600} = 0.6$, se agregó 1 mM de IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) y se dejó cultivar por 3 horas

más. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 6000 rpm durante 10 minutos a 4°C, las células se resuspendieron en 5 ml de regulador de unión (fosfato de sodio monobásico 20 mM y NaCl 0.5 M; pH 7.4) y se guardaron a -70°C toda la noche. Al día siguiente, las células se lisaron por cavitación por 15 minutos con pulsos de 10 s por 10 s de descanso y se centrifugaron a 12,000 rpm durante 20 minutos a 4°C para obtener la fracción soluble, la cual fue filtrada con una membrana de 0.22 µm (Millipore).

La proteína 6XH-GrlR se purificó por cromatografía de afinidad de manera automatizada en un minicromatógrafo Äktaprime (Amersham-Pharmacia-Biotech), empleando una columna “HiTrap Chelating HP” de 5 ml (Amersham-Pharmacia-Biotech). De manera general, el proceso de purificación se realizó como sigue: el extracto celular se inyectó en la columna a un flujo de 200 µl/min, la columna se lavó con 200 ml del regulador de unión a un flujo de 1 ml/min. Posterior a esto, se realizó la elución de la proteína unida a la columna utilizando un gradiente de 0-100% con 190 ml del regulador de elución (fosfato de sodio monobásico 20 mM, NaCl 0.5 M e Imidazol 0.5 M; pH 7.4) a un flujo de 1 ml/min.

Las fracciones más concentradas se alicuotaron y almacenaron inmediatamente a -70°C. La proteína purificada y los extractos se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 15% y fueron visualizadas por la tinción con azul de Coomassie.

La concentración de la proteína se determinó por la técnica de Bradford comparando con una curva de concentración con albúmina sérica bovina (BSA) (Pierce).

5.8 Generación de anticuerpos contra GrlR

Dos conejos de la raza New Zealand se inmunizaron con 1000 µg de la proteína 6XH-GrlR siguiendo un esquema de 2 veces por semana durante 1 mes. De manera conjunta, se le realizó un seguimiento de la producción de anticuerpos por la técnica de ELISA. Al término del mes, se extrajo la sangre de los conejos y

se obtuvo el suero. La eficiencia del anticuerpo obtenido se analizó por la capacidad para reconocer a la proteína GrIR en ensayos tipo Western blot.

5.9 Detección de proteínas por Western blot

Las bacterias se cultivaron en 5 ml de medio LB con los antibióticos requeridos a 37°C toda la noche. Al día siguiente se inocularon en una proporción de 1:100 a un matraz con 50 ml de DMEM o LB, según fuera el caso, en condiciones de agitación o estático hasta que alcanzaron una $DO_{600} = 1.0$. Se tomaron 3 ml y las células se centrifugaron a 14,000 rpm durante 2 minutos. Las pastillas se resuspendieron en 500 µl de urea 8M y se lisaron por cavitación por 5 minutos con pulsos de 10 s por 5 s de descanso. Alícuotas de extractos totales se mezclaron con buffer de corrimiento para proteínas al 1X (glicerol 12.5%, SDS 1%, β-mercaptoetanol 357 mM, Tris-HCl 25 mM pH 6.8 y azul de bromofenol 0.05%), se hirvieron durante 5 minutos y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes. Posteriormente se realizó la transferencia a una membrana de PVDF con poros de 0.45 µm (Millipore) en una cámara de transferencia semi-seca (BioRad).

La membrana se bloqueó con leche descremada (Svelty) al 10% en regulador PBST (PBS 1X, NaCl 1M y Tween 20 0.05%), durante toda la noche a 4°C. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos con el regulador PBST y se incubó con alguno de los siguientes anticuerpos primarios: anti-GrIR (1: 4,000, este trabajo), anti-Tir (1:10,000, donado por el Dr. BB. Finlay de University of British Columbia), anti-Intimina (1:7,500, donado por el Dr. J.A. Girón de University of Virginia), anti-EspB (1:10,000, donado por el Dr. BB. Finlay de University of British Columbia), anti-EspA (1:20,000, donado por el Dr. J. Kaper de University of Maryland), anti-EscJ (1:10,000, donado por la Dra. Bertha González P del I. Fisiología UNAM), anti-GST (1:5,000, Pierce), anti-Flag (1:2500, Sigma), anti-MBP (1:15,000, New England Biolabs) y anti-DnaK (1:20,000, Invitrogen); por 4 horas a temperatura ambiente en agitación. La membrana se lavó nuevamente 3 veces por 10 minutos con PBST y se incubó con una dilución 1:10,000 del anticuerpo secundario (anti-conejo o anti-

ratón) acoplado a peroxidasa (Pierce), por 1 hora a temperatura ambiente en agitación, finalmente se procedió a lavar la membrana 3 veces con PBST. El revelado de la membrana se realizó con el estuche comercial “Western Lightning Chemiluminiscense Reagent Plus” (Perkin Elmer) y se expuso en películas fotográficas (Kodak) a diferentes tiempos.

5.10 Ensayo de proteínas secretadas

Las proteínas secretadas se analizaron como se describió previamente (Deng *et al.*, 2003). Para esto, las cepas bacterianas se cultivaron en placas con agar LB con los antibióticos requeridos, de este cultivo una colonia se inoculó en 5 ml de LB suplementado con antibióticos e incubada a 37°C toda la noche. Del cultivo de toda la noche, se inoculó en una proporción 1:100 en 50 ml de los medios DMEM o LB suplementado con antibióticos apropiados. Los cultivos bacterianos se incubaron a 37°C en condiciones de agitación o estático, a $DO_{600}=1.0$ se recolectaron 1.5 ml por triplicado y se sometieron a centrifugación a 14,000 rpm durante 5 minutos. A 1.3 ml de cada sobrenadante se le agregaron 160 μ L de ácido tricloroacético al 100% y se dejaron precipitar las proteínas a 4°C toda la noche. Posteriormente, las proteínas se concentraron por centrifugación a 14,000 rpm durante 30 minutos y se resuspendieron en 10 μ l de amortiguador de corrimiento para proteínas al 1X, para neutralizar el pH se agregó 1 o 2 μ l de Tris-HCl 2M pH 11. Las proteínas presentes en las muestras por triplicado se mezclaron en un tubo, hervidas por 5 minutos y separadas por SDS-PAGE al 15%. Finalmente, las proteínas secretadas por EPEC se visualizaron por la tinción con azul de Coomassie.

5.11 Ensayos de “Pull-down” para evaluar interacción proteína-proteína

Las cepas BL21 (DE3) transformadas con los plásmidos pGST-GrlR y sus derivados que codifican para las proteínas mutantes de GrlR; además de pGEX-4T1, pMBP-GrlA, pMBP-GrlA/R54A, pMBP-GrlA/I44A, pMAL-c2Xa, pBAD-Ler, pBAD-HNS-FLAGHis₆ y pMDStpA; se cultivaron en 50 ml de medio LB

suplementado con antibióticos a 37°C en agitación. A una $DO_{600} = 0.6$ se agregó 0.3, 0.5 y 1 mM de IPTG, a los cultivos con las construcciones derivadas del pMALc2x, pGEX-4T1 y con el plásmido pMDStpA, respectivamente. A los cultivos de las cepas con los plásmidos pBAD-Ler y pBAD-HNS se les agregó 0.1% de L-arabinosa. Los cultivos se dejaron incubar por 4 horas más con agitación a 37°C. Posteriormente las bacterias se concentraron por centrifugación a 6000 rpm durante 15 minutos a 4°C, las pastillas se lavaron con 20 ml de PBS 1X frío y se centrifugaron nuevamente en las mismas condiciones. Las bacterias se resuspendieron en 4 ml de PBS 1X frío y se lisaron por sonicación por 10 minutos con pulsos de 10 s alternando con 10 s de descanso. Los extractos solubles se obtuvieron mediante centrifugación a 12,000 rpm por 20 minutos a 4°C.

Las resinas utilizadas fueron glutatión sefarosa 4B (Amersham) y amilosa (New England Biolabs), 1 ml de cada resina se centrifugó a 7000 rpm a 4°C por 1 minuto, se desechó el sobrenadante y se realizaron 4 lavados con 1 ml de PBS 1X frío concentrando por centrifugación en las mismas condiciones, las resinas se resuspendieron en 1 ml de PBS 1X para su uso.

Para realizar el “pull-down” utilizando la resina de glutatión, 400 μ l de los extractos proteicos solubles conteniendo las proteínas sobre expresadas fusionadas a GST se mezclaron con 50 μ l de la resina de glutatión e incubados a 4°C por 2 horas con agitación. Después de la incubación se centrifugaron a 7000 rpm por 1 min a 4°C, la resina con las proteínas unidas se lavó 4 veces con PBS 1X frío para eliminar las interacciones inespecíficas. Las mismas condiciones se utilizaron cuando se empleó la resina de amilosa pero se incubó con extractos proteicos sobre expresando a las proteínas MBP-GrlA o MBP.

Las resinas con las proteínas unidas fusionadas a GST o MBP se incubaron con 800 μ l de los extractos celulares sobre expresando las proteínas blanco de interacción, por 4 horas a 4°C con agitación. Posteriormente se realizaron 5 lavados con PBS 1X frío y las resinas con el complejo proteico se resuspendieron en amortiguador de corrimiento para proteínas al 2X, se hirvieron durante 5 minutos y

se separaron por SDS-PAGE al 15%. Las interacciones proteína-proteína se visualizaron por tinción con azul de Coomassie o por Western blot.

5.12 Ensayo de 2 híbridos en bacterias basado en LexA

La interacción entre GrIR y GrIA también se analizó mediante el sistema de 2 híbridos en bacterias basado en LexA de acuerdo con el protocolo previamente reportado (Dmitrova *et al.*, 1998). Para esto, la cepa SU202 utilizada para evaluar heterodimerización se transformó con los plásmidos pSR659-GrIR y pSR660-GrIA. Como control positivo se transformó con los plásmidos pSR658-Ler y pSR659-Ler; como control negativo pSR658-PerA y pSR659-PerA, además de los vectores pSR658 y pSR659.

Las cepas con los plásmidos se crecieron en 5 ml de medio LB suplementado con antibióticos a 37°C en agitación durante toda la noche. De este cultivo, se inocularon 2 ml a 30 ml de medio LB o DMEM con los antibióticos requeridos y se agregó 0.16 mM de IPTG. Los cultivos bacterianos se dejaron crecer en agitación a 37°C hasta que alcanzaron una $DO_{600} = 1.0$, se tomaron alícuotas de 1 ml y se analizaron para cuantificar la actividad de la enzima β -galactosidasa, la cual se realizó conforme a lo descrito previamente (Oropeza *et al.*, 1999).

5.13 Identificación de complejos proteicos por electroforesis en geles nativos

Las cepas E2348/69 *grlR::FLAG*, *grlA::FLAG*, Δ *grlR grlA::FLAG*, Δ *grlA grlR::FLAG*, Δ *grlR* y Δ *grlA* transformadas según fuera el caso con pT3GrIA1/I44A o pT3GrIA1/R54A; se cultivaron en 5 ml de medio LB adicionado con antibióticos durante toda la noche. Al día siguiente, 0.5 ml de estos cultivos se inocularon en 20 ml de los medios DME y LB suplementados con antibióticos y se dejaron crecer a 37°C en agitación. Cuando alcanzaron una $DO_{600} = 1.0$, se tomaron 5 ml de cada cultivo y las células se concentraron por centrifugación a 10,000 rpm a 4°C, resuspendidas en 500 μ l del mismo medio y lisadas por sonicación por 10 minutos con pulsos de 10 s alternando con 5 s de descanso. Los extractos se

resuspendieron en regulador de corrimiento para proteínas no desnaturante 1X (glicerol 12.5%, Tris-HCl 25 mM pH 6.8 y azul de bromofenol 0.05%) y separados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% a 4°C en condiciones no desnaturantes. El gel se transfirió a una membrana de PVDF con poros de 0.45 µm (Millipore) y procesada para Western blot.

5.14 Ensayo de cambio de la movilidad electroforética (EMSA)

Fragmentos de DNA que abarcan las regiones reguladoras de los genes *ler*, *sepZ11*, *grlR*, y *tir* se amplificaron con los oligonucleótidos pKK-8-BH1F y pKK-8-H3R, usando como molde los plásmidos p_{ler}-1179, pSepZ-11, pGrlRA-1 y pTIR394, respectivamente. Al mismo tiempo, el fragmento *sepZ11* se marcó radioactivamente durante la reacción de amplificación usando los mismos oligonucleótidos pero con ³²P en su extremo 5´.

Los productos de PCR (150 ng) se incubaron con concentraciones crecientes de la proteína 6XH-GrlR en un volumen de 20 µl a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se probaron 3 diferentes reguladores de unión: regulador 1 (Tris-HCl 8 mM pH 7.9, MgSO₄ 40 mM, CaCl₂ 4 mM, KCl 40 mM, EDTA 2 mM pH 8.0 y glicerol 5%), regulador 2 (Tris-HCl 2 mM pH 8.0, EDTA 0.04 mM, NaCl 5 mM, MgCl₂ 0.1 mM, DTT 0.01 mM y glicerol 1.25%) y regulador 3 (HEPES 40 mM, MgCl₂ 8 mM, KCl 50 mM, DTT 1 mM, NP40 0.05% y BSA 0.1 mg/ml); estas soluciones han sido utilizadas previamente para evaluar la actividad de unión a DNA de las proteínas PerA, LeuO y H-NS, respectivamente (Bustamante *et al.*, 2001; Ibarra *et al.*, 2003; Guadarrama *et al.*, 2014).

Las mezclas de reacción se cargaron en geles de poliacrilamida al 6% en condiciones nativas usando el buffer Tris-boratos-EDTA (TBE) al 0.5X. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Alpha-Imager). Los fragmentos marcados radioactivamente se analizaron mediante la exposición a películas fotográficas (Kodak).

Tabla 2. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo

Cepas o Plásmidos	Características	Referencia
Cepas de EPEC		
E2348/69	EPEC, O127:H6	J.B. Kaper
EPEC Δler	E2348/69 Δ ler::Km; Nal ^R Km ^R	(Bustamante <i>et al.</i> , 2001)
EPEC ΔgrlR	E2348/69 Δ grlR; Nal ^R	Huerta-Saquero, A.
EPEC ΔgrlA	E2348/69 Δ grlA::Km; Nal ^R Km ^R	Huerta-Saquero, A.
EPEC ΔgrlRA	E2348/69 Δ grlRA::Km; Nal ^R Km ^R	Huerta-Saquero, A.
EPEC Δhns	E2348/69 Δ hns::Km; Nal ^R Km ^R	Huerta-Saquero, A.
EPEC ΔgrlRΔhns	E2348/69 Δ hns::Km Δ grlR; Nal ^R Km ^R	Huerta-Saquero, A.
EPEC ΔgrlRΔler	E2348/69 Δ ler::Km Δ grlR; Nal ^R Km ^R	Huerta-Saquero, A.
JPEP27	EPEC <i>ler</i> ::3XFLAG-kan; St ^R Km ^R	(Bustamante <i>et al.</i> , 2011)
EPEC <i>grlR</i>::FLAG	EPEC <i>grlR</i> ::3XFLAG-kan; St ^R Km ^R	Este estudio
JPEP29	EPEC <i>grlA</i> ::3XFLAG-kan; St ^R Km ^R	(Bustamante <i>et al.</i> , 2011)
EPEC ΔgrlA <i>grlR</i>::FLAG	E2348/69 Δ grlA <i>grlR</i> ::3XFLAG-kan; St ^R Km ^R	Huerta-Saquero, A.
EPEC ΔgrlR <i>grlA</i>::FLAG	E2348/69 Δ grlR <i>grlA</i> ::3XFLAG-kan; St ^R Km ^R	Huerta-Saquero, A.
Cepas de <i>E. coli</i>		
MC4100	F- <i>araD139</i> Δ (<i>argF-lac</i>) <i>U169rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbcR</i> ; Sm ^R	(Casadaban, 1975)
JPMC1	MC4100 Δ hns::Km; St ^R Km ^R	(Barba <i>et al.</i> , 2005)
BL21 (DE3) pLysS	F- <i>ompT (lon) hsdS_B(rB mB) gal dcm</i> (DE3) pLysS; Cm ^R	Invitrogen
SU202	<i>lexA71</i> ::Tn5(Def) <i>sulA211</i> Δ <i>lacU169</i> , F' [<i>lac^R/lacZ</i> Δ M15::Tn9]. Sistema para heterodimerización.	(Dmitrova <i>et al.</i> , 1998)
Plásmidos		
pKK232-8	Derivado del pBR322, contiene el gen <i>cat</i> (cloranfenicol acetil transferasa) sin promotor, empleado para la construcción de fusiones transcripcionales; Ap ^R	Pharmacia Biotech
pler-1179 (LEE1)	Derivado de pKK232-8, contiene la región reguladora de <i>ler</i> a partir de los nucleótidos -1179 a +217.	(Bustamante <i>et al.</i> , 2011)

pSepZ-11 (LEE2)	Derivado de pKK232-8, contiene la región reguladora de <i>sepZ</i> a partir de los nucleótidos -469 a +121.	(Bustamante <i>et al.</i> , 2001)
pEspA-2700 (LEE4)	Derivado de pKK232-8, contiene la región reguladora de <i>espA</i> a partir de los nucleótidos -2700 a +121.	Martínez-Laguna. Datos no publicados.
pTIR394 (LEE5)	Derivado de pKK232-8, contiene la región reguladora de <i>tir</i> a partir de los nucleótidos -394 a +318.	(Sanchez-SanMartin <i>et al.</i> , 2001)
pDnaK-cat	Derivado de pKK232-8 que contiene la región reguladora de <i>dnaK</i> a partir de los nucleótidos -394 a +127.	Este estudio
pMPM-T3	Vector de clonación de mediano número de copias, derivado del p15A; Tc ^R	(Mayer, 1995)
pT3GrIR	Derivado del pMPM-T3, portando <i>grlR</i> y un sitio de unión a ribosoma (RBS) entre los sitios <i>KpnI/XhoI</i> bajo el control del promotor <i>lac</i> . Contiene un sitio <i>EcoRI</i> entre el RBS y <i>grlR</i> .	Este estudio
pTEPGrIA1	Derivado del pMPM-T3, codifica para GrIA WT.	(Jimenez <i>et al.</i> , 2010)
pTEPGrIA1/I44A	Derivado del pTEPGrIA1, codifica para GrIA/I44A.	(Jimenez <i>et al.</i> , 2010)
pTEPGrIA1/R54A	Derivado del pTEPGrIA1, codifica para GrIA/R54A.	(Jimenez <i>et al.</i> , 2010)
pT3GrIRA	Derivado del pT3GrIR, portando la región intergénica y <i>grlA</i> entre los sitios <i>XhoI/HindIII</i> .	Este estudio
pT3GrIRA/I44A	Derivado del pT3GrIR, portando la región intergénica y <i>grlA/I44A</i> entre los sitios <i>XhoI/HindIII</i> .	Este estudio
pT3GrIRA/R54A	Derivado del pT3GrIR, portando la región intergénica y <i>grlA/R54A</i> entre los sitios <i>XhoI/HindIII</i> .	Este estudio
pT3GrIR/1-20	Derivado del pT3GrIR, codifica para GrIR/1-20.	Este estudio
pT3GrIR/21-40	Derivado del pT3GrIR, codifica para GrIR/21-40.	Este estudio
pT3GrIR/41-60	Derivado del pT3GrIR, codifica para GrIR/41-60.	Este estudio
pT3GrIR/61-80	Derivado del pT3GrIR, codifica para GrIR/61-80.	Este estudio

pT3GrIR/81-100	Derivado del pT3GrIR, codifica para GrIR/81-100.	Este estudio
pT3GrIR/101-123	Derivado del pT3GrIR, codifica para GrIR/101-123	Este estudio
pGEX-4T1	Vector de clonación para generar fusiones a GST, Amp ^R	GE Healthcare
pGST-GrIR	Derivado del pGEX-4T1, contiene el estructural de <i>grlR</i> en los sitios <i>Bam</i> HI/ <i>Xho</i> I, clonado en fase a <i>gst</i> bajo el control del promotor <i>tac</i> inducible por IPTG.	Este estudio
pGST-GrIR/1-60	Derivado del pGST-GrIR, expresa GST-GrIR/1-60.	Este estudio
pGST-GrIR/61-123	Derivado del pGST-GrIR, expresa GST-GrIR/61-123.	Este estudio
pGST-GrIR/1-20	Derivado del pGEX-4T1, expresa GST-GrIR/1-20, clonado en los sitios <i>Eco</i> R1/ <i>Xho</i> I bajo el control del promotor <i>tac</i> .	Este estudio
pGST-GrIR/21-40	Derivado del pGEX-4T1, expresa GST-GrIR/21-40, clonado en los sitios <i>Eco</i> R1/ <i>Xho</i> I bajo el control del promotor <i>tac</i> .	Este estudio
pGST-GrIR/41-60	Derivado del pGEX-4T1, expresa GST-GrIR/41-60, clonado en los sitios <i>Eco</i> R1/ <i>Xho</i> I bajo el control del promotor <i>tac</i> .	Este estudio
pGST-GrIR/61-80	Derivado del pGEX-4T1, expresa GST-GrIR/61-80, clonado en los sitios <i>Eco</i> R1/ <i>Xho</i> I bajo el control del promotor <i>tac</i> .	Este estudio
pGST-GrIR/81-123	Derivado del pGEX-4T1, expresa GST-GrIR/81-100, clonado en los sitios <i>Eco</i> R1/ <i>Xho</i> I bajo el control del promotor <i>tac</i> .	Este estudio
pGST-GrIR/101-123	Derivado del pGEX-4T1, expresa GST-GrIR/101-123, clonado en los sitios <i>Eco</i> R1/ <i>Xho</i> I bajo el control del promotor <i>tac</i> .	Este estudio
pMAL-c2Xa	Vector de clonación para generar fusiones a MBP, Ap ^R	New England Biolabs
pMBP-GrIA	Derivado del pMAL-c2Xa, codifica para MBP-GrIA bajo el control del promotor <i>tac</i> inducible por IPTG.	(Jimenez <i>et al.</i> , 2010)

pET28a (+)	Vector de clonación para generar fusiones con la etiqueta 6XHis, Km ^R	Novagen
pETGrIR	Derivado del pET28a(+), expresa 6XH-GrIR, clonado en los sitios <i>Ndel/XhoI</i> bajo el control del promotor T7 inducible por IPTG.	Este estudio.
pKD46	Contiene el sistema Lambda Red bajo el control del promotor <i>araB</i> ; Ap ^R	Datsenko and Wanner, 2000
pSUB11	Contiene un cassette de resistencia a kanamicina y la secuencia completa que codifica para el triple epítipo de FLAG.	Uzzau <i>et al.</i> , 2001
pBAD-Ler	Derivado de pBADMyHis que codifica para Ler-6XH bajo el control del promotor pBAD; Ap ^R	Bustamante-Santillán. Datos no publicados.
pBAD-HNS-FLAGHis₆	Derivado de pBADMyHis que codifica para H-NS-6XHis bajo el control del promotor pBAD; Ap ^R	Bustamante-Santillán. Datos no publicados.
pBAD-StpA	Derivado de pBADMyHis que codifica para StpA-6XH bajo el control del promotor pBAD; Ap ^R	Bustamante-Santillán. Datos no publicados.
pSR659	Vector de clonación para generar fusiones al dominio de unión a DNA de LexA empleada para heterodimerización; Ap ^R	(Daines and Silver, 2000)
pSR659-GrIR	Derivado del pSR659, contiene <i>lexA_{DBD}-grIR</i> ; Ap ^R	Este estudio
pSR660-GrIA	Derivado del pSR660, contiene <i>lexA_{DBD}-grIA</i> ; Tc ^R	Ibarra-García. Datos no publicados.
pSR659-Ler	Derivado del pSR659, contiene <i>lexA_{DBD}-ler</i> ; Ap ^R	Bustamante-Santillán. Datos no publicados.
pSR660-Ler	Derivado del pSR660, contiene <i>lexA_{DBD}-ler</i> ; Tc ^R	Bustamante-Santillán. Datos no publicados.
pSR659PerA	Derivado del pSR659, contiene <i>lexA_{DBD}-perA</i> ; Ap ^R	(Ibarra <i>et al.</i> , 2003)
pMI660-PerA	Derivado del pSR660, contiene <i>lexA_{DBD}-perA</i> ; Tc ^R	(Ibarra <i>et al.</i> , 2003)

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Características
HIGRLAR	ACCCGGGA <u>AAGCTT</u> CGTCTAACTCTCCT T	Introduce el sitio <i>HindIII</i> en el 3' de <i>grlA</i> .
GREPKE-F	CGGGGTACCAAGAAGGAGAATTCATG ATTATGAAGGATGGCATCTAT	Introduce los sitios <i>KpnI</i> y <i>EcoRI</i> en el 5' de <i>grlR</i> .
GREPX-R	ATAAATAA <u>ACTCGAG</u> AATAAAAAACATAC	Introduce el sitio <i>XhoI</i> en el 3' de <i>grlR</i> .
GRLRND-FW	GGGAATTCACATATGATTATGAAGGAT GGCATC	Introduce el sitio <i>NdeI</i> en el 5' de <i>grlR</i> .
XHINTERGRLAF	CCCGGCTCGAGTTATTTATCAAATAAA AAG	Introduce el sitio <i>XhoI</i> en la región intergénica <i>grlRA</i> .
EP-GRLRBHF	GAAACTGGATCCGTTATGATTATGAAG GATGGC	Introduce el sitio <i>BamHI</i> en el 5' de <i>grlR</i> .
GR1M-XR	CAATGTTTAGCCTCGAGGGAATTTTCG	Construcción del pGST-GrIR/1-60, introduce el sitio <i>XhoI</i> en el 3' de <i>grlR</i> .
GR2MB-F	TATAATTACGAAGGATCCTCGGTGCTA AAC	Construcción del pGST-GrIR/61-123, introduce el sitio <i>BamHI</i> en el 5' de <i>grlR</i> .
GRLRND-20F	GGGAATTCACATATGGAAGGTATACTG ATTA	Construcción del pGST-GrIR/1-20, introduce el sitio <i>BamHI</i> en el 5' de <i>grlR</i> .
R-21-40FW	GAAGACTCCTGTGGGCAGGGGGTTCT CTCTGAAGAT	Construcción del pT3GrIR/21-40
R-21-40RV	AGAGAGAACCCCTGCCACAGGAGT CTTCATTGCT	Construcción del pT3GrIR/21-40
R41-60-FW	ATTGCTTCTGTGTATATCCCTCGGTG CTAACATT	Construcción del pT3GrIR/41-60
R41-60-RV	TAGCACCGAGGGAATATACACAGAAG CAATATCGCC	Construcción del pT3GrIR/41-60
R61-80-FW	CGATATAATTACGAAAGTAATGATAATG ATAATAATCTCACA	Construcción del pT3GrIR/61-80

R61-80-RV	ATTATTATCATTACTTTCGTAATTATATC GATGGAC	Construcción del pT3GrIR/61-80
R81-100- FW	CCTAAAAAAGTACTGGATGTTTATGCC AAATTTATA	Construcción del pT3GrIR/81-100
R81-100- RV	TTTGGCATAAACACTCAGTACTTTTTTA GGGATAAC	Construcción del pT3GrIR/81-100
EPR123-RV	GGTCATCACTCGAGTTAAACAAACAAT TTTTCAAT	Construcción del pT3GrIR/101-123, introduce el sitio <i>Xho</i> I en el 3' de <i>grlR</i> .
PMPM3 FW	GTGCCGTAAAGCACTAAATCGG	Utilizado para generar las mutantes por eliminaciones de <i>grlR</i> . Alinea con la secuencia del vector pMPM-T3.
PMPM3 RV	GCGTTATCCCCTGATTCTGTGG	Utilizado para generar las mutantes por eliminaciones de <i>grlR</i> . Alinea con la secuencia del vector pMPM-T3.
DnaKF	CCGCGGATCCAAGGATTCTCTTAGTGG GA	Introduce el sitio <i>Bam</i> HI en el lado 5' de la región reguladora de <i>dnaK</i> para generar la fusión transcripcional pDnaK- <i>cat</i>
DnaKR	TATAGGGAAGCTTGATCGCCTTCGGC GTTCTCC	Introduce el sitio <i>Hind</i> III en el lado 3' de la región reguladora de <i>dnaK</i> para generar la fusión transcripcional pDnaK- <i>cat</i>
grlR- FLAGH1P1	TTAATTATTA AAAACACAGGAATGCCAC AAGTTTATTTAGAAGACTACAAAGACC ATGACGG	Utilizado para etiquetar a <i>grlR</i> con el epítoto de FLAG en el cromosoma.
grlR- FLAGH2P2	TTTATTTTTATTCTTCTATAAAATATACT CAAAAATTACGCCATATGAATATCCTC CTTAG	Utilizado para etiquetar a <i>grlR</i> con el epítoto de FLAG en el cromosoma.

6. RESULTADOS

6.1 GrIR reprime la expresión de los operones del LEE en ausencia de Ler y GrIA

Diversos grupos han demostrado que la expresión en *trans* de GrIR en *C. rodentium* y EHEC provoca una disminución drástica en la transcripción de diversos operones del LEE, así como en la síntesis de diversas proteínas codificadas en la isla (Deng *et al.*, 2004; Lio and Syu, 2004; Jobichen *et al.*, 2007). Además, el efecto represor ha sido también observado al analizar el transcrito de *ler* en una mutante $\Delta grIR$, donde fue evidente un incremento importante de la transcripción de este regulador en ausencia de *grIR* (Deng *et al.*, 2004). Tales hallazgos, aunado a la demostración de la interacción proteína-proteína entre GrIR y GrIA (Creasey *et al.*, 2003; Jobichen *et al.*, 2007; Padavannil *et al.*, 2013), llevaron a proponer que la vía por la que GrIR regula negativamente la expresión de los genes del LEE es a través de la interacción con GrIA, impidiendo que ésta active a *ler* y llevando a un estado de represión a los genes de la isla.

Lo anterior nos llevó a evaluar como primer punto si el efecto negativo ejercido por GrIR de *C. rodentium* y EHEC era reproducible por la misma proteína pero de EPEC, considerando que tienen una identidad mayor del 88% entre ellas. Al mismo tiempo investigamos si el efecto represor de GrIR es a través de GrIA o Ler, para lo cual usamos la cepa de EPEC Δhns ; la ausencia del regulador global H-NS provoca la desrepresión de los operones del LEE, permitiendo que su expresión sea independiente de Ler, y por tanto, de GrIA (Umanski *et al.*, 2002). Para esto, el plásmido pT3GrIR (Tabla 1), que contiene a *grIR*, fue introducido en las cepas EPEC WT y Δhns , junto con plásmidos que contienen diferentes fusiones transcripcionales de operones del *LEE* al gen reportero *cat*. Las cepas derivadas fueron cultivadas en condiciones de inducción para evaluar el efecto de GrIR sobre los niveles de expresión de dichas fusiones, así como en la secreción y expresión de proteínas codificadas en el LEE (Figura 8). Consistente con lo observado para otros patógenos AE, la sobre expresión de GrIR en EPEC WT reprimió la actividad transcripcional de las fusiones *LEE1*, *LEE2*, y *LEE4* (Fig. 8A), la secreción de las

proteínas translocadoras EspA, EspB y EspD, así como del autotransportador EspC, el cual está codificado fuera del LEE y se secreta independientemente del SST3, pero cuya expresión es también regulada positivamente por Ler (Figura 8B); y la expresión de Tir, Intimina, EspB y EspA (Figura 8C). Al mismo tiempo, y con la finalidad de descartar que el efecto generado por GrIR se debiera a un fenómeno inespecífico y pleiotrópico sobre la fisiología de la bacteria, se determinó la cinética de crecimiento de EPEC WT en presencia del vector (pMPM-T3) y del plásmido multicopia que codifica para GrIR (pT3GrIR) (Figura 8D). Los resultados obtenidos indicaron que ambas cepas crecieron de manera similar, descartando, por tanto, que el efecto de represión atribuido a la sobre expresión de GrIR impacte a cualquier gen de manera inespecífica (Figura 8D).

Interesantemente, GrIR fue todavía capaz de reprimir la actividad transcripcional de los operones del LEE analizados en la cepa EPEC Δhns , (Figura 8A). Tales resultados fueron validados al evaluar la expresión de las proteínas Intimina, Tir, EspA y EspB por Western blot y el perfil de proteínas secretadas (Figuras 8B y 8C). Los datos obtenidos indican que GrIR, aun en ausencia de H-NS, es capaz de reprimir la expresión de proteínas codificadas en el LEE, y por ende su secreción. En contraste, la transcripción de *dnaK-cat* (Figura 8A) y la expresión de las proteínas DnaK y MBP (Figura 8C), que son comúnmente usadas como controles de carga porque su expresión varía poco en diferentes condiciones de crecimiento y no son moduladas por los reguladores del LEE, no fueron afectadas por GrIR en ambas cepas (Figuras 8A y 8C). Esto indica que el efecto negativo ejercido por GrIR es específico sobre la expresión de los genes del LEE que codifican para las proteínas analizadas.

Hasta este punto, los resultados obtenidos sugerían que GrIR regula negativamente los operones de la isla a través de una vía alterna a la interacción con GrIA. Una manera de abordar dicha conjetura fue evaluando el efecto de *grIR* en multicopia en condiciones de crecimiento en donde GrIA no es el principal activador de la expresión de Ler. De acuerdo a estudios realizados en nuestro grupo, cuando EPEC es crecida en condiciones estáticas (DMEM/37°C/estático con

5% de CO₂), PerC es el principal activador de la expresión del operón *LEE1* y por tanto de *ler* (Bustamante *et al.*, 2011). Para esto, el efecto que tiene sobre expresar a GrIR se analizó creciendo a las cepas EPEC WT y EPEC Δhns , portando los plásmidos pT3GrIR o pMPPM-T3, en tales condiciones. GrIR reprimió la secreción de proteínas así como la expresión de Tir e intimina en ambas cepas y condiciones, pero no así la de DnaK (Fig. 9A y B).

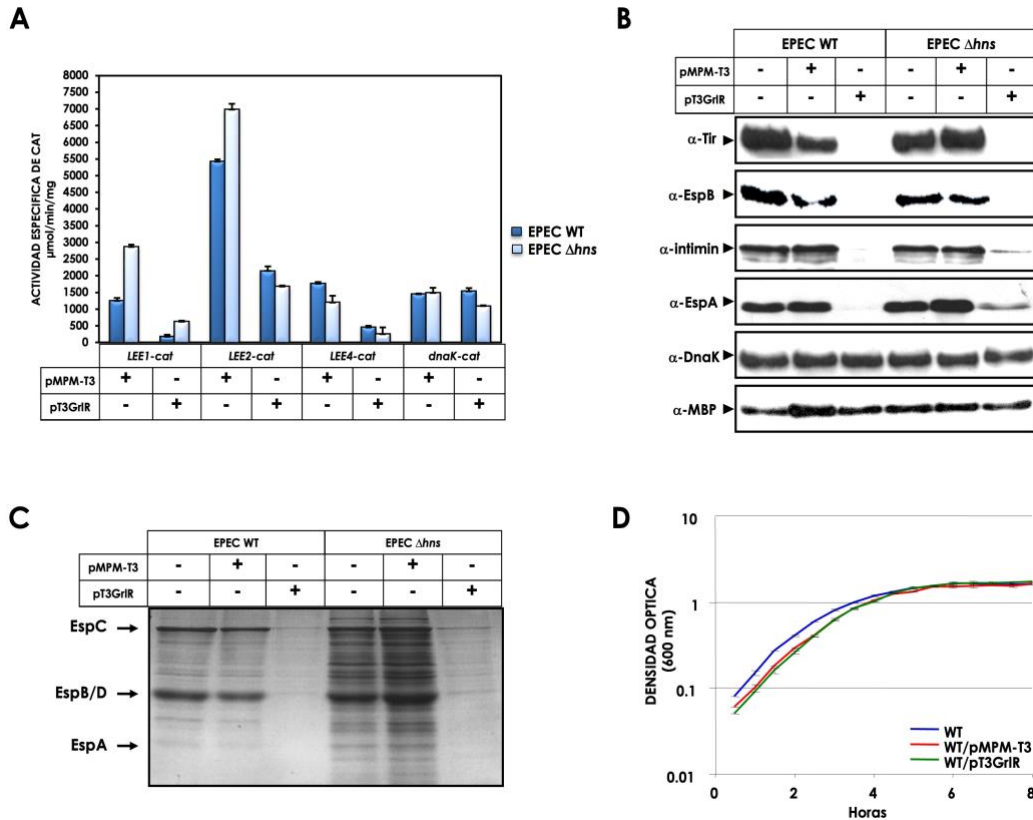


Figura 8. GrIR reprime la expresión de los operones de la isla LEE en presencia y ausencia de H-NS. Las cepas EPEC WT y EPEC Δhns , transformadas con pMPPM-T3 o pT3GrIR, fueron crecidas en DMEM/agitación/37°C hasta una $DO_{600} = 1.0$, punto en el cual se colectaron muestras de los cultivos para evaluar (A-C): A) Actividad transcripcional de las fusiones *LEE1*, *LEE2*, *LEE4* y *dnaK* al gen reportero *cat*. EPEC WT (barras azul intenso) y EPEC Δhns (barras azul claro); B) Expresión de las proteínas Tir, EspB, Intimina, EspA, DnaK y MBP por “Western blot” a partir de extractos totales. Se utilizaron los anticuerpos anti-Tir, anti-EspB, anti-intimina, anti-EspA y como controles de carga anti-DnaK y anti-MBP; C) Perfil de proteínas secretadas por SDS-PAGE. D) Cinética de crecimiento de EPEC WT en presencia del pMPPM-T3 o pT3GrIR, cultivada en DMEM/agitación/37°C durante 8 horas. A y D los valores son un promedio de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. B y C, un experimento representativo de 3 experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar.

Dicho resultado reforzó la noción de que GrIR ejerce su efecto represor sobre los genes del LEE a través de una vía alterna a la interacción con GrIA.

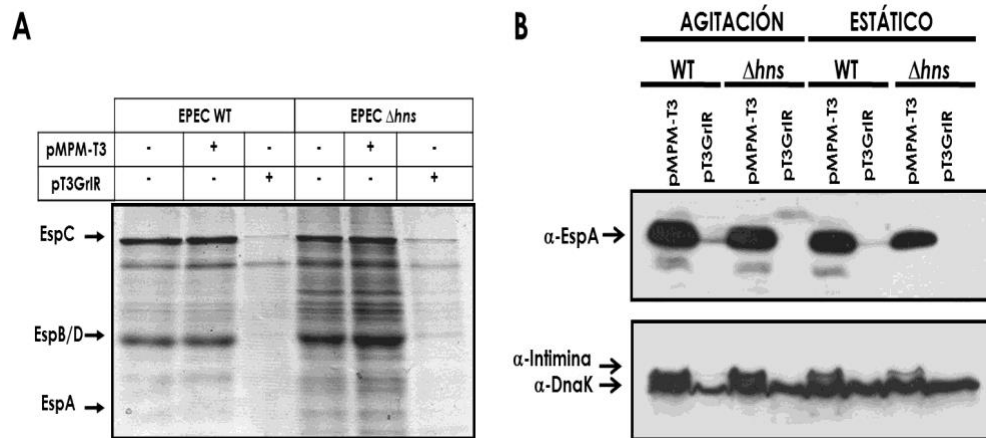


Figura 9. GrIR reprime la expresión y secreción de proteínas codificadas en la isla LEE bajo condiciones en las que GrIA no es el principal activador de *Jer*. A) Perfil de proteínas secretadas de las cepas EPEC WT y Δhns crecidas en DMEM/37°C/estático con 5% de CO₂ a DO₆₀₀= 0.8. B) "Western blot" mostrando los niveles de expresión de EspA, Intimina y DnaK en extractos totales de las cepas crecidas en las mismas condiciones que en A y en DMEM/ agitación/37°C. Se utilizaron los anticuerpos anti-EspA, anti-intimina y como control de carga anti-DnaK. Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Por último, con la finalidad de evaluar el efecto represor de GrIR sobre la actividad de los promotores del LEE en un fondo carente no sólo de H-NS sino también de GrIA y Ler, se analizó la expresión de las fusiones *LEE1-cat*, *LEE2-cat* y *dnak-cat* en la cepa *E. coli* MC4100 Δhns , en presencia o no de GrIR. La utilidad de dicha cepa es que carece de la isla LEE y por tanto de los genes que codifican para Ler y GrIA, pero en la cual la expresión de las fusiones del LEE es constitutiva porque no está presente el represor H-NS.

Los resultados que se muestran en la figura 10 indican que GrIR reprime también la transcripción constitutiva de los operones *LEE1* y *LEE2* en un fondo carente de GrIA y Ler, pero no así la de *dnak* (Figura 10). Lo anterior indica que GrIR también regula de manera negativa la expresión de los genes del LEE de manera independiente de la interacción con GrIA, posiblemente actuando en forma directa, o a través de otra proteína conservada en *E. coli* K12.

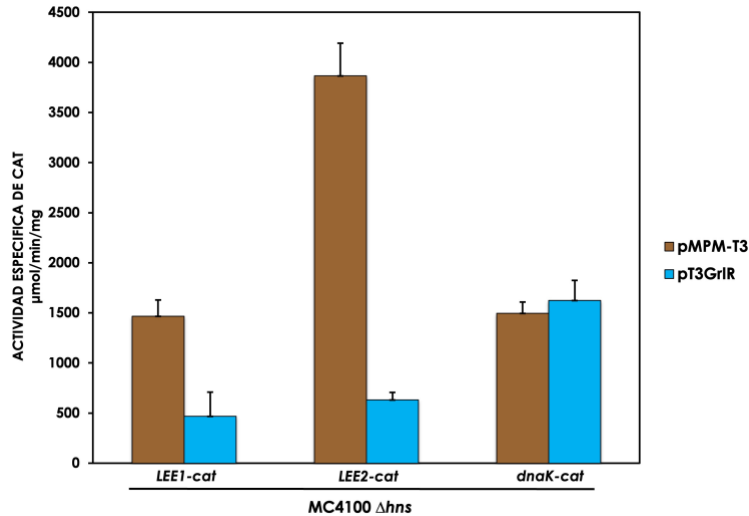


Figura 10. GrIR reprime la expresión de los operones *LEE1* y *LEE2* en ausencia de H-NS, GrIA y Ler. Actividad transcripcional de las fusiones *LEE1-cat*, *LEE2-cat* y *dnaK-cat* en la cepa MC4100 Δhns en presencia del pMPM-T3 (barras en café) o pT3GrIR (barras azules). Las cepas fueron crecidas en DMEM/agitación/37°C y las muestras tomadas a una $DO_{600}=1.0$. Los valores son un promedio de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras representan la desviación estándar.

6.2 GrIR preferencialmente modula de manera negativa la expresión de los genes del LEE en condiciones de represión.

Con la finalidad de caracterizar el efecto de GrIR en un contexto más natural, se evaluó el comportamiento de la cepa EPEC $\Delta grlR$. Para esto, las cepas EPEC WT y $\Delta grlR$ fueron transformadas con plásmidos que portan las fusiones transcripcionales *LEE1*, *LEE2*, *LEE4*, *LEE5* y *dnaK* (como control), al gen reportero *cat*. Las bacterias fueron crecidas en condiciones de inducción y de represión de los genes de la isla con la finalidad de identificar la condición en la que GrIR reprime. Se analizó la actividad enzimática de CAT (Figura 11A) y de manera paralela se analizó el perfil de secreción de proteínas de virulencia (Figura 11B). En condiciones de inducción, la actividad transcripcional de las fusiones se incrementó entre 1.5 y 4 veces en EPEC $\Delta grlR$ comparada con la cepa WT (Figura 11A); sin embargo, en condiciones de represión tal efecto fue más pronunciado debido a que las actividades de los operones se incrementaron 4 (*LEE2*), 8 (*LEE1*), 10 (*LEE5*) y 17 (*LEE4*) veces en EPEC $\Delta grlR$ respecto de la cepa WT (Figura 11A), lo que sugiere que la condición de crecimiento determina en parte el efecto represor de GrIR. En

contraste, la actividad de *dnak-cat* no fue alterada por la presencia o ausencia de *grlR*, ni por las condiciones de crecimiento utilizadas (Figura 11A).

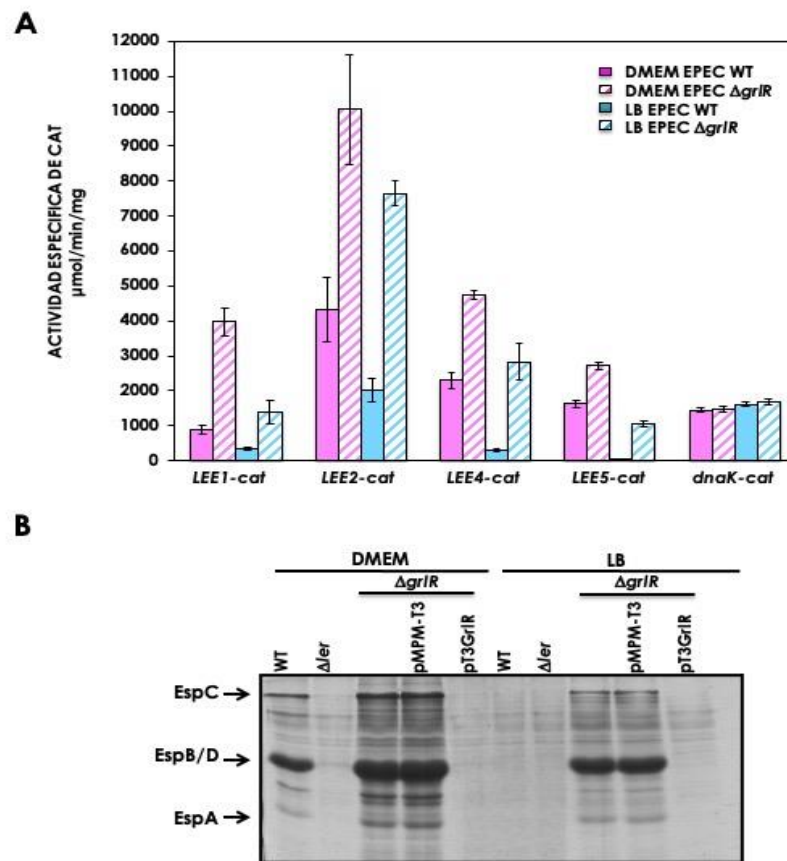


Figura 11. La ausencia de GrIR desreprime la expresión de los operones del LEE principalmente en condiciones de represión. A) Actividad transcripcional de las fusiones *LEE1-cat*, *LEE2-cat*, *LEE4-cat*, *LEE5-cat* y *dnak-cat* en las cepas EPEC WT (barras lisas) y Δ *grlR* (barras con diagonales), crecidas en DMEM (color rosa) y LB (color azul) con agitación a 37°C. Los valores son un promedio de 3 experimentos independientes por duplicado. B) Perfil de secreción de proteínas de las cepas EPEC WT, Δ *ler*, Δ *grlR*, Δ *grlR* + pMPM-T3 y Δ *grlR* + pT3GrIR; crecidas en las mismas condiciones que en A. La imagen es representativa de 2 experimentos independientes. En A y B las muestras fueron colectadas a una $DO_{600}=1.0$. Las barras representan la desviación estándar.

Estos resultados fueron complementados al analizar el perfil de secreción de proteínas de virulencia de las cepas EPEC WT, Δ *ler* y Δ *grlR* cultivadas en las mismas condiciones de crecimiento (Figura 11B). En condiciones de inducción, la ausencia de *grlR* favoreció un incremento de la secreción de proteínas comparada con la cepa WT, mientras que la cepa Δ *ler* no secreta debido a la ausencia del activador. En contraste, en condiciones de represión, la mutante Δ *grlR* secretó

proteínas al medio en cantidades incrementadas, en comparación a las cepas WT y Δler (Figura 11B). Este fenotipo es revertido al complementar la cepa mutante con el plásmido que contiene el gen *grlR* (Figura 11B).

Estos resultados confirman el efecto predominante de GrIR en la represión de los operones del LEE cuando EPEC crece en medio LB a 37°C.

6.3 GrIR tiene un efecto predominante sobre la expresión de los genes de la isla LEE, con respecto a H-NS, bajo condiciones de represión.

Considerando que tanto GrIR como H-NS actúan como reguladores negativos de la isla, surgió el interés de comparar el grado de regulación negativa que éstos tienen sobre los operones del LEE en condiciones de inducción y de represión. Para analizar esto, determinamos la actividad transcripcional de las fusiones *LEE1*, *LEE2* y *LEE5* en las cepas EPEC WT, $\Delta grlR$ y Δhrs cultivadas en ambas condiciones (Figura 12A), y al mismo tiempo su perfil de secreción (Figura 12B).

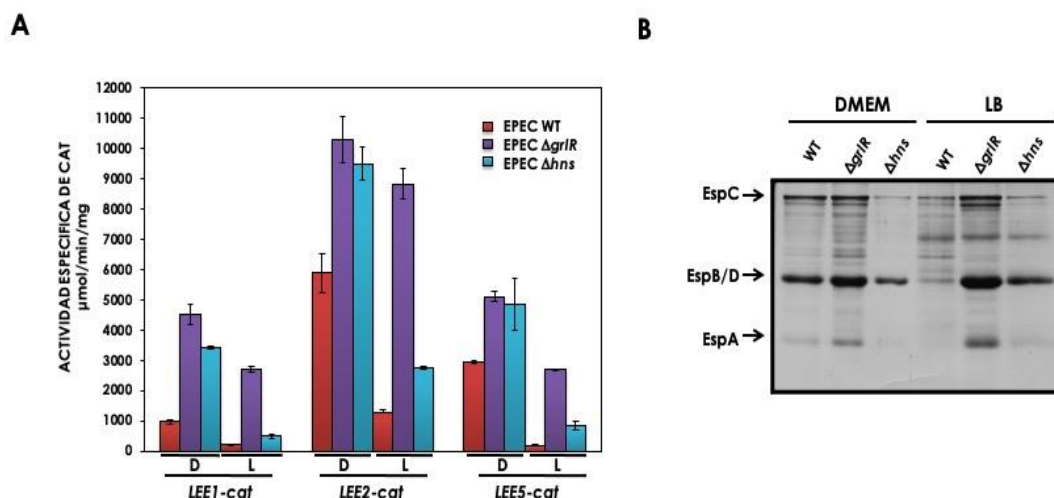


Figura 12. En la condición de represión, GrIR ejerce un efecto negativo predominante sobre los genes de la isla LEE con respecto a H-NS. A) Actividad transcripcional de las fusiones *LEE1-cat*, *LEE2-cat* y *LEE5-cat* en las cepas EPEC WT (barras rojas), $\Delta grlR$ (barras moradas) y Δhrs (barras azules) crecidas en DMEM (D) y LB (L) en agitación a 37°C. Los valores son un promedio de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. B) Perfil de secreción de proteínas de las cepas cultivadas en las mismas condiciones que en A. La imagen es representativa de 2 experimentos independientes. En ambos ensayos las muestras fueron colectadas a una $DO_{600}=1.0$. Las barras representan la desviación estándar.

En condiciones de inducción, la actividad de las fusiones *LEE2* y *LEE5* se incrementó menos de dos veces en ausencia de cualquiera de los 2 reguladores, mientras que la de la fusión *LEE1* fue de 4 y 2.5 veces en las mutantes $\Delta grIR$ y Δhns , respectivamente (Figura 12A). De manera interesante, en condiciones de represión, la ausencia de GrIR provocó que los promotores de los operones *LEE1*, *LEE2* y *LEE5* se desreprimieran cerca de 10, 6 y 12 veces, respectivamente; mientras que en la mutante Δhns se desreprimieron cerca de 3, 2 y 9 veces, respectivamente, en relación con la actividad mostrada en la cepa silvestre (Figura 12A).

Estos resultados fueron complementados al analizar el perfil de secreción que, en condiciones de inducción, es ligeramente mayor la secreción para las cepas $\Delta grIR$ y Δhns , en comparación con el de la cepa WT (Figura 12B). En contraste, bajo condiciones de represión, donde la secreción de proteínas es muy limitada para la cepa silvestre, se observó un claro incremento en la secreción de proteínas para la cepa $\Delta grIR$ y, aunque en menor medida, también para la cepa Δhns (Figura 12B).

Estos resultados sugieren que el efecto represor de GrIR es predominante sobre el de H-NS bajo condiciones de represión; sin embargo, no se puede descartar que, al menos en parte, las diferencias observadas entre ambas mutantes en LB se deban al efecto global que tiene cada mutación sobre la fisiología de la bacteria, sobre todo considerando que H-NS es un regulador global y GrIR uno específico de genes del LEE y algunos otros fuera de la isla.

6.4 GrIR y H-NS tienen un papel diferencial sobre la regulación del LEE bajo diferentes condiciones de crecimiento

A fin de profundizar en la importancia de GrIR y H-NS sobre la regulación de los genes del LEE, surgió el interés de investigar si estas proteínas participan también en el control negativo de tales genes en otras condiciones de crecimiento, como temperaturas por arriba o debajo de 37°C y en presencia de sales de amonio, condiciones en las que previamente se observó un efecto negativo para la expresión del LEE (Bustamante *et al.*, 2001; Umanski *et al.*, 2002).

Para tal objetivo, las cepas EPEC WT, $\Delta grlR$ y Δhns conteniendo la fusión *LEE2-cat* fueron crecidas en DMEM/30°C, DMEM/42°C y DMEM/NH₄/37°C, además de DMEM/37°C y LB/37°C. A partir de muestras colectadas a una DO₆₀₀= 1.0, se cuantificó la actividad de CAT y se analizó la expresión de Tir, EscJ (codificada en el operón *LEE2*) y DnaK (control) por Western blot (Fig. 13). Los resultados mostraron que la actividad de la fusión *LEE2-cat* se incrementó 1.5, 2 y 7.5 veces en la cepa $\Delta grlR$ cultivada en DMEM/42°C, DMEM/NH₄/37°C y DMEM/30°C, respectivamente, comparada con las actividades registradas en la WT, mientras que en la cepa Δhns el incremento fue de 2, 7 y 11.5 veces (Figura 13A). Por su parte, en DMEM/37°C y LB/37°C los incrementos fueron de 2.0 y 12 veces, respectivamente, en la cepa $\Delta grlR$; y en la cepa Δhns fue de 1.5 y 4 veces, respectivamente, tomando como referencia la actividad registrada de *LEE2-cat* en la cepa WT (Figura 13A).

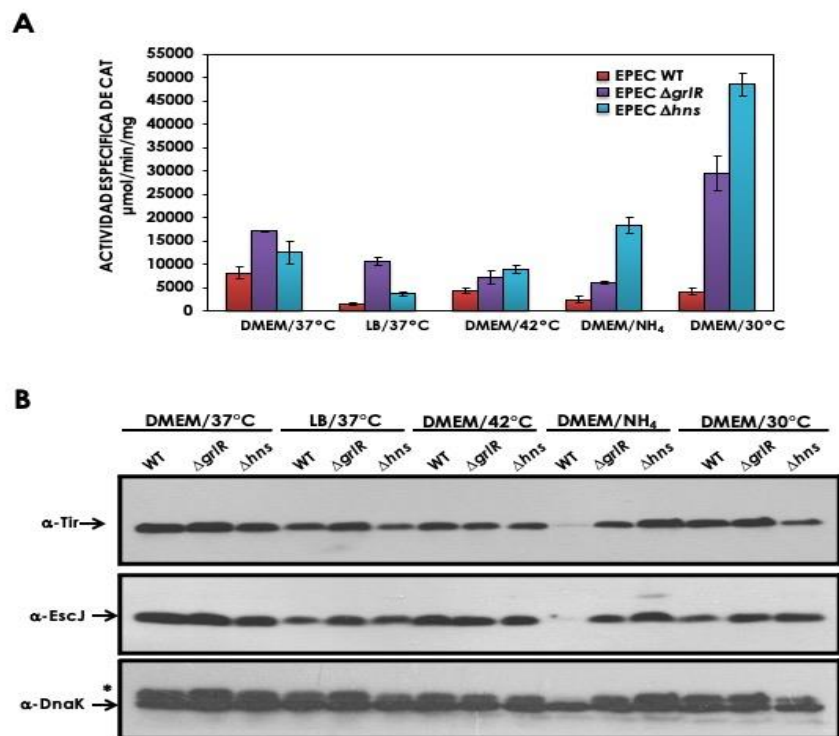


Figura 13. GrIR reprime la expresión de *LEE2* y la secreción de proteínas cuando EPEC es crecida en DMEM/30°C y en menor grado en DMEM/NH₄. A) Actividad transcripcional de la fusión *LEE2-cat* en la cepa EPEC WT (barras rojas), $\Delta grlR$ (barras moradas) y Δhns (barras azules) crecidas en DMEM/37°C, LB/37°C, DMEM/42°C, DMEM/NH₄ y DMEM/30°C. Los valores son un

promedio de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. B) “Western blot” de la expresión de Tir, EscJ y DnaK de las cepas crecidas en las mismas condiciones que en A. La imagen es representativa de 2 experimentos independientes. Se utilizaron los anticuerpos anti-EscJ, anti-Tir y como control de carga anti-DnaK. En ambos ensayos las cepas fueron crecidas a $DO_{600} = 1.0$. El asterisco indica la señal remanente de la proteína Tir. Las barras representan la desviación estándar.

En conjunto con el análisis de *LEE2-cat* (Figura 13A) y la expresión de Tir y EscJ (Figura 13B), estos resultados indican que ambos represores ejercen niveles variados de represión dependiendo de la condición de crecimiento. GrIR es el regulador negativo principal que controla la expresión de los operones ubicados en la isla LEE cuando EPEC es crecida en medio LB/37°C; sin embargo, también regula negativamente a los genes de la isla cuando la bacteria es cultivada en DMEM/37°C, DMEM/30°C y DMEM/NH₄, aunque el efecto en las dos últimas condiciones es menor respecto de la represión que ejerce H-NS. Por último, la expresión de DnaK no parece afectarse por las condiciones de crecimiento usadas ni por las mutaciones evaluadas (Figura 13B).

6.5 H-NS y GrIR integran un mecanismo de regulación negativo que funciona para reprimir la expresión de los genes de la isla LEE.

En nuestro grupo previamente se demostró que Ler regula positivamente la expresión del operón *grlRA* contrarrestando la represión ejercida por H-NS, además también se identificó que GrIA es requerida para la expresión de *ler*, estableciéndose un circuito de regulación positiva (Barba *et al.*, 2005; Jimenez *et al.*, 2010).

Con base en lo anterior, y a fin de poner en contexto la participación de los represores H-NS y GrIR en la red de regulación de los genes de la isla LEE, establecimos la propuesta de que ambos reguladores podrían integrar un mecanismo de regulación negativa en dos niveles. El primer nivel estaría conformado por H-NS, el silenciador xenogénico en bacterias Gram-negativas (Navarre, 2016), y el segundo nivel por GrIR, el represor endógeno de la isla LEE (Deng *et al.*, 2004). En este contexto, la condición basal de los genes del LEE, y energéticamente favorable para la bacteria cuando su expresión no le ofrece una ventaja adaptativa, es que se encuentran reprimidos por H-NS y GrIR. H-NS

formando complejos represores en prácticamente todos los promotores del LEE, y GrIR actuando tanto formando heterotrímeros con las moléculas de GrIA que se producen en condiciones basales, evitando así la activación de *ler*, como en forma independiente de esta interacción como se mostró anteriormente. En la mutante en *hns*, los genes del LEE, incluyendo el operón *grIRA*, se expresan independientemente de Ler; sin embargo, GrIR sigue al parecer reprimiendo en forma independiente a la interacción con GrIA, evitando que la desrepresión sea completa. Por su parte, al eliminar *grIR*, este segundo nivel de represión se libera, permitiendo a su vez que GrIA, libre de la interacción con GrIR, active más eficientemente la expresión de Ler, lo que da lugar a una mayor desrepresión de los genes del LEE vía la competencia con H-NS.

Para explorar este modelo hipotético, se utilizaron diversas cepas de EPEC con mutaciones sencillas y dobles en genes que codifican para los reguladores Ler, H-NS, GrIA y GrIR. Las cepas mutantes fueron transformadas con el plásmido que porta la fusión de *LEE2-cat* y crecidas en condiciones de inducción (DMEM) y represión (LB). Se determinó la actividad transcripcional de la fusión (Figura 14A) y de manera complementaria se realizó el análisis del perfil de secreción (Figura 14B).

En las mutantes de *ler* y *grIA* se abatió significativamente la expresión del promotor *LEE2* y la secreción de proteínas, debido a que estas cepas no cuentan con el antagonista de H-NS, la cual mantiene la represión que ejerce sobre los genes del LEE (Figura 14A y B, respectivamente), lo que reproduce los datos reportados en nuestro grupo (Bustamante *et al.*, 2001; Barba *et al.*, 2005; Jimenez *et al.*, 2010). Datos similares fueron obtenidos para la mutante doble $\Delta grIRA$ (Figura 14), lo que confirma que aún en ausencia de GrIR, se mantiene la represión mediada por H-NS ya que al también estar ausente GrIA, la activación de *ler* se reduce considerablemente. Por su parte, en la doble mutante $\Delta grIR\Delta hns$, la actividad transcripcional del promotor *LEE2* presentó niveles de expresión semejantes a los mostrados en las cepas con las mutaciones individuales en *grIR* y *hns* en condiciones de inducción, mientras que bajo condiciones de represión su expresión fue más cercana a la actividad observada en la cepa $\Delta grIR$ (Figura 14A). Estos

resultados coincidieron con el perfil de proteínas secretadas, ya que en DMEM la doble mutación en *hns* y *grlR* favoreció el incremento en la secreción al mismo nivel que en las cepas con las mutaciones sencillas (Figura 14B). Sin embargo, en medio LB, el perfil de secreción en las cepas $\Delta grlR\Delta hns$ y $\Delta grlR$ fue similar (Figura 14B); en contraste a la menor cantidad de proteínas secretadas en ausencia únicamente de *hns* (Figura 14B). El fenotipo de la doble mutante en *ler* y *grlR* confirmó que Ler es indispensable para eliminar la represión ejercida por H-NS independientemente de la condición de crecimiento (Figura 14A y B), respecto de lo reportado anteriormente para la doble mutante $\Delta ler\Delta hns$, en la cual los genes del LEE se expresan a pesar de la ausencia de Ler (Umanski *et al.*, 2002).

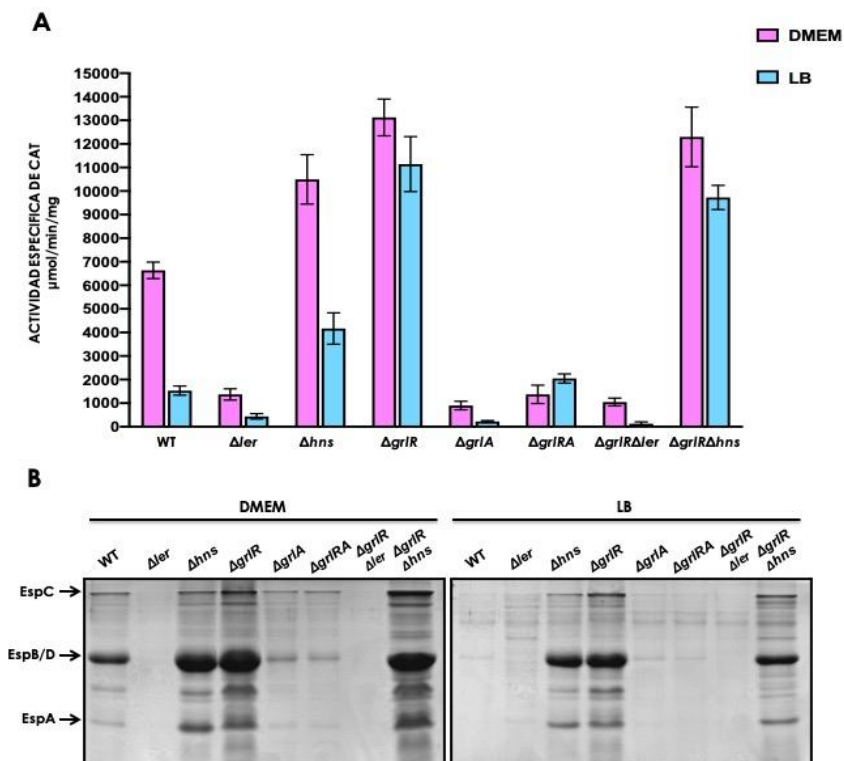


Figura 14. GrIR y H-NS reprimen la expresión del LEE por mecanismos indirectamente cooperativos. A) Actividad transcripcional de la fusión *LEE2-cat* en las cepas EPEC WT, Δler , $\Delta grlR$, Δhns , $\Delta grlA$, $\Delta grlRA$, $\Delta grlR\Delta ler$ y $\Delta grlR\Delta hns$; crecidas en DMEM/37°C (barras rosas) y LB/37°C (barras azules). Los valores son un promedio de 3 experimentos independientes por duplicado. B) Perfil de secreción de proteínas de las cepas crecidas en las mismas condiciones que en A. Ensayo representativo de 3 realizados de manera independiente. Las bacterias fueron cultivadas a $DO_{600}=1.0$. Las barras representan la desviación estándar.

Estos resultados confirman la noción de que GrIR y H-NS establecen dos niveles de represión que son indirectamente cooperativos. El primer nivel lo establece H-NS al mantener niveles basales de expresión en condiciones no favorables para la inducción de la isla. Ler es esencial para contrarrestar esta represión al ser el antagonista de H-NS. En un segundo nivel, GrIR reprime la expresión del LEE presuntamente a través de dos mecanismos, uno dependiente de la interacción con GrIA para evitar que ésta active a *ler* y otro, el aquí descrito, independiente de dicha interacción que aún no ha sido caracterizado en detalle.

6.6 GrIR no interactúa con H-NS, StpA o Ler

En este trabajo hemos demostrado que GrIR es capaz de reprimir la expresión de los genes de la isla independientemente de la interacción con GrIA y que el efecto predominante de represión lo ejerce cuando la bacteria crece en medio LB/37°C.

Una posibilidad por la que GrIR podría establecer esta vía alterna de represión, es mediante la interacción con otras proteínas que participan en la regulación del LEE. Por ejemplo, potenciando la actividad represora de StpA, la cual puede substituir como represor a H-NS en algunos promotores (Uyar *et al.*, 2009), o inactivando también a Ler, en ambos casos por medio de interacciones proteína-proteína. Para explorar esta posibilidad, GrIR fue fusionada a la proteína glutatión S-transferasa (GST) y utilizamos a GrIA acoplada a la proteína de unión a maltosa (MBP), y a las proteínas H-NS, StpA y Ler fusionadas a una etiqueta Myc-6XHis para realizar ensayos tipo “pull-down”. Los resultados que obtuvimos corroboran la interacción entre GrIR y GrIA; sin embargo, no se observó interacción con H-NS, StpA o Ler (Figura 15).

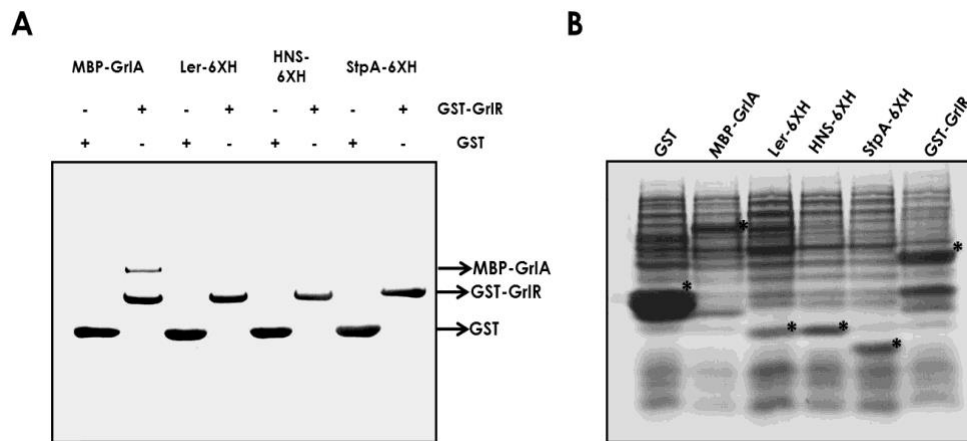


Figura 15. GrIR interactúa con GrIA pero no lo hace con otros reguladores que modulan la isla LEE. A) SDS-PAGE del ensayo de “pull-down” para evaluar la interacción de GST-GrIR con MBP-GrIA, Ler-6XH, HNS-6XH y StpA-6XH. Se indican con flechas las proteínas visualizadas. B) SDS-PAGE de extractos totales sobre expresando las proteínas (marcadas con asteriscos) utilizadas para el ensayo de “pull-down”.

6.7. GrIA, además de activar a Ler, contrarresta la represión ejercida por GrIR sobre los genes de LEE

El trabajo realizado por Deng *et al.*, 2004, sugiere que bajo condiciones de inducción el efecto negativo de GrIR es contrarrestado cuando se coexpresa con GrIA, aunque esto podría deberse a que el exceso de este regulador incrementa los niveles de expresión de Ler. Sin embargo, también existe la posibilidad que bajo ciertas condiciones, por ejemplo, las de inducción, la interacción entre GrIR y GrIA tenga un papel también a la inversa evitando la represión independiente mediada por GrIR.

Para evaluar esta posibilidad, los genes *grIR* y *grIA* fueron clonados en el vector pMPM-T3, el plásmido resultante pT3GrIRA y los plásmidos expresando GrIR (pT3GrIR), GrIA (pTEPGrIA1) y el vector (pMPM-T3), fueron transformados en la cepa EPEC WT portando las fusiones *LEE1-cat* o *LEE2-cat*. Las bacterias fueron crecidas en condiciones de inducción y de represión para cuantificar la actividad de CAT, así como para analizar el perfil de secreción y la expresión de Tir e intimina (Figura 16). En condiciones de inducción, cuando GrIR y GrIA son coexpresadas, GrIR es incapaz de reprimir la expresión de los operones *LEE1* y *LEE2* a diferencia del efecto observado cuando únicamente GrIR está presente en multicopia (Figura

16A). Este resultado coincidió con el ensayo de proteínas secretadas (Figura 16B) y con la expresión de Tir e intimina (Figura 16C). En contraste, en condiciones de represión, GrIA cuando es coexpresada con GrIR no es capaz de activar al mismo nivel las actividades transcripcionales de los operones *LEE1* y *LEE2* respecto de cuando es expresada del pTEPGrIA1 (Figura 16A). Estos resultados fueron consistentes con el ensayo de proteínas secretadas (Figura 16B) y con el Western blot (Figura 16C), en los cuales la secreción de proteínas y la expresión de Tir e intimina fue menor cuando GrIR y GrIA son coexpresadas con respecto al fenotipo observado en presencia del pTEPGrIA1.

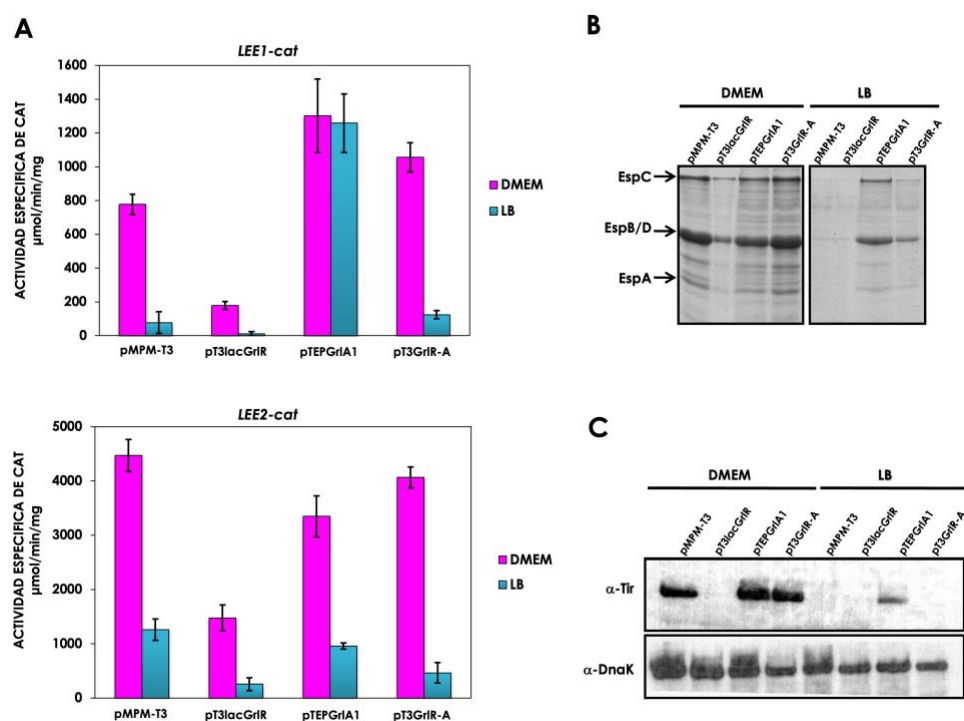


Figura 16. La sobreexpresión de GrIA evita que GrIR reprima a los genes del LEE principalmente en condiciones de inducción. A) Actividad transcripcional de las fusiones *LEE1-cat* y *LEE2-cat* en la cepa EPEC WT en presencia de los plásmidos pMPM-T3, pT3GrIR, pTEPGrIA1 y pT3GrIR-A. Las cepas fueron crecidas en DMEM/37°C (barras rosas) y LB/37°C (barras azules). Los valores son el promedio de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. B) Ensayo de secreción de proteínas a partir de sobrenadantes de cultivos en los medios indicados. C) Western blot de la expresión de Tir, intimina y como controles de carga DnaK (DMEM) y MBP (LB), de extractos totales de las cepas crecidas en las mismas condiciones que en A. Se utilizaron los anticuerpos anti-Tir, anti-intimina y como control de carga anti-DnaK o anti-MBP. Las bacterias fueron cosechadas a una $DO_{600} = 1.0$. B y C ensayos representativos de 3 experimentos independientes. Las barras representan la desviación estándar.

Es importante hacer notar que el efecto positivo observado al coexpresar estas dos proteínas en la cepa EPEC WT, podría ser resultado de que al sobreexpresar a GrIA se incrementa la expresión de Ler nativo, la cual podría desreprimir en mayor grado la expresión de sus genes blanco. Por tal razón, decidimos analizar el efecto de la coexpresión de estas proteínas sobre la actividad transcripcional de los operones *LEE1* y *LEE2* en la cepa *E. coli* K12 Δhns (Figura 17B), tomando en cuenta que GrIR es capaz de modular negativamente la expresión de diferentes promotores del LEE en esta cepa, como se mostró anteriormente (Figura 10). Además, la expresión de la fusión *LEE1-cat* también fue analizada en la cepa *E. coli* K12 WT (Figura 17A) con el objetivo de evaluar si GrIA, expresada a partir de los plásmidos pTEPGrIA1 y pT3GrIRA, activa a la fusión *LEE1-cat*, como es de esperarse de acuerdo con los datos reportados por nuestro grupo (Barba *et al.*, 2005; Jimenez *et al.*, 2010). Al mismo tiempo también se evaluó la expresión de *LEE2-cat* como un control negativo porque GrIA no es capaz de activar dicho operón directamente (Figura 17A) (Barba *et al.*, 2005). Los resultados indican que GrIA es funcional expresada de ambos plásmidos porque activó la expresión de *LEE1-cat* mientras que sobre la transcripción de *LEE2-cat* no tuvo ningún efecto (Figura 17A).

En la cepa MC4100 Δhns , la actividad transcripcional de la fusión *LEE1* en presencia de los plásmidos pTEPGrIA1 o pT3GrIRA, registró niveles de expresión superiores a la actividad mostrada en presencia únicamente del vector (Figura 17B). Esto coincide con el hecho de que GrIA, además de contrarrestar el efecto de H-NS, también favorece la activación del promotor *LEE1* (Jimenez *et al.*, 2010); mientras que, en presencia de pT3GrIR, *LEE1* registró los niveles más bajos de expresión (Figura 17B), reforzando la noción de que GrIR también reprime los promotores del LEE de manera independiente.

Por su parte, la fusión *LEE2-cat* sólo fue reprimida en presencia del pT3GrIR, y no así con el pT3GrIRA (Figura 17B), sugiriendo que GrIA evita la acción represora de GrIR sobre el promotor *LEE2*, ya que éste no es directamente activado por GrIA (Barba *et al.*, 2005; Bustamante *et al.*, 2011). Por tanto, este resultado apoya la

hipótesis de que GrIA contrarresta la represión que GrIR ejerce sobre los genes de la isla.

En conjunto, estos resultados sugieren que, bajo condiciones de inducción, GrIA regula de manera positiva la expresión de los genes de la isla LEE a través de 2 vías: 1) activando la expresión del gene que codifica para el regulador Ler uniéndose a su región reguladora y 2) actuando como un anti-represor al contrarrestar el efecto negativo mediado por GrIR, posiblemente a través de la interacción proteína-proteína. Sin embargo, en condiciones de represión, es posible que el complejo GrIR-GrIA no se forme con la misma eficiencia para evitar que GrIR reprima, o que hay menos cantidad de GrIA, favoreciendo que suficiente GrIR se encuentre libre para reprimir a los genes de la isla LEE, además de titular a la GrIA existente.

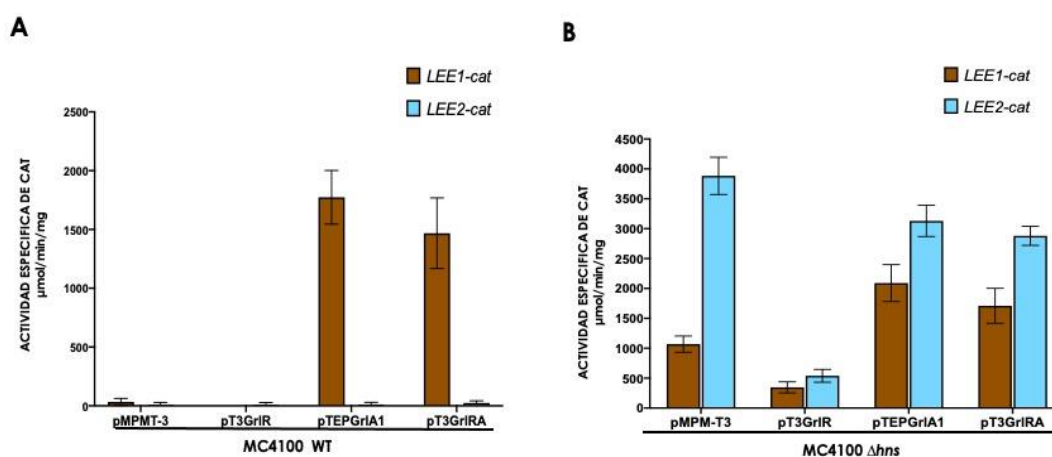


Figura 17. GrIA además de activar a *ler* contrarresta el efecto represor de GrIR. Actividad transcripcional de las fusiones *LEE1-cat* (barras cafés) y *LEE2-cat* (barras azules) en las cepas *E. coli* MC4100 WT (A) y Δhns (B), en presencia de los plásmidos pMPPM-T3, pT3GrIR, pTEPGrIA1 y pT3GrIRA. Las cepas fueron crecidas en DMEM/37°C y las muestras tomadas a una $DO_{600} = 1.0$. Los valores son el promedio de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras representan la desviación estándar.

6.8 El efecto represor de GrIR es contrarrestado por GrIA a través de la interacción proteína-proteína

Con el propósito de explorar qué factor o factores determinan que el efecto represor de GrIR predomine en condiciones de represión a pesar de que GrIA también está presente, evaluamos la posibilidad de que GrIR y GrIA se encuentren

en concentraciones diferentes a pesar de estar codificadas en el mismo operón. Para esto, se trabajó con cepas de EPEC que expresan a las proteínas GrIR, GrIA y Ler etiquetadas con un triple epítoto de FLAG (Tabla 2). La expresión de cada una de estas proteínas fue monitoreada en condiciones de inducción y de represión a lo largo de la curva de crecimiento (Figura 18).

En ambas condiciones, GrIR y GrIA están presentes a lo largo del cultivo, mientras que Ler se observa durante la fase exponencial en condiciones de inducción, mientras que se reduce notoriamente en la fase estacionaria en condiciones de represión (Figura 18). Aunque no podemos considerar que el Western blot detectando el epítoto FLAG es cuantitativo, se logra apreciar una aparente mayor abundancia de GrIR que de GrIA en ambas condiciones de crecimiento (Figura 18), lo cual descarta la posibilidad de que las concentraciones relativas de las proteínas se inviertan dependiendo de la condición de crecimiento. Estos resultados deben ser interpretados con reserva ya que, contrario a lo esperado, a nivel de proteína las diferencias no son muy obvias como para las fusiones transcripcionales entre DMEM y LB (Figura 12). Dichas observaciones sugieren que la expresión del operón *grIRA* no es regulada por la condición de crecimiento, como sucede con el resto de los genes del LEE (ver Figuras 12, 14, 16); sin embargo, no podemos descartar la posibilidad que la etiqueta de FLAG pudiera generar un arteficio al estabilizar a Ler en LB, lo cual resultaría en una mayor inducción del operón *grIRA*.

Otra posibilidad fue estudiar si la regulación diferencial se debía a cambios en la formación del complejo GrIR-GrIA que fueran dependientes de la condición de crecimiento. Para explorar esta noción, analizamos la interacción GrIR-GrIA mediante el sistema de 2 híbridos en bacterias basado en LexA. La cepa de *E. coli* SU202, utilizada para evaluar heterodimerización, fue transformada con los plásmidos pSR659-GrIR/pSR660-GrIA, pSR659-Ler/pSR660-Ler como control positivo, pSR659-PerA/pMI660-PerA como control negativo y con los vectores pSR659/pSR660 (Tabla 2).

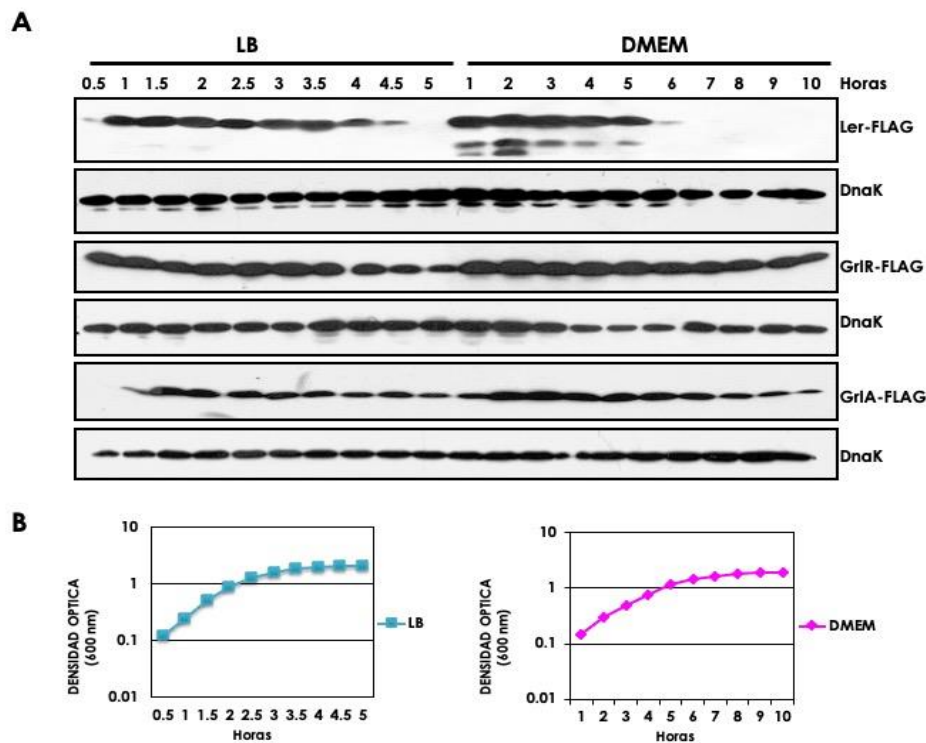


Figura 18. GrIR y GrIA están presentes en EPEC durante toda la fase de crecimiento en condiciones de inducción y de represión de los genes LEE. Las cepas de EPEC con los genes cromosomales *ler*, *grIR* y *grIA* fusionados a un triple epítipo de FLAG, fueron crecidas en los medios DME y LB a 37°C. Muestras de cada cultivo fueron tomadas cada hora durante 10 horas (DMEM) o cada media hora durante 5 horas (LB). A) Western blot detectando las proteínas Ler, GrIR y GrIA etiquetadas con FLAG en extractos totales de las cepas usando un anticuerpo monoclonal anti-FLAG. Como control se evaluó la expresión de DnaK con el anti-DnaK monoclonal. B) Cinética de crecimiento de la cepa EPEC WT en medio LB (panel izquierdo) y DMEM (panel derecho). Los valores fueron obtenidos de 2 experimentos independientes realizados por duplicado.

Las cepas fueron crecidas en DMEM y LB para cuantificar la actividad enzimática de β -galactosidasa, que en este sistema es resultado de la transcripción constitutiva de la fusión *sulA-lacZ*. La coexpresión de las proteínas LexA_{DBD}-GrIR y LexA_{DBD}-GrIA provocó la represión de la fusión *sulA-lacZ* en ambos medios, comparada con su expresión en la cepa control que contiene únicamente los vectores (Figura 19). Las proteínas LexA_{DBD}-Ler expresadas de cada plásmido también provocaron la disminución drástica de la actividad de la fusión en ambos medios (Figura 19), indicando que Ler dimeriza acorde a lo previamente reportado (Sperandio *et al.*, 2000; Mellies *et al.*, 2011); mientras que LexA_{DBD}-PerA no afectó la actividad transcripcional de *sulA-lacZ* (Figura 19), debido a que esta proteína funciona como monómero (Ibarra *et al.*, 2003).

Los resultados de este ensayo sugieren que GrIR y GrIA interactúan independientemente de la condición de crecimiento o, al menos, que en un fondo diferente a EPEC el medio no parece influir dicha interacción. Las diferencias observadas entre LB y DMEM parecen ser inherentes a la respuesta de la fusión *sulA-lacZ* a las condiciones de crecimiento. Queda por determinar cómo se da esta interacción en EPEC.

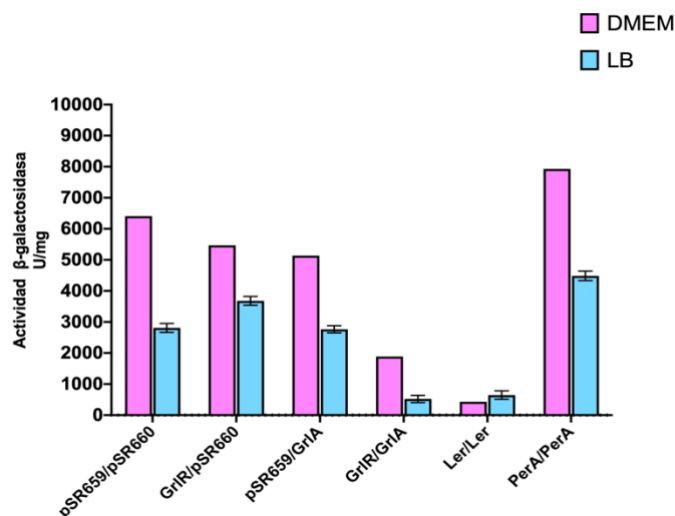


Figura 19. GrIR interactúa con GrIA en un fondo genético distinto de EPEC. Actividad transcripcional de la fusión *sulA-lacZ* en la cepa SU202 transformada con pSR659-pSR660, pSR659-GrIR-pSR660-GrIA, pSR659-Ler-pSR660-Ler y pSR659-PerA-pMI660-PerA. Las cepas con los plásmidos fueron crecidas en medio DMEM y LB suplementado con 0.16 mM de IPTG hasta una $DO_{600} = 1.0$. Los datos en LB representan el promedio de 2 experimentos independientes realizados por duplicado, en DMEM 1 experimento realizado por duplicado debido a dificultades en el crecimiento de las cepas en dicha condición. Las barras representan la desviación estándar.

Con la finalidad de explorar en más detalle la hipótesis anterior, aprovechamos el fenotipo de dos mutantes de GrIA previamente caracterizadas que perdieron la capacidad de activar al operón *LEE1*, así como la de interactuar con el DNA, debido a un cambio de un aminoácido en la región H-T-H (Jimenez *et al.*, 2010). Lo interesante de estas mutantes es que una de ellas, GrIA/I44A, también perdió la capacidad de interactuar con GrIR, y la segunda, GrIA/R54A, no (Jimenez *et al.*, 2010).

Los genes que codifican para estas proteínas GrIA mutantes fueron clonados en el pT3GrIR para coexpresarlas junto con GrIR. Los plásmidos generados pT3GrIRA/I44A y pT3GrIRA/R54A, además del pT3GrIR, pTEPGriA1, pT3GrIRA y

el vector pMPM-T3 se transformaron en EPEC WT. Las cepas fueron crecidas en medio LB suplementado con IPTG para evaluar por Western blot la expresión de GrIR a partir de las diferentes construcciones (Figura 20A). GrIR fue detectada en extractos de todas las cepas que contenían plásmidos con *grlR*, e incluso se logró detectar a GrIR nativa cuando se indujo a GrIA a partir del pTEPGrIA1 (Figura 20A).

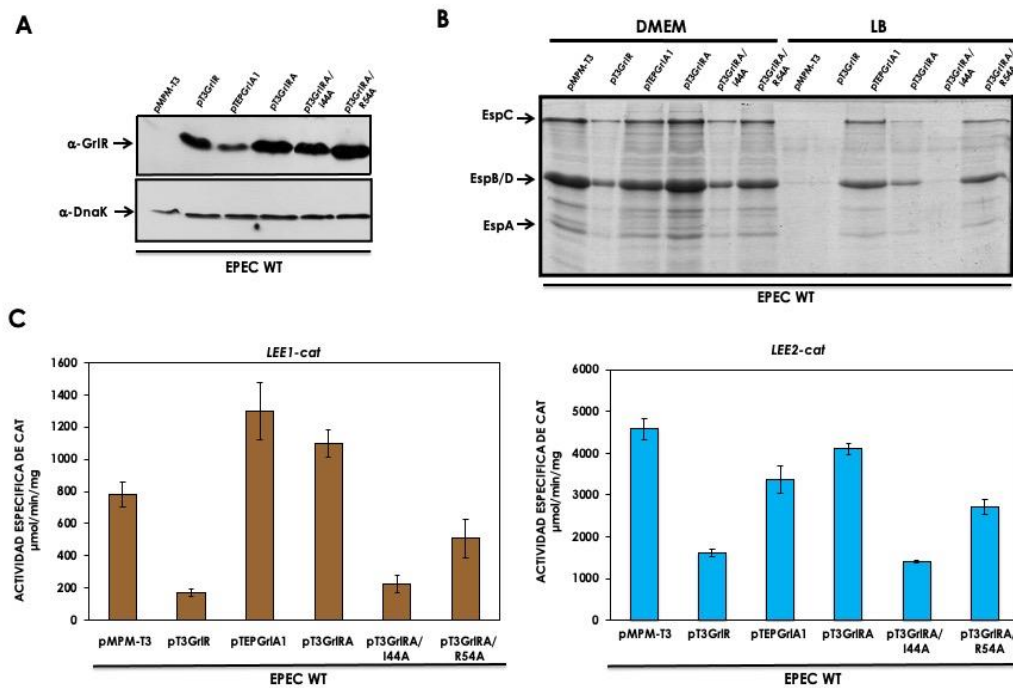


Figura 20. El efecto negativo de GrIR es contrarrestado por GrIA. A) Western blot de la expresión de GrIR en extractos totales de la cepa EPEC WT transformada con los plásmidos pMPM-T3, pT3GrIR, pTEPGrIA1, pT3GrIRA, pT3GrIRA/I44A y pT3GrIRA/R54A. Las cepas fueron crecidas en medio LB a 37°C suplementado con 1 mM de IPTG hasta la $DO_{600} = 1.0$. GrIR fue detectada con el anticuerpo policlonal anti-GrIR y como control de carga se detectó a DnaK con el anticuerpo anti-DnaK. B) Perfil de secreción de proteínas de la cepa EPEC WT transformadas con los mismos plásmidos que en B. Las cepas fueron crecidas en los medios DMEM y LB a $DO_{600} = 1.0$. La imagen es representativa de 3 ensayos independientes. C) Actividad transcripcional de las fusiones *LEE1-cat* y *LEE2-cat* en la cepa EPEC WT en presencia de los mismos plásmidos. Las cepas fueron cultivadas en medio DMEM a $DO_{600} = 1.0$. Los datos representan el promedio de 3 experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras representan la desviación estándar.

Posteriormente, las mismas cepas fueron crecidas en condiciones de inducción y de represión para analizar el efecto de la coexpresión sobre el perfil de proteínas secretadas por la cepa silvestre (Figura 20B). En condiciones de inducción, el perfil de secreción de proteínas en presencia de GrIR-GrIA/I44A fue

similar al perfil de secreción en presencia de únicamente GrIR, ya que en ambos casos la secreción de proteínas se reprimió considerablemente en cultivos en DMEM (Figura 20B). En contraste, en presencia de GrIR-GrIA/R54A, la represión mediada por GrIR se redujo considerablemente, ya que el perfil de secreción fue similar al obtenido en presencia de GrIA o GrIR-GrIA (Figura 20B). Por su parte, en medio LB, donde la cepa silvestre no secreta, se observa una clara desrepresión de la expresión de proteínas codificadas en el LEE, y por tanto de su secreción, en presencia de GrIA, GrIR-GrIA y GrIR-GrIA-R54A, pero no así con GrIR-GrIA/I44A, con la cual la secreción se mantuvo reprimida (Figura 20B). En los dos primeros casos el fenotipo es probablemente consecuencia de la expresión de GrIA silvestre, la cual incrementa los niveles de expresión de *Ler* y, por tanto, del efecto positivo de ésta sobre los genes del LEE aun en condiciones de represión. Sin embargo, resultó muy interesante observar que la mutante GrIA-R54A promueve la secreción de proteínas, mientras que no así GrIA-I44A, sugiriendo que la interacción de GrIA-R54A con GrIR, fue suficiente para anular su efecto negativo (Figura 20B).

Estos resultados fueron reforzados al evaluar el efecto de la coexpresión sobre la actividad transcripcional de las fusiones *LEE1-cat* y *LEE2-cat* en la cepa EPEC WT crecida en condiciones de inducción (Figura 20C), en donde la expresión de ambas fusiones fue mayor en presencia del pT3GrIRA/R54A en comparación a la actividad registrada en presencia del pT3GrIR o pT3GrIRA/I44A (Figura 20C), aunque no alcanzó los niveles mostrados en presencia de pTEPGrIA1 o pT3GrIRA. Al respecto, esto podría suceder porque la proteína GrIA-R54A solo conserva la función de interactuar con GrIR pero no la de activar a *ler*.

Para confirmar las observaciones anteriores, se realizó un experimento similar con la cepa EPEC Δ *grIR* transformada con los mismos plásmidos. En condiciones de represión (crecimiento en LB) donde la cepa EPEC Δ *grIR* muestra un perfil de secreción abundante con respecto a la cepa silvestre, la coexpresión de GrIR con la mutante GrIA-I44A no evita que GrIR complemente el fenotipo de represión y el efecto fue igual al que se observa para la cepa con el pT3GrIR (Figura

21A); sin embargo, este no es el caso para la coexpresión de GrIR con GrIA-R54A (Figura 21A).

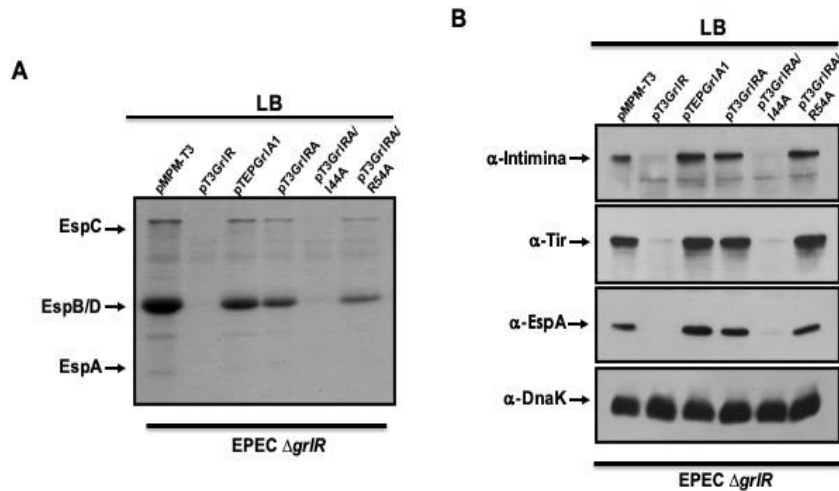


Figura 21. Una mutante de GrIA inactiva para regular a *ler* es capaz de contrarrestar el efecto de GrIR. EPEC $\Delta grlR$ conteniendo los plásmidos pMPM-T3, pT3GrIR, pTEPGrIA1, pT3GrIRA, pT3GrIRA/144A o pT3GrIRA/R54A fue cultivada en medio LB a 37°C hasta una $DO_{600} = 1.0$. A) Perfil de secreción de proteínas. B) Western blot para detectar la expresión de intimina, Tir y EspA en extractos totales. DnaK fue detectada como control. Se utilizaron los anticuerpos anti-intimina, anti-Tir, anti-EspA y anti-DnaK. Las imágenes son representativas de 2 ensayos independientes.

Estos resultados fueron consistentes con el análisis por Western blot de la expresión de las proteínas Tir, intimina y EspA en extractos totales, donde se puede ver que en presencia del pT3GrIRA/144A la expresión de cada una de estas proteínas fue reprimida cuando la bacteria creció en medio LB, pero no así en presencia del pT3GrIRA/R54A (Figura 21B). La expresión de DnaK utilizada como control no fue afectada en presencia de los plásmidos ni por la condición de crecimiento utilizada (Figura 21B).

6.9 El complejo GrIR₂-GrIA está presente en condiciones de inducción y de represión de los genes LEE

Durante la realización de este trabajo se publicó la estructura cristalográfica de GrIR de EHEC que muestra que esta proteína existe como homodímero en solución (Jobichen *et al.*, 2007). Posteriormente, el mismo grupo reportó que dicho dímero interactúa con un monómero de GrIA para formar el heterotrímero GrIR₂-

GrlA, inhibiendo de esta manera a GrlA y evitando que ésta active a *ler* (Jobichen *et al.*, 2007; Padavannil *et al.*, 2013).

Con el propósito de determinar si la condición de crecimiento favorece la formación del heterotrímero o del dímero crecimos a las cepas de EPEC *grlR::FLAG*, *grlA::FLAG*, Δ *grlA grlR::FLAG* y Δ *grlR grlA::FLAG* en condiciones de inducción y de represión. Así mismo, evaluamos la formación de los complejos proteicos en la cepa Δ *grlA grlR::FLAG* portando los plásmidos que codifican para las proteínas mutantes GrlA/I44A y GrlA/R54A. Lisados totales de muestras tomadas de cada cultivo fueron analizados en geles nativos mediante Western blot utilizando anticuerpos contra el epítipo FLAG (Figura 22). Los resultados de este ensayo indican que, bajo condiciones de inducción, GrlR forma complejo con GrlA (banda superior) (Figura 22A; carril 1 y 7), y minoritariamente está presente como dímero y monómero (bandas segunda y tercera, respectivamente). La identidad de cada complejo la confirman los patrones de bandas de los carriles 2 a 4. Cuando la proteína etiquetada es GrlA sólo se observa la banda superior (carril 2), mientras que en ausencia de GrlA, GrlR-FLAG únicamente es observada como dímero y como monómero (carril 3), y en ausencia de GrlR, GrlA-FLAG no se observa (carril 4) porque no entra en este tipo de geles a menos que esté interactuando con GrlR. Esta característica está asociada con el punto isoeléctrico de GrlA. Por su parte, en LB las tres formas de GrlR se distribuyen en cantidades aparentemente similares (Figura 22A, carril 7).

Otros datos obtenidos de este ensayo corroboraron que GrlR en presencia de la proteína GrlA/I44A tiende a formar el homodímero en ambas condiciones de crecimiento debido a que la mutante no fue capaz de formar el complejo con GrlR (Figura 22A, carril 5 y 11). En contraste, cuando GrlA/R54A está presente atrapa a GrlR favoreciendo de manera predominante la formación del complejo GrlR-GrlA/R54A en condiciones de inducción y de represión, evitando o desestabilizando al homodímero y monómero de GrlR (Figura 22A, carril 6 y 12).

Este ensayo fue complementado mediante la detección de las proteínas GrlR y GrlA etiquetadas con el epítipo de FLAG por Western blot, a partir de los mismos

extractos pero separados en condiciones desnaturalizantes, en el que se demostró que todas las proteínas estuvieron presentes en las condiciones analizadas (Figura 22B).

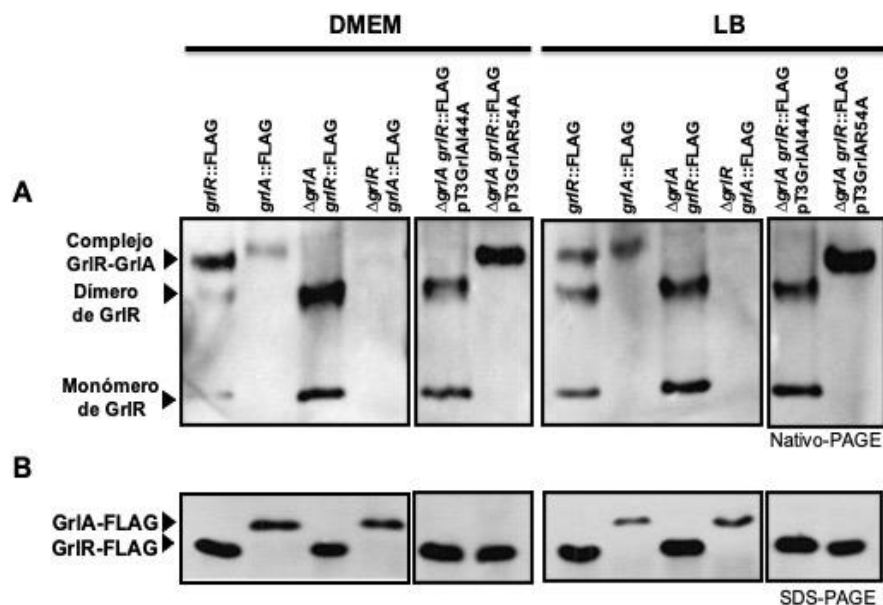


Figura 22. El complejo GrIR₂-GrIA está presente en condiciones de inducción y de represión de los genes LEE en EPEC. Las cepas de EPEC *grIR::FLAG*, *grIA::FLAG*, Δ *grIA* *grIR::FLAG*, Δ *grIR* *grIA::FLAG*, Δ *grIA* *grIR::FLAG* + pT3lacGrIA/I44A y Δ *grIA* *grIR::FLAG* + pT3lacGrIA/R54A fueron crecidas en los medios DMEM y LB a 37°C a DO₆₀₀= 1.0. Western blot contra el epítipo de FLAG de los extractos celulares obtenidos separados mediante PAGE en, A) condiciones nativas y B) desnaturalizantes. Se indican con flechas el complejo GrIR₂-GrIA, el dímero, el monómero de GrIR, GrIA-FLAG y GrIR-FLAG. El epítipo de FLAG fue detectado con el anti-FLAG monoclonal.

7. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los mecanismos que utilizan los patógenos para regular la expresión de sus genes de virulencia representa un tema de gran interés porque favorece la comprensión de las estrategias evolutivas que adoptan los patógenos para sobrevivir dentro del hospedero. De manera específica, el estudio de la regulación de genes de virulencia- que son adquiridos mediante HGT- por proteínas asociadas al nucleoide, fenómeno conocido como silenciamiento xenogénico (Navarre *et al.*, 2007); ha favorecido el entendimiento de cómo dichos genes y sus reguladores específicos, son integrados a redes reguladoras pre-existentes en las bacterias, permitiendo la adaptación a nuevos nichos ecológicos (Navarre, 2016).

La isla de patogenicidad LEE es un ejemplo representativo de un elemento genético adquirido por HGT que está sujeto a silenciamiento xenogénico, así como a la regulación por otros reguladores globales conservados en bacterias no patógenas. A su vez, la isla codifica para reguladores específicos. Ler, contrarresta el silenciamiento xenogénico que establece H-NS sobre los operones de la isla (Elliott *et al.*, 2000; Bustamante *et al.*, 2001; Haack *et al.*, 2003; Barba *et al.*, 2005; Berdichevsky *et al.*, 2005; Bingle *et al.*, 2014), GrlA, activa la expresión del promotor del operón *LEE1* y también actúa como un anti-represor de H-NS sobre este promotor (Barba *et al.*, 2005; Huang and Syu, 2008; Jimenez *et al.*, 2010; Bustamante *et al.*, 2011); y GrlR, un regulador negativo de la expresión de los operones de la isla al interactuar con GrlA y bloquear su interacción con el promotor de *ler* (Lio and Syu, 2004; Iyoda and Watanabe, 2005; Jobichen *et al.*, 2007; Padavannil *et al.*, 2013). Asimismo, estos reguladores controlan la expresión de genes de virulencia ubicados fuera del LEE, lo que indica que durante la evolución de los patógenos AE, dichos reguladores también fueron incorporados a redes de regulación de la bacteria (Elliott *et al.*, 2000; Iyoda *et al.*, 2006; Saitoh *et al.*, 2008; Bingle *et al.*, 2014). En conjunto, estas adaptaciones han favorecido que los organismos AE expresen los genes de la isla en el lugar y momento preciso durante la etapa de infección.

En este trabajo investigamos el papel que GrIR, y su interacción con GrIA, desempeña en la regulación negativa de los genes de la isla LEE. Los resultados obtenidos revelaron características novedosas de su mecanismo de acción.

En primer lugar demostramos que GrIR es un regulador negativo que ejerce un efecto directo sobre la expresión de los operones *LEE1*, *LEE2-LEE3*, *LEE4* y *LEE5*; por lo que su función como represor no es consecuencia únicamente de la interacción con GrIA como ha sido reportado previamente (Lio and Syu, 2004; Jobichen *et al.*, 2007; Padavannil *et al.*, 2013). Esto se definió al expresar a GrIR a partir de un plásmido de mediano número de copias en la cepa EPEC Δhns , en donde reprimió drásticamente las actividades transcripcionales de los operones del LEE analizados, así como la expresión de proteínas codificadas en la isla. Este efecto de represión también alteró el funcionamiento del SST3 debido a que las proteínas de virulencia secretadas por este aparato no fueron visibles en presencia de este regulador en multicopia, incluso la proteína EspC, un autotransportador codificado fuera del LEE que pertenece a la familia del sistema de secreción tipo V y cuya expresión también es regulada por Ler (Mellies *et al.*, 1999; Vidal and Navarro-Garcia, 2008), tampoco fue secretada. Esto podría deberse a la represión de GrIR sobre *ler* que a su vez afecta la expresión de *espC* (Elliott *et al.*, 2000), o bien, porque GrIR podría reprimir directamente a *espC* como ya ha sido demostrado para otros genes que no están codificados en esta isla y que son regulados por este represor (Iyoda *et al.*, 2006; Saitoh *et al.*, 2008).

La relevancia acerca de que GrIR fue capaz de reprimir, incluso en ausencia de H-NS, radica en el hecho de que los operones de la isla LEE en esta condición son transcritos de manera constitutiva, por lo que la expresión de ellos es independiente de las funciones de Ler y por tanto de GrIA, lo que sugirió que GrIR modulaba negativamente los operones del LEE a través de una vía alterna a la interacción con GrIA. Tales datos fueron confirmados al evaluar el efecto de GrIR sobre las fusiones transcripcionales *LEE1-cat* y *LEE2-cat* en la cepa de *E. coli* K12 Δhns (carente de la isla LEE), en donde GrIR en multicopia igualmente reprimió la expresión de ambos operones. Esto confirmó que GrIR es un represor que actúa

directamente sobre la expresión de los operones de la isla LEE, o a través de otra proteína conservada en *E. coli* K12; además del papel que tiene en la interacción con GrIA. El descubrimiento de esta vía que utiliza GrIR fue además consistente con la capacidad para modular negativamente la expresión de las proteínas de la isla, en condiciones de crecimiento de EPEC en donde la función de GrIA no es requerida (DMEM/37°C/estático), y es solo PerC la responsable de favorecer la expresión de *ler* (Bustamante *et al.*, 2011).

En este trabajo también demostramos que la ausencia de *grlR* en EPEC provoca el incremento en la expresión de operones y proteínas del LEE cuando la bacteria es crecida en condiciones que inducen la expresión de los genes de la isla (DMEM/37°C) (Kenny *et al.*, 1997a). Sin embargo, el efecto principal de la ausencia de este regulador es ejercido cuando la bacteria es cultivada en la condición de represión (LB/37°C), debido a que la expresión de los operones y la secreción de proteínas de la isla se desreprimieron drásticamente en ausencia de este regulador comparado con el fenotipo mostrado en la cepa WT. Tales datos coinciden con un estudio publicado por Lio y Syu en 2004, donde demostraron que GrIR de EHEC tiene un efecto predominante como represor cuando la bacteria crece en medio LB comparado con un medio de crecimiento mínimo (Lio and Syu, 2004). La represión que GrIR ejerce sobre los genes de la isla en LB es predominante incluso sobre el efecto negativo que provoca H-NS, esto fue demostrado al evaluar la transcripción de las fusiones a *cat* de *LEE1*, *LEE2* y *LEE5*, los cuales se desreprimieron cerca de 10, 6 y 12 veces respectivamente, en ausencia de GrIR; mientras que en la mutante Δhns solo se desreprimieron 3, 2 y 9 veces, respectivamente.

Para elucidar el panorama acerca de la participación de GrIR y H-NS en la red reguladora de los genes de la isla, evaluamos el efecto de una serie de mutaciones sencillas y dobles en genes que codifican para Ler, H-NS, GrIR y GrIA sobre la expresión de *LEE2-cat* y el perfil de secreción de proteínas de virulencia en las cepas crecidas en condiciones de inducción y de represión. Los resultados obtenidos mostraron que en ausencia de *ler* o *grlA*, la expresión de *LEE2* y la secreción de proteínas se mantienen reprimidas debido al efecto negativo

establecido por H-NS en ambos medios de crecimiento, aun cuando demostramos que en medio LB este represor no tiene un efecto dominante. El mismo fenotipo de represión fue observado cuando además de *grlA* se eliminó a *grlR*, a pesar de que GrIR es el principal represor de los genes de la isla en medio LB, lo que indica que H-NS es el que los mantiene reprimidos debido a la ausencia de GrIA, que a la vez provoca que Ler no se exprese en cantidades suficientes para contrarrestar a H-NS. De manera interesante, la doble mutación en *ler* y *grlR* generó un efecto similar al observado en ausencia solo de *ler*, lo que indica que mientras no sea eliminada la represión por H-NS, incluso en medio LB, el efecto de la ausencia de GrIR sobre los genes de la isla no es liberado. En este sentido, desafortunadamente no pudimos evaluar la doble mutación en *ler* y *hns* debido a defectos en el crecimiento de la cepa, aunque previamente se reportó que los operones del LEE se desreprimen en esta doble mutante (Umanski *et al.*, 2002). Por último, el fenotipo de la doble mutante $\Delta grlR \Delta hns$ fue similar al comportamiento de las cepas con las mutaciones sencillas $\Delta grlR$ y Δhns en medio DME pero no en LB, debido a que la actividad de *LEE2* alcanzó los niveles registrados en ausencia solo de *grlR*, indicando que estos reguladores no tienen un efecto de represión aditivo pero sí indirectamente cooperativo sobre la expresión de los genes de la isla.

Con base en estos resultados, en el presente trabajo proponemos que H-NS y GrIR conforman un mecanismo de regulación negativa integrado por 2 niveles: el primer nivel determinado por el regulador global H-NS que silencia la expresión de los genes cuando la bacteria crece a 30°C y en menor grado a 37°C (Bustamante *et al.*, 2001; Umanski *et al.*, 2002; Bhat *et al.*, 2014); y el segundo nivel protagonizado por GrIR, el regulador local de la isla que reprime la expresión de los genes cuando EPEC crece en un ambiente rico que no es idóneo para su colonización, como el medio LB/37°C *in vitro*. El funcionamiento de este mecanismo es dependiente de la participación de Ler debido a que es requerida para eliminar la represión de H-NS y favorecer la expresión de GrIR.

Al proponer la presencia de este posible mecanismo en la regulación de los genes de la isla surgió la interrogante de cómo sería eliminada la represión por GrIR

al encontrarse la bacteria ante condiciones ambientales ideales para la expresión de sus genes de virulencia. Por obvias razones, en nuestra conjetura la proteína candidata ideal para eliminar dicha represión era GrIA mediante la interacción proteína-proteína ampliamente reportada y, aunque en este trabajo demostramos que GrIR es un represor que también funciona por una vía alterna a la interacción con GrIA, nos dimos a la tarea de investigar si dicha interacción se establecía *in vivo* y, si era así, ¿Qué importancia biológica ejercía en la regulación sobre los genes de la isla?

Para estudiar lo anterior, se generaron una serie de proteínas mutantes con eliminaciones sucesivas de 20 aminoácidos a lo largo de GrIR para identificar regiones importantes para la interacción con GrIA, desafortunadamente todas las mutantes generadas se expresaron en bajas cantidades por lo que no fue posible caracterizar la interacción con GrIA (datos no mostrados).

Otra estrategia que se abordó fue coexpresar GrIA y GrIR a partir de un vector para estudiar el efecto sobre la expresión de los operones y proteínas de LEE en EPEC cultivada en condiciones de inducción y de represión. GrIA contrarresta el efecto negativo de GrIR cuando la bacteria crece en condiciones de inducción, como fue demostrado en un estudio previo con *C. rodentium* (Deng *et al.*, 2004), mientras que bajo condiciones de represión, la función de GrIR no es completamente inhibida por GrIA por lo que es capaz de modular negativamente a los genes del LEE. Esta dominancia de GrIA coexpresada con GrIR en condiciones de inducción no es únicamente efecto del incremento que ejerce sobre Ler y que a su vez active en mayor grado al resto de los genes, sino que también es resultado de la capacidad de GrIA para contrarrestar la represión causada por GrIR. Esto fue demostrado al evaluar el efecto de la coexpresión de estas 2 proteínas sobre la transcripción de las fusiones a *cat* de *LEE1* y *LEE2* en la cepa *E. coli* K12 Δ *hns*, en donde la presencia de GrIA contrarrestó la represión de GrIR y además activó la expresión de *LEE1* como ya fue demostrado en nuestro laboratorio (Jimenez *et al.*, 2010); asimismo GrIA favoreció la expresión de *LEE2*, aun en presencia de GrIR, lo que fue resultado solo por la interacción con GrIR debido a que GrIA no es un activador

de *LEE2* (Barba *et al.*, 2005; Jimenez *et al.*, 2010). Esto indica que en condiciones de inducción GrIA posee un papel dual en la regulación positiva de los genes del LEE, por una parte, contrarresta el efecto de H-NS sobre *ler* (Barba *et al.*, 2005; Jimenez *et al.*, 2010) y, además, actúa como el antagonista de GrIR evitando la represión que éste ejerce sobre los genes de la isla, así estableciendo un circuito de retroalimentación positiva coherente indirecto (Shoval and Alon, 2010). Pero ¿qué determina que en condiciones de represión GrIA no tiene la misma capacidad para contrarrestar el efecto de GrIR?, una posibilidad que planteamos fue que la expresión de las proteínas fuera distinta en función de las condiciones de crecimiento. Sin embargo, encontramos que tanto GrIA como GrIR están presentes durante toda la curva de crecimiento de EPEC en ambas condiciones analizadas y, aunque no logramos precisar la concentración de cada una con respecto de la otra sí fue posible identificar que los 2 reguladores son expresados, GrIR en mayor concentración que GrIA, cuando EPEC crece en ambos medios de crecimiento, no obstante, es posible que la etiqueta con la que se expresan estas proteínas (FLAG) las estabilice. Al respecto, el hecho de que ambas proteínas se encuentren también en LB sugiere que su expresión no es regulada por las mismas condiciones de crecimiento que el resto de los genes de la isla, esto fue confirmado al analizar la transcripción del operón *grIRA* fusionado a *cat* en la cepa WT, crecida en ambos medios de crecimiento (datos no mostrados), en donde la fusión alcanzó niveles similares independientemente de la condición. Estos datos coinciden con un reporte previo en el que identificaron que la expresión del operón *grIRA* es más alta que el resto de los promotores del LEE cuando la bacteria crece en condiciones no inductoras (Yerushalmi *et al.*, 2014). En este mismo sentido, el dato de que GrIR está presente durante toda la curva de crecimiento de EPEC en condiciones de inducción, contrasta con los resultados publicados por Iyoda y Watanabe en el 2005, quienes mostraron que GrIR de EHEC es degradada por el sistema de proteasa ClpXP cuando la bacteria alcanza la fase estacionaria de crecimiento. La razón de dicha diferencia pudiera deberse a mecanismos de regulación que operan de manera distinta en los patógenos AE.

Otra posibilidad que abordamos fue que el complejo GrIR₂-GrIA se formara únicamente en condiciones de inducción, mientras que en represión GrIR estuviera libre para ejercer su efecto. Para demostrarlo, analizamos la formación del complejo *in vivo* mediante el sistema de 2 híbridos en bacterias y encontramos que GrIR y GrIA interactúan en ambas condiciones de crecimiento en el fondo genético de una *E. coli* no patógena. De manera adicional, decidimos utilizar otra estrategia para evaluar el complejo en su ambiente natural, es decir, en la misma cepa de EPEC. Para esto, GrIR fue coexpresada con las proteínas mutantes GrIA/I44A y GrIA/R54A, las cuales tienen la característica de ser inactivas porque no son capaces de activar a *ler*, pero que se diferencian en que la primera no interactúa con GrIR y la segunda sí lo hace (Jimenez *et al.*, 2010). Los resultados indicaron que la coexpresión de GrIR con GrIA/I44A, no inhibió la capacidad de GrIR para reprimir la secreción de proteínas cuando EPEC fue crecida en ambas condiciones de crecimiento, similar a lo observado en presencia solo de GrIR; datos equivalentes fueron obtenidos sobre la expresión de *LEE1* y *LEE2*. En contraste, GrIA/R54A al interactuar con GrIR sí contrarrestó la represión sobre *LEE1*, *LEE2* y sobre la secreción de proteínas en ambas condiciones de crecimiento. Aunque en DMEM la actividad transcripcional de los operones no alcanzó los niveles mostrados en presencia solo de GrIA o cuando se coexpresaron a las proteínas silvestres, el mismo efecto fue observado sobre la secreción de proteínas. Esto se debe a que el fenotipo de la coexpresión de GrIR con GrIA/R54A solo es resultado de la inhibición de la represión por GrIR, mientras que cuando es coexpresada con GrIA silvestre el resultado es la suma de la desrepresión de H-NS vía *Ler* más la inhibición de GrIR y, aunque se expresa más GrIR como lo demostramos por Western blot, también posiblemente la está atrapando, lo que favorece la desrepresión. En cambio, en medio LB, el resultado de la coexpresión con esta mutante fue equivalente al fenotipo mostrado en presencia solo de GrIA, esto es debido a que GrIR es el principal represor en esta condición, por lo que la única función que conserva GrIA/R54A (atrapar a GrIR), es suficiente para desreprimir la secreción de proteínas. En contraste al efecto cuando se coexpresan las proteínas silvestres, en el que además de incrementarse la

cantidad de GrIR en la bacteria provisto por el plásmido, GrIA también favorece la expresión de GrIR nativa, por lo que alcanza tal concentración que GrIA no es capaz de contrarrestar su represión en esta condición.

Con lo anterior aun no podíamos esclarecer qué factor determina que GrIA no contrarreste de manera eficiente la función de GrIR en condiciones de represión. Jobichen *et al.*, 2007 demostraron que el homodímero de GrIR es la forma funcional que utiliza este regulador para reprimir a los genes de la isla y a su vez el dímero interactúa con un monómero de GrIA para formar el heterotrímero (GrIR₂-GrIA). Por tanto, la lógica fue proponer que el homodímero estuviera presente de manera predominante en condiciones de represión. Los análisis de Western blot para identificar complejos proteicos separados por PAGE en condiciones nativas, mostraron que el complejo GrIR₂-GrIA está presente en EPEC cultivada en ambas condiciones de crecimiento (DMEM/37°, LB/37°C), acorde con los resultados del ensayo de 2 híbridos en bacterias y de la coexpresión de GrIR con GrIA mutantes. Mientras que el homodímero de GrIR fue visible también en ambos medios con una banda más intensa en condiciones de represión.

Adicionalmente, el análisis de los complejos con las mutantes GrIA/I44A y GrIA/R54A confirmó que la formación del homodímero de GrIR es favorecido en presencia de GrIA/I44A debido a que no interactúan y desaparece en presencia de GrIA/R54A porque se favorece la formación del heterotrímero sobre la del homodímero. En este sentido, no se descarta que GrIR como monómero pudiera ejercer también la función represora debido a que fue evidente su presencia principalmente en medio LB.

Otra interrogante que surgió fue si el complejo GrIR₂-GrIA resulta en la inhibición de la función GrIA. Los datos obtenidos del efecto de la coexpresión de estas proteínas en una *E. coli* K12 WT y Δ *hns*, indican que GrIA coexpresada con GrIR es una proteína funcional capaz de activar la expresión de *LEE1* a niveles similares a los detectados en presencia solo de GrIA. Aunque en estos casos no podemos asegurar que todas las moléculas de GrIA se encuentren en complejo con GrIR, considerando que solo 1 molécula interactúa con 2 de GrIR (Padavannil *et al.*,

2013). Esto contrasta con los datos presentados por Padavannil *et al.*, 2013, quienes demuestran que MBP-GrlA en complejo con la región reguladora de *LEE1* es desplazada al incrementarse las concentraciones de GrlR y aunque no presentan evidencia que GrlA al despegarse del DNA forma el complejo con GrlR, sí es claro que ya no se une a DNA en presencia de 0.3 μ M de GrlR. Sin embargo, ellos también muestran que cuando se coexpresan GrlR y GrlA a partir de un vector en el fondo genético de EHEC Δ *grlRA*, GrlA es capaz de activar la expresión de Ler y EspB cuando la bacteria crece en condiciones de inducción, datos que coinciden con el reporte de Deng *et al.*, 2004 y apoyan nuestros resultados; aunque discrepan de lo que ellos proponen. Por lo tanto, sería importante analizar las afinidades de unión de GrlA con el DNA y con GrlR para esclarecer estas contradicciones, es probable que una mínima concentración de GrlA sea suficiente para activar el circuito Ler-GrlA y el resto forme el complejo con GrlR.

Por otra parte, el mecanismo que GrlR utiliza para reprimir es todavía desconocido debido a que es una proteína que, aunque se han identificado homólogos en diversas enterobacterias, ninguno ha sido caracterizado en detalle hasta este momento. En este trabajo evaluamos la posibilidad de que GrlR se uniera al DNA de las regiones reguladoras de los operones que reprime, a pesar de que no posee dominios de unión a DNA. Sin embargo, no encontramos interacción con ninguna de las regiones de DNA analizadas bajo las condiciones que utilizamos (datos no mostrados). También abordamos la posibilidad de que interactuara con otros reguladores como H-NS, StpA, Ler, PerC y PerA (datos no mostrados) aunque no encontramos interacción de GrlR con alguno de ellos. Probablemente GrlR reprime mediante la interacción con las subunidades de la maquinaria transcripcional, a través de otra proteína conservada en *E. coli* K12, esto con base a la represión que ejerce sobre los operones de la isla en este fondo genético; o bien, interactúa con el RNA de los genes que regula. Estudios más detallados se requerirán para descifrar su mecanismo de acción.

En conjunto, en este trabajo planteamos un mecanismo de regulación de la expresión de los genes del LEE centrado en la participación de los reguladores

locales codificados en la isla y el represor H-NS (Figura 23). En dicho mecanismo, los genes de la isla están sometidos a 2 niveles de regulación negativa: el primero establecido por el regulador global H-NS y el segundo nivel por el represor local GrIR. Cuando EPEC crece bajo condiciones de inducción de los genes de la isla (DMEM/37°C), Ler contrarresta la represión por H-NS y favorece la expresión del operón *grlRA*, GrIA actúa como un regulador positivo de los genes de la isla debido a que desempeña 2 funciones: 1) desreprime el efecto de H-NS sobre *LEE1* activando el circuito regulador Ler-GrIA que incrementa la transcripción de todos los genes de la isla y, 2) contrarresta la represión que GrIR ejerce sobre los operones atrapándolo en el complejo GrIR₂-GrIA e induciendo la expresión de los operones del LEE (Figura 23). Mientras que en condiciones de represión (medio LB/37°C), Ler contrarresta el silenciamiento por H-NS y favorece la expresión del operón *grlRA*, GrIA desreprime a *LEE1* del efecto de H-NS y se activa nuevamente el circuito Ler-GrIA, sin embargo, el funcionamiento de este circuito no es suficiente para favorecer la expresión de los operones del LEE debido a que GrIR es el principal represor en estas condiciones causando que este segundo nivel de regulación mantenga apagados a los genes de la isla (Figura 23).

En conclusión, las islas de patogenicidad adquiridas por las bacterias les imponen la necesidad de adoptar y adaptar mecanismos reguladores endógenos y exógenos para prevenir la expresión inadecuada de los nuevos genes. Sin embargo, el caso de la isla LEE en los patógenos AE demuestra que estos elementos genéticos también han evolucionado estrategias para asegurar el control apropiado de sus genes, a través de la adquisición de sus propios reguladores negativos como GrIR, con la finalidad de prevenir una expresión temprana que traería consecuencias negativas en la fisiología bacteriana. No obstante, al mismo tiempo adquirió reguladores positivos, Ler y GrIA, para contrarrestar específicamente los efectos de represores propios y de la bacteria (GrIR y H-NS) para favorecer la expresión oportuna de sus genes y proporcionarle de una ventaja competitiva a los patógenos AE.

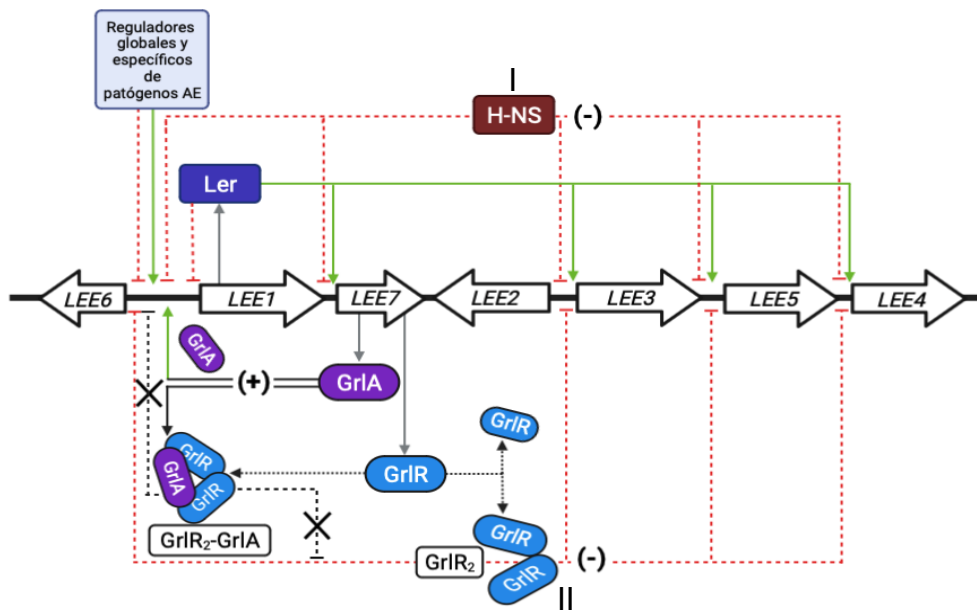


Figura 23. Modelo propuesto del papel de GrIR y del complejo GrIR₂-GrIA en la regulación de los genes de la isla LEE. Ver texto para más detalle. Los números romanos entre paréntesis indican los niveles de regulación negativa: (I) ejercido por H-NS y (II) por GrIR. Las flechas verdes indican vías de regulación positiva, las líneas rojas indican vías de regulación negativa, las líneas grises indican la ubicación de los genes que codifican para las proteínas. Las líneas negras indican la dinámica de los complejos entre los reguladores GrIR y GrIA.

8. PERSPECTIVAS

- I. Determinar el mecanismo que utiliza GrIR para reprimir a los genes de la isla LEE mediante la posible interacción con el complejo de la RNAP, a través de otro factor conservado en *E. coli* K12; o interactuando con los transcritos de los genes que regula.
- II. Evaluar las concentraciones de GrIA y GrIR así como la dinámica de formación de los complejos GrIR₂-GrIA y GrIR₂ en EPEC WT crecida en condiciones de inducción y de represión de los genes LEE.
- III. Evaluar la regulación del operón *LEE7* y las condiciones de crecimiento que determinan la expresión de las proteínas GrIR y GrIA.
- IV. Evaluar si el complejo GrIR₂-GrIA y el homodímero de GrIR juegan el mismo papel en la regulación de otros genes ubicados fuera de la isla LEE.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H., Tatsuno, I., Tobe, T., Okutani, A., and Sasakawa, C.** (2002). Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 70, 3500-3509.
- Azimi, S., Klementiev, A.D., Whiteley, M., and Diggle, S.P.** (2020). Bacterial Quorum Sensing During Infection. *Annu Rev Microbiol* 74, 201-219.
- Baldini, M.M., Kaper, J.B., Levine, M.M., Candy, D.C., and Moon, H.W.** (1983). Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2, 534-538.
- Barba, J., Bustamante, V.H., Flores-Valdez, M.A., Deng, W., Finlay, B.B., and Puente, J.L.** (2005). A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *J Bacteriol* 187, 7918-7930.
- Berdichevsky, T., Friedberg, D., Nadler, C., Rokney, A., Oppenheim, A., and Rosenshine, I.** (2005). Ler is a negative autoregulator of the *LEE1* operon in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187, 349-357.
- Bhat, A.P., Shin, M., and Choy, H.E.** (2014). Identification of high-specificity H-NS binding site in *LEE5* promoter of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *J Microbiol* 52, 626-629.
- Bhatt, S., Egan, M., Ramirez, J., Xander, C., Jenkins, V., Mucche, S., El-Fenej, J., Palmer, J., Mason, E., Storm, E., and Buerkert, T.** (2017). Hfq and three Hfq-dependent small regulatory RNAs-MgrR, RyhB and McaS-coregulate the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Pathog Dis* 75.
- Bhatt, S., Romeo, T., and Kalman, D.** (2011). Honing the message: post-transcriptional and post-translational control in attaching and effacing pathogens. *Trends Microbiol* 19, 217-224.
- Bieber, D., Ramer, S.W., Wu, C.Y., Murray, W.J., Tobe, T., Fernandez, R., and Schoolnik, G.K.** (1998). Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 280, 2114-2118.
- Bingle, L.E., Constantinidou, C., Shaw, R.K., Islam, M.S., Patel, M., Snyder, L.A., Lee, D.J., Penn, C.W., Busby, S.J., and Pallen, M.J.** (2014). Microarray analysis of the Ler regulon in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains. *PLoS One* 9, e80160.
- Bustamante, V.H., Calva, E., and Puente, J.L.** (1998). Analysis of cis-acting elements required for *bfpA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180, 3013-3016.
- Bustamante, V.H., Santana, F.J., Calva, E., and Puente, J.L.** (2001). Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* 39, 664-678.
- Bustamante, V.H., Villalba, M.I., Garcia-Angulo, V.A., Vazquez, A., Martinez, L.C., Jimenez, R., and Puente, J.L.** (2011). PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 82, 398-415.
- Buttner, D.** (2012). Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type III secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 76, 262-310.
- Bäckhed, F., Ley, R.E., Sonnenburg, J.L., Peterson, D.A., and Gordon, J.I.** (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915-1920.
- Campellone, K.G., Giese, A., Tipper, D.J., and Leong, J.M.** (2002). A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the

host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. *Mol Microbiol* 43, 1227-1241.

Casadaban, M.J. (1975). Fusion of the *Escherichia coli lac* genes to the *ara* promoter: a general technique using bacteriophage Mu-1 insertions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 809-813.

Chandry, P.S., Gladman, S., Moore, S.C., Seemann, T., Crandall, K.A., and Fegan, N. (2012). A Genomic Island in *Salmonella enterica* ssp. *salamae* provides new insights on the genealogy of the locus of enterocyte effacement. *PLoS One* 7, e41615.

Chen, H.D., and Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* 29, 83-98.

Clarke, M.B., Hughes, D.T., Zhu, C., Boedeker, E.C., and Sperandio, V. (2006). The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10420-10425.

Clarke, M.B., and Sperandio, V. (2005a). Transcriptional autoregulation by quorum sensing *Escherichia coli* regulators B and C (QseBC) in enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC). *Mol Microbiol* 58, 441-455.

Clarke, M.B., and Sperandio, V. (2005b). Transcriptional regulation of *flhDC* by QseBC and sigma (FliA) in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 57, 1734-1749.

Clarke, S.C., Haigh, R.D., Freestone, P.P., and Williams, P.H. (2003). Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* 16, 365-378.

Cleary, J., Lai, L.C., Shaw, R.K., Straatman-Iwanowska, A., Donnenberg, M.S., Frankel, G., and Knutton, S. (2004). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* 150, 527-538.

Collins, J.W., Keeney, K.M., Crepin, V.F., Rathinam, V.A., Fitzgerald, K.A., Finlay, B.B., and Frankel, G. (2014). *Citrobacter rodentium*: infection, inflammation and the microbiota. *Nat Rev Microbiol* 12, 612-623.

Crane, J.K., Naeher, T.M., Shulgina, I., Zhu, C., and Boedeker, E.C. (2007). Effect of zinc in enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* 75, 5974-5984.

Creasey, E.A., Delahay, R.M., Daniell, S.J., and Frankel, G. (2003). Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 149, 2093-2106.

Croxen, M.A., and Finlay, B.B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8, 26-38.

Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., and Finlay, B.B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 26, 822-880.

Daines, D.A., and Silver, R.P. (2000). Evidence for multimerization of neu proteins involved in polysialic acid synthesis in *Escherichia coli* K1 using improved LexA-based vectors. *J Bacteriol* 182, 5267-5270.

Datsenko, K.A., and Wanner, B.L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6640-6645.

de Grado, M., Abe, A., Gauthier, A., Steele-Mortimer, O., DeVinney, R., and Finlay, B.B. (1999). Identification of the intimin-binding domain of Tir of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 1, 7-17.

Dean, P., Maresca, M., Schuller, S., Phillips, A.D., and Kenny, B. (2006). Potent diarrheagenic mechanism mediated by the cooperative action of three enteropathogenic *Escherichia coli*-injected effector proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1876-1881.

-
- Denamur, E., Clermont, O., Bonacorsi, S., and Gordon, D.** (2021). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 19, 37-54.
- Deng, W., Puente, J.L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B.A., Vazquez, A., Barba, J., Ibarra, J.A., O'Donnell, P., Metalnikov, P., Ashman, K., Lee, S., Goode, D., Pawson, T., and Finlay, B.B.** (2004). Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3597-3602.
- Deng, W., Vallance, B.A., Li, Y., Puente, J.L., and Finlay, B.B.** (2003). *Citrobacter rodentium* translocated intimin receptor (Tir) is an essential virulence factor needed for actin condensation, intestinal colonization and colonic hyperplasia in mice. *Mol Microbiol* 48, 95-115.
- DeVinney, R., Puente, J.L., Gauthier, A., Goosney, D., and Finlay, B.B.** (2001). Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. *Mol Microbiol* 41, 1445-1458.
- Dmitrova, M., Younes-Cauet, G., Oertel-Buchheit, P., Porte, D., Schnarr, M., and Granger-Schnarr, M.** (1998). A new LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 257, 205-212.
- Donnenberg, M.S.** (ed.) (2013). *Escherichia coli*. Pathotypes and Principles of Pathogenesis. Academic Press.
- Donnenberg, M.S., Giron, J.A., Nataro, J.P., and Kaper, J.B.** (1992). A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol Microbiol* 6, 3427-3437.
- Dorman, C.J.** (2004). H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol* 2, 391-400.
- Dorman, C.J.** (2007). H-NS, the genome sentinel. *Nat Rev Microbiol* 5, 157-161.
- Elliott, S.J., Sperandio, V., Giron, J.A., Shin, S., Mellies, J.L., Wainwright, L., Hutcheson, S.W., McDaniel, T.K., and Kaper, J.B.** (2000). The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 68, 6115-6126.
- Elliott, S.J., Wainwright, L.A., McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Deng, Y.K., Lai, L.C., McNamara, B.P., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B.** (1998). The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* 28, 1-4.
- Franzin, F.M., and Sircili, M.P.** (2015). Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation. *Biomed Res Int* 2015, 534738.
- Friedberg, D., Umanski, T., Fang, Y., and Rosenshine, I.** (1999). Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 34, 941-952.
- Garcia-Angulo, V.A., Deng, W., Thomas, N.A., Finlay, B.B., and Puente, J.L.** (2008). Regulation of expression and secretion of NleH, a new non-locus of enterocyte effacement-encoded effector in *Citrobacter rodentium*. *J Bacteriol* 190, 2388-2399.
- Gaytan, M.O., Martinez-Santos, V.I., Soto, E., and Gonzalez-Pedrajo, B.** (2016). Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* 6, 129.
- Giron, J.A., Ho, A.S., and Schoolnik, G.K.** (1991). An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 254, 710-713.

-
- Goldberg, M.D., Johnson, M., Hinton, J.C., and Williams, P.H.** (2001). Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 41, 549-559.
- Gomez-Duarte, O.G., and Kaper, J.B.** (1995). A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 63, 1767-1776.
- Goosney, D.L., DeVinney, R., Pfuetzner, R.A., Frey, E.A., Strynadka, N.C., and Finlay, B.B.** (2000). Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actinin. *Curr Biol* 10, 735-738.
- Grant, A.J., Farris, M., Alefounder, P., Williams, P.H., Woodward, M.J., and O'Connor, C.D.** (2003). Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Mol Microbiol* 48, 507-521.
- Gruenheid, S., DeVinney, R., Bladt, F., Goosney, D., Gelkop, S., Gish, G.D., Pawson, T., and Finlay, B.B.** (2001). Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nat Cell Biol* 3, 856-859.
- Guadarrama, C., Medrano-Lopez, A., Oropeza, R., Hernandez-Lucas, I., and Calva, E.** (2014). The *Salmonella enterica* serovar Typhi LeuO global regulator forms tetramers: residues involved in oligomerization, DNA binding, and transcriptional regulation. *J Bacteriol* 196, 2143-2154.
- Guttman, J.A., Li, Y., Wickham, M.E., Deng, W., Vogl, A.W., and Finlay, B.B.** (2006). Attaching and effacing pathogen-induced tight junction disruption in vivo. *Cell Microbiol* 8, 634-645.
- Guttman, J.A., Samji, F.N., Li, Y., Deng, W., Lin, A., and Finlay, B.B.** (2007). Aquaporins contribute to diarrhoea caused by attaching and effacing bacterial pathogens. *Cell Microbiol* 9, 131-141.
- Haack, K.R., Robinson, C.L., Miller, K.J., Fowlkes, J.W., and Mellies, J.L.** (2003). Interaction of Ler at the LEE5 (*tir*) operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 71, 384-392.
- Hansen, A.M., and Kaper, J.B.** (2009). Hfq affects the expression of the LEE pathogenicity island in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 73, 446-465.
- Hicks, S., Frankel, G., Kaper, J.B., Dougan, G., and Phillips, A.D.** (1998). Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. *Infect Immun* 66, 1570-1578.
- Holmes, A., Lindestam Arlehamn, C.S., Wang, D., Mitchell, T.J., Evans, T.J., and Roe, A.J.** (2012). Expression and regulation of the *Escherichia coli* O157:H7 effector proteins NleH1 and NleH2. *PLoS One* 7, e33408.
- Hu, J., and Torres, A.G.** (2015). Enteropathogenic *Escherichia coli*: foe or innocent bystander? *Clin Microbiol Infect* 21, 729-734.
- Huang, L.H., and Syu, W.J.** (2008). GrlA of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 activates LEE1 by binding to the promoter region. *J Microbiol Immunol Infect* 41, 9-16.
- Humphries, R.M., and Armstrong, G.D.** (2010). Sticky situation: localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to the small intestine epithelium. *Future Microbiol* 5, 1645-1661.
- Hunke, S., Keller, R., and Muller, V.S.** (2011). Signal integration by the Cpx-envelope stress system. *FEMS Microbiol Lett* 326, 12-22.
- Hwang, J., Bieber, D., Ramer, S.W., Wu, C.Y., and Schoolnik, G.K.** (2003). Structural and topographical studies of the type IV bundle-forming pilus assembly complex of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185, 6695-6701.

-
- Ibarra, J.A., Villalba, M.I., and Puente, J.L.** (2003). Identification of the DNA binding sites of PerA, the transcriptional activator of the *bfp* and *per* operons in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 185, 2835-2847.
- Islam, M.S., Bingle, L.E., Pallen, M.J., and Busby, S.J.** (2011). Organization of the LEE1 operon regulatory region of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and activation by GrlA. *Mol Microbiol* 79, 468-483.
- Iyoda, S., Koizumi, N., Satou, H., Lu, Y., Saitoh, T., Ohnishi, M., and Watanabe, H.** (2006). The GrlR-GrlA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and LEE-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 188, 5682-5692.
- Iyoda, S., and Watanabe, H.** (2004). Positive effects of multiple *pch* genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 to HEp-2 cells. *Microbiology* 150, 2357-2571.
- Iyoda, S., and Watanabe, H.** (2005). ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187, 4086-4094.
- Jimenez, R., Cruz-Migoni, S.B., Huerta-Saquero, A., Bustamante, V.H., and Puente, J.L.** (2010). Molecular characterization of GrlA, a specific positive regulator of *ler* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 192, 4627-4642.
- Jobichen, C., Li, M., Yerushalmi, G., Tan, Y.W., Mok, Y.K., Rosenshine, I., Leung, K.Y., and Sivaraman, J.** (2007). Structure of GrlR and the implication of its EDED motif in mediating the regulation of type III secretion system in EHEC. *PLoS Pathog* 3, e69.
- Kenny, B.** (1999). Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol Microbiol* 31, 1229-1241.
- Kenny, B., Abe, A., Stein, M., and Finlay, B.B.** (1997a). Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 65, 2606-2612.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A., and Finlay, B.B.** (1997b). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91, 511-520.
- Kenny, B., Ellis, S., Leard, A.D., Warawa, J., Mellor, H., and Jepson, M.A.** (2002). Coordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. *Mol Microbiol* 44, 1095-1107.
- Kenny, B., and Warawa, J.** (2001). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule does not undergo full modification when introduced into host cells by EPEC-independent mechanisms. *Infect Immun* 69, 1444-1453.
- Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, M.J., Nisan, I., Neves, B.C., Bain, C., Wolff, C., Dougan, G., and Frankel, G.** (1998). A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* 17, 2166-2176.
- Knutton, S., Shaw, R.K., Anantha, R.P., Donnenberg, M.S., and Zorgani, A.A.** (1999). The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. *Mol Microbiol* 33, 499-509.
- Lai, Y., Rosenshine, I., Leong, J.M., and Frankel, G.** (2013). Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 15, 1796-1808.
- Lio, J.C., and Syu, W.J.** (2004). Identification of a negative regulator for the pathogenicity island of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Biomed Sci* 11, 855-863.
-

-
- Luperchio, S.A., Newman, J.V., Dangler, C.A., Schrenzel, M.D., Brenner, D.J., Steigerwalt, A.G. and Schauer, D.B.** (2000). *Citrobacter rodentium*, the causative agent of transmissible murine colonic hyperplasia, exhibits clonality: synonymy of *C. rodentium* and mouse-pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* 38, 4343-4350.
- MacRitchie, D.M., Acosta, N., and Raivio, T.L.** (2012). DegP is involved in Cpx-mediated posttranscriptional regulation of the type III secretion apparatus in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 80, 1766-1772.
- MacRitchie, D.M., Ward, J.D., Nevesinjac, A.Z., and Raivio, T.L.** (2008). Activation of the Cpx envelope stress response down-regulates expression of several locus of enterocyte effacement-encoded genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 76, 1465-1475.
- Martinez-Laguna, Y., Calva, E., and Puente, J.L.** (1999). Autoactivation and environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 33, 153-166.
- Maslowska, K.H., Makiela-Dzvenska, K., and Fijalkowska, I.J.** (2019). The SOS system: A complex and tightly regulated response to DNA damage. *Environ Mol Mutagen* 60, 368-384.
- Mayer, M.P.** (1995). A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* 163, 41-46.
- McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B.** (1995). A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1664-1668.
- McDaniel, T.K., and Kaper, J.B.** (1997). A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K12. *Mol Microbiol* 23, 399-407.
- Mellies, J.L., Barron, A.M., and Carmona, A.M.** (2007a). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infect Immun* 75, 4199-4210.
- Mellies, J.L., Benison, G., McNitt, W., Mavor, D., Boniface, C., and Larabee, F.J.** (2011). Ler of pathogenic *Escherichia coli* forms toroidal protein-DNA complexes. *Microbiology (Reading)* 157, 1123-1133.
- Mellies, J.L., Elliott, S.J., Sperandio, V., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B.** (1999). The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* 33, 296-306.
- Mellies, J.L., Haack, K.R., and Galligan, D.C.** (2007b). SOS regulation of the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189, 2863-2872.
- Mellies, J.L., Platenkamp, A., Osborn, J., and Ben-Avi, L.** (2017). PerC Manipulates Metabolism and Surface Antigens in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol* 7, 32.
- Mellies, J.L., Thomas, K., Turvey, M., Evans, N.R., Crane, J., Boedeker, E., and Benison, G.C.** (2012). Zinc-induced envelope stress diminishes type III secretion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *BMC Microbiol* 12, 123.
- Moon, H.W., Whipp, S.C., Argenzio, R.A., Levine, M.M. and Gianella, R.A.** (1983). Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* 41, 1340-1351.
- Nataro, J.P., Scaletsky, I.C., Kaper, J.B., Levine, M.M., and Trabulsi, L.R.** (1985). Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 48, 378-383.

-
- Navarre, W.W.** (2016). The Impact of Gene Silencing on Horizontal Gene Transfer and Bacterial Evolution. *Adv Microb Physiol* 69, 157-186.
- Navarre, W.W., McClelland, M., Libby, S.J., and 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 Dev* 21, 1456-1471.
- Oropeza, R., Sampieri, C.L., Puente, J.L., and Calva, E.** (1999). Negative and positive regulation of the non-osmoregulated *ompS1* porin gene in *Salmonella typhi*: a novel regulatory mechanism that involves OmpR. *Mol Microbiol* 32, 243-252.
- Padavannil, A., Jobichen, C., Mills, E., Velazquez-Campoy, A., Li, M., Leung, K.Y., Mok, Y.K., Rosenshine, I., and Sivaraman, J.** (2013). Structure of GrlR-GrlA complex that prevents GrlA activation of virulence genes. *Nat Commun* 4, 2546.
- Pakbin, B., Brück, W.M., and Rossen, J.W.A.** (2021). Virulence Factors of Enteric Pathogenic. *Int J Mol Sci* 22.
- Pearson, J.S., Giogha, C., Wong Fok Lung, T., and Hartland, E.L.** (2016). The Genetics of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence. *Annu Rev Genet* 50, 493-513.
- Perna, N.T., Mayhew, G.F., Posfai, G., Elliott, S., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., and Blattner, F.R.** (1998). Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 66, 3810-3817.
- Phillips, N., Hayward, R.D., and Koronakis, V.** (2004). Phosphorylation of the enteropathogenic *E. coli* receptor by the Src-family kinase c-Fyn triggers actin pedestal formation. *Nat Cell Biol* 6, 618-625.
- Puente, J.L., Bieber, D., Ramer, S.W., Murray, W., and Schoolnik, G.K.** (1996). The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol* 20, 87-100.
- Reading, N.C., Torres, A.G., Kendall, M.M., Hughes, D.T., Yamamoto, K., and Sperandio, V.** (2007). A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector involved in remodeling of host actin. *J Bacteriol* 189, 2468-2476.
- Rendon, M.A., Saldana, Z., Erdem, A.L., Monteiro-Neto, V., Vazquez, A., Kaper, J.B., Puente, J.L., and Giron, J.A.** (2007). Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 10637-10642.
- Rosenshine, I., Ruschkowski, S., and Finlay, B.B.** (1996a). Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells. *Infect Immun* 64, 966-973.
- Rosenshine, I., Ruschkowski, S., Stein, M., Reinscheid, D.J., Mills, S.D., and Finlay, B.B.** (1996b). A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *EMBO J* 15, 2613-2624.
- Rothbaum, R.J., Partin, J.C., Saalfield, K., and McAdams, A.J.** (1983). An ultrastructural study of enteropathogenic *Escherichia coli* infection in human infants. *Ultrastruct Pathol* 4, 291-304.
- Saitoh, T., Iyoda, S., Yamamoto, S., Lu, Y., Shimuta, K., Ohnishi, M., Terajima, J., and Watanabe, H.** (2008). Transcription of the *ehx* enterohemolysin gene is positively regulated by GrlA, a global regulator encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 190, 4822-4830.
- Saldana, Z., Erdem, A.L., Schuller, S., Okeke, I.N., Lucas, M., Sivananthan, A., Phillips, A.D., Kaper, J.B., Puente, J.L., and Giron, J.A.** (2009). The *Escherichia coli* common pilus
-

and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. *J Bacteriol* 191, 3451-3461.

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y.

Sanchez-SanMartin, C., Bustamante, V.H., Calva, E., and Puente, J.L. (2001). Transcriptional regulation of the *orf19* gene and the *tir-cesT-eae* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183, 2823-2833.

Sanger, J.M., Chang, R., Ashton, F., Kaper, J.B., and Sanger, J.W. (1996). Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surfaces of infected cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 34, 279-287.

Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016). Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* 14, e1002533.

Serapio-Palacios, A., and Finlay, B.B. (2020). Dynamics of expression, secretion and translocation of type III effectors during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Curr Opin Microbiol* 54, 67-76.

Sharma, V.K., and Zuerner, R.L. (2004). Role of *hha* and *ler* in transcriptional regulation of the *esp* operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* 186, 7290-7301.

Sharp, F.C., and Sperandio, V. (2007). QseA directly activates transcription of LEE1 in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 75, 2432-2440.

Shaw, R.K., Smollett, K., Cleary, J., Garmendia, J., Straatman-Iwanowska, A., Frankel, G., and Knutton, S. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli* type III effectors EspG and EspG2 disrupt the microtubule network of intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 73, 4385-4390.

Shin, S., Castanie-Cornet, M.P., Foster, J.W., Crawford, J.A., Brinkley, C., and Kaper, J.B. (2001). An activator of glutamate decarboxylase genes regulates the expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator, Per. *Mol Microbiol* 41, 1133-1150.

Shoval, O., and Alon, U. (2010). SnapShot: network motifs. *Cell* 143, 326-e321.

Sircili, M.P., Walters, M., Trabulsi, L.R., and Sperandio, V. (2004). Modulation of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence by quorum sensing. *Infect Immun* 72, 2329-2337.

Slater, S.L., Sågfors, A.M., Pollard, D.J., Ruano-Gallego, D., and Frankel, G. (2018). The Type III Secretion System of Pathogenic *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol* 416, 51-72.

Sohel, I., Puente, J.L., Murray, W.J., Vuopio-Varkila, J., and Schoolnik, G.K. (1993). Cloning and characterization of the bundle-forming pilin gene of enteropathogenic *Escherichia coli* and its distribution in Salmonella serotypes. *Mol Microbiol* 7, 563-575.

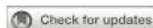
Sohel, I., Puente, J.L., Ramer, S.W., Bieber, D., Wu, C.Y., and Schoolnik, G.K. (1996). Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J Bacteriol* 178, 2613-2628.

Sperandio, V., Mellies, J.L., Delahay, R.M., Frankel, G., Crawford, J.A., Nguyen, W., and Kaper, J.B. (2000). Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler. *Mol Microbiol* 38, 781-793.

Sperandio, V., Mellies, J.L., Nguyen, W., Shin, S., and Kaper, J.B. (1999). Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15196-15201.

Sperandio, V., Torres, A.G., Jarvis, B., Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (2003). Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 8951-8956.

-
- Swimm, A., Bommarius, B., Li, Y., Cheng, D., Reeves, P., Sherman, M., Veach, D., Bornmann, W., and Kalman, D.** (2004). Enteropathogenic *Escherichia coli* use redundant tyrosine kinases to form actin pedestals. *Mol Biol Cell* 15, 3520-3529.
- Tobe, T., and Sasakawa, C.** (2001). Role of bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* in host cell adherence and in microcolony development. *Cell Microbiol* 3, 579-585.
- Tobe, T., Schoolnik, G.K., Sohel, I., Bustamante, V.H., and Puente, J.L.** (1996). Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 21, 963-975.
- Touchon, M., Perrin, A., de Sousa, J.A.M., Vangchhia, B., Burn, S., O'Brien, C.L., Denamur, E., Gordon, D., and Rocha, E.P.** (2020). Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of *Escherichia coli*. *PLoS Genet* 16, e1008866.
- Umanski, T., Rosenshine, I., and Friedberg, D.** (2002). Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 148, 2735-2744.
- Uyar, E., Kurokawa, K., Yoshimura, M., Ishikawa, S., Ogasawara, N., and Oshima, T.** (2009). Differential binding profiles of StpA in wild-type and *h-ns* mutant cells: a comparative analysis of cooperative partners by chromatin immunoprecipitation-microarray analysis. *J Bacteriol* 191, 2388-2391.
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., and Bossi, L.** (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in Salmonella. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 15264-15269.
- Vidal, J.E., and Navarro-Garcia, F.** (2008). EspC translocation into epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli* requires a concerted participation of type V and III secretion systems. *Cell Microbiol* 10, 1975-1986.
- Viswanathan, V.K., Hodges, K., and Hecht, G.** (2009). Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea. *Nat Rev Microbiol* 7, 110-119.
- Wales, A.D., Woodward, M.J., and Pearson, G.R.** (2005). Attaching-effacing bacteria in animals. *J Comp Pathol* 132, 1-26.
- Walters, M., and Sperandio, V.** (2006). Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 74, 5445-5455.
- WHO.** (2019). Diarrhoea.
- Yang, J., Hart, E., Tauschek, M., Price, G.D., Hartland, E.L., Strugnell, R.A., and Robins-Browne, R.M.** (2008). Bicarbonate-mediated transcriptional activation of divergent operons by the virulence regulatory protein, RegA, from *Citrobacter rodentium*. *Mol Microbiol* 68, 314-327.
- Yerushalmi, G., Litvak, Y., Gur-Arie, L., and Rosenshine, I.** (2014). Dynamics of expression and maturation of the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 196, 2798-2806.
- Zhang, Y.J., Li, S., Gan, R.Y., Zhou, T., Xu, D.P., and Li, H.B.** (2015). Impacts of gut bacteria on human health and diseases. *Int J Mol Sci* 16, 7493-7519.



OPEN ACCESS

EDITED BY
Dongsheng Zhou,
Beijing Institute of Microbiology
and Epidemiology, China

REVIEWED BY
Bindu Subhadra,
Long Island University, United States
Ruojun Wang,
Princeton University, United States
Ilan Rosenshine,
The Hebrew University of Jerusalem, Israel

*CORRESPONDENCE
Cristina Lara-Ochoa
✉ cristina.laraochoa@correo.buap.mx
José L. Puente
✉ jose.puente@ibt.unam.mx

SPECIALTY SECTION
This article was submitted to
Infectious Agents and Disease,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

RECEIVED 07 October 2022
ACCEPTED 23 January 2023
PUBLISHED 16 February 2023

CITATION
Lara-Ochoa C, Huerta-Saquero A,
Medrano-López A, Deng W, Finlay BB,
Martínez-Laguna Y and Puente JL (2023) GrIR,
a negative regulator in enteropathogenic
E. coli, also represses the expression of LEE
virulence genes independently of its
interaction with its cognate partner GrIA.
Front. Microbiol. 14:1063368.
doi: 10.3389/fmicb.2023.1063368

COPYRIGHT
© 2023 Lara-Ochoa, Huerta-Saquero,
Medrano-López, Deng, Finlay, Martínez-Laguna
and Puente. This is an open-access article
distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use,
distribution or reproduction in other forums is
permitted, provided the original author(s) and
the copyright owner(s) are credited and that the
original publication in this journal is cited, in
accordance with accepted academic practice.
No use, distribution or reproduction is
permitted which does not comply with
these terms.

GrIR, a negative regulator in enteropathogenic *E. coli*, also represses the expression of LEE virulence genes independently of its interaction with its cognate partner GrIA

Cristina Lara-Ochoa^{1,2*}, Alejandro Huerta-Saquero^{1,3},
Abraham Medrano-López¹, Wanyin Deng⁴, B. Brett Finlay⁴,
Ygnacio Martínez-Laguna⁵ and José L. Puente^{1*}

¹Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México, ²Centro de Detección Biomolecular, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México, ³Departamento de Bionanotecnología, Centro de Nanociencias y Nanotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Ensenada, México, ⁴Michael Smith Laboratories, Department of Microbiology and Immunology, and Biochemistry and Molecular Biology, University of British Columbia, Vancouver, BC, Canada, ⁵Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México

Introduction: Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) and *Citrobacter rodentium* (CR) belong to a group of pathogens that share the ability to form “attaching and effacing” (A/E) lesions on the intestinal epithelia. A pathogenicity island known as the locus of enterocyte effacement (LEE) contains the genes required for A/E lesion formation. The specific regulation of LEE genes relies on three LEE-encoded regulators: Ler activates the expression of the LEE operons by antagonizing the silencing effect mediated by the global regulator H-NS, GrIA activates *ler* expression and GrIR represses the expression of the LEE by interacting with GrIA. However, despite the existing knowledge of LEE regulation, the interplay between GrIR and GrIA and their independent roles in gene regulation in A/E pathogens are still not fully understood.

Methods: To further explore the role that GrIR and GrIA in the regulation of the LEE, we used different EPEC regulatory mutants and *cat* transcriptional fusions, and performed protein secretion and expression assays, western blotting and native polyacrylamide gel electrophoresis.

Results and discussion: We showed that the transcriptional activity of LEE operons increased under LEE-repressing growth conditions in the absence of GrIR. Interestingly, GrIR overexpression exerted a strong repression effect over LEE genes in wild-type EPEC and, unexpectedly, even in the absence of H-NS, suggesting that GrIR plays an alternative repressor role. Moreover, GrIR repressed the expression of LEE promoters in a non-EPEC background. Experiments with single and double mutants showed that GrIR and H-NS negatively regulate the expression of LEE operons at two cooperative yet independent levels. In addition to the notion that GrIR acts as a repressor by inactivating GrIA through protein-protein interactions, here we showed that a DNA-binding defective GrIA mutant that still interacts with

GrlR prevented GrlR-mediated repression, suggesting that GrlA has a dual role as a positive regulator by antagonizing GrlR's alternative repressor role. In line with the importance of the GrlR-GrlA complex in modulating LEE gene expression, we showed that GrlR and GrlA are expressed and interact under both inducing and repressing conditions. Further studies will be required to determine whether the GrlR alternative repressor function depends on its interaction with DNA, RNA, or another protein. These findings provide insight into an alternative regulatory pathway that GrlR employs to function as a negative regulator of LEE genes.

KEYWORDS

EPEC, type III secretion, LEE regulation, GrlR, GrlA, transcription, A/E pathogens, CAT reporter assay

Introduction

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is one of the main etiological agents of severe diarrhea in children under 2 years of age, predominantly in developing countries (Pearson et al., 2016). EPEC, enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) and *Citrobacter rodentium* belong to a group of pathogens that possess the ability to induce a unique histopathological lesion known as attaching and effacing (A/E) (Croxen and Finlay, 2010). The localized destruction of the microvilli of intestinal epithelial cells followed by rearrangements of the cytoskeleton beneath the site of bacterial adherence, leading to the formation of actin-rich cup-like structures that favor an intimate interaction between the bacterium and the host cell, are hallmarks of this lesion (Spears et al., 2006; Frankel and Phillips, 2008).

Most genes required for A/E lesion formation are located within a pathogenicity island known as the locus of enterocyte effacement (LEE) (Gaytan et al., 2016). The LEE region contains five polycistronic operons (*LEE1-LEE5*), two bicistronic operons (*espG-rorf1* and *grlRA*) and four transcriptional units (*etgA*, *cesF*, *map*, and *escD*). *LEE1* to *LEE3* encode the structural components of a type III secretion system (T3SS) responsible for translocating effector proteins into the enterocyte. The *LEE4* operon codes for translocator proteins (EspA, B, D), and *LEE5* encodes proteins involved in the intimate attachment (intimin and Tir). Genes encoding effector proteins, chaperones and transcriptional regulators are distributed within and outside the LEE (Pearson et al., 2016; Serapio-Palacios and Finlay, 2020). The cooperative action of the EPEC translocated effector proteins leads to cytoskeleton rearrangements, increased cell permeability, decreased absorption of ions and nutrients, alterations of tight junctions and modulation of the inflammatory response in the host intestinal cells and thus diarrheal disease (Guttman and Finlay, 2008; Croxen et al., 2013).

In A/E bacteria, the LEE pathogenicity island is a distinctive example of a genetic element whose expression is controlled by a complex network of global (ancestral) and horizontally acquired regulatory proteins in response to a wide variety of environmental factors (Furniss and Clements, 2018; Platenkamp and Mellies, 2018). One of the main regulatory mechanisms involved in controlling LEE gene expression is the xenogeneic silencing exerted by H-NS (Bustamante et al., 2001). As described in different enterobacteria, H-NS specifically silences gene transcription by binding to AT-rich DNA sequences of exogenous origin to maintain cell integrity but also contributes to the acquisition of beneficial sequences (Navarre, 2016). Interestingly, within the LEE, the first gene of the *LEE1* operon

encodes Ler (LEE-encoded regulator), a protein belonging to the H-NS family of nucleoid-associated proteins, which is the central positive regulator controlling the expression of *LEE* genes, and genes located outside the LEE, by counteracting the silencing effect exerted by H-NS on the LEE operons (Elliott et al., 2000; Sperandio et al., 2000; Bustamante et al., 2001; Sanchez-SanMartin et al., 2001; Haack et al., 2003; Barba et al., 2005; Bingle et al., 2014). Due to its essential role, modulation of *LEE1* operon expression is key for activating or repressing all the LEE genes and non-LEE co-regulated genes; thus, its regulation is complex and multifactorial (Furniss and Clements, 2018; Platenkamp and Mellies, 2018; Turner et al., 2019).

The LEE encodes two additional regulatory proteins: GrlA (Global regulator of LEE-activator) and GrlR (Global regulator of LEE-repressor). GrlA shares homology with a small number of predicted uncharacterized proteins in different bacterial species and with CaiF, an activator of genes involved in carnitine utilization (Deng et al., 2004; Jimenez et al., 2010). A predicted helix-turn-helix (HTH) motif is found at the N-terminus of these proteins, where most of the conservation is observed. GrlA binds to the *ler* promoter to positively regulate its expression (Huang and Syu, 2008; Jimenez et al., 2010; Bustamante et al., 2011; Padavannil et al., 2013), while Ler also induces the *grlRA* operon establishing a positive regulatory loop that enhances LEE gene expression under inducing conditions (Barba et al., 2005). Point mutations at the HTH motif affect the activation function of GrlA (Jimenez et al., 2010; Islam et al., 2011; Padavannil et al., 2013). Moreover, GrlA is present in the cell in a membrane-associated inactive state that responds to mechanical stimuli (Alsharif et al., 2015; Sirisaengtaksin et al., 2020).

In contrast, GrlR acts as a repressor by forming a dimeric structure of antiparallel beta-barrel subunits with a molecular mass of 29 kDa, which exerts its function as a negative regulator through the interaction with the HTH motif of GrlA, forming a complex with a molecular mass of 47.3 kDa that prevents the activation of the *ler* promoter (Deng et al., 2004; Lio and Syu, 2004; Iyoda and Watanabe, 2005; Jobichen et al., 2007; Jimenez et al., 2010; Padavannil et al., 2013). Orthologs of GrlR are found in species of the genera *Proteus*, *Morganella*, *Serratia*, *Klebsiella* and *Salmonella*, among others, sharing between 30 to 42% identity; however, these GrlR orthologs are hypothetical proteins with no assigned function yet. The ClpXP complex, an AAA + protease, positively controls LEE gene expression in EHEC through direct regulation of GrlR levels during the stationary phase of growth (Iyoda and Watanabe, 2005). Moreover, Hfq, an RNA chaperone, together with the small

RNAs MgrR, RyhB and McaS, negatively modulate LEE gene expression in EPEC at the post-transcriptional level by destabilizing the *grlRA* mRNA and, consequently, the expression of GrlR and GrlA (Hansen and Kaper, 2009; Bhatt et al., 2017; Sudo et al., 2022). Furthermore, GrlA and GrlR also regulate the expression of genes located outside the LEE, such as the hemolysin and flagellar genes in EHEC (Iyoda et al., 2006; Saitoh et al., 2008), as well as some non-LEE encoded effector genes in EPEC (Garcia-Angulo et al., 2012), indicating that during the evolution of A/E organisms other genes were incorporated into the Ler-GrlRA regulatory network to coordinate other functions that enhanced the pathogenic capabilities of these bacteria.

Despite the current knowledge, the mechanisms underlying the interplay between GrlA and GrlR in regulating LEE and non-LEE genes under different environmental conditions are still poorly understood. In this work, we show that in addition to the notion that GrlR functions as a repressor by forming a complex with GrlA, it can also act as a repressor of LEE genes independently of this interaction, while GrlA has a dual role as a positive regulator by also antagonizing GrlR through protein-protein interactions. Our data further illustrate that LEE gene expression is negatively regulated at two levels mediated by global (H-NS) and EPEC-specific (GrlR) regulators.

Materials and methods

Bacterial strains, plasmids, and culture conditions

The bacterial strains and plasmids used in this study are listed in [Supplementary Table 1](#). Bacteria were routinely cultured in Lysogeny Broth (LB) or in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing glucose [0.45% (wt/vol)] and L-glutamine (584 mg/l), but not sodium pyruvate (Gibco-BRL Life Technologies, Waltham, MA, USA), supplemented with 1% LB. When necessary, antibiotics were added at the following concentrations: kanamycin (Km) 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$, ampicillin (Ap) 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$, tetracycline (Tc) 12 $\mu\text{g ml}^{-1}$, streptomycin (Sm) 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and chloramphenicol (Cm) 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$. To induce the expression of the LEE virulence genes, bacteria were grown either in 50 ml DMEM under shaken or static + 5% CO₂ conditions at 37°C, while shaken LB broth was used as the non-inducing or repressing condition (Martinez-Laguna et al., 1999; Bustamante et al., 2001, 2011).

DNA manipulations

Standard genetic and molecular techniques were applied as described previously (Sambrook and Russell, 2001). Restriction enzymes were obtained from Thermo Scientific, Waltham, MA, USA and used according to the manufacturer's instructions. PCR reactions were performed in 50 μl using Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen, Waltham, MA, USA). The oligonucleotides used for PCR amplification were synthesized at the Oligonucleotide Synthesis Facility of the Instituto de Biotecnología/UNAM, Cuernavaca, México, and are listed in [Supplementary Table 2](#).

Construction of plasmids

To construct the pT3GrlR plasmid, a DNA sequence including the RBS and the coding region of *grlR* was amplified by PCR using the GREPKE-F/GREPX-R oligonucleotide pair. The product obtained was digested with *KpnI-XhoI* enzymes and ligated into vector pMPM-T3 (Mayer, 1995), digested with the same enzymes. To generate plasmids pT3GrlRA, pT3GrlRA/I44A, and pT3GrlRA/R54A fragments were amplified by PCR with the oligonucleotides XHINTERGRLAF/HIGRLAR ([Supplementary Table 2](#)), using plasmids pTEPGrlA1, pTEPGrlA1/I44A, and pTEPGrlA1/R54A as templates (Jimenez et al., 2010), respectively. The resulting products were digested with *XhoI-HindIII* and cloned into the pT3GrlR plasmid digested with the same enzymes.

The pDnaK-CAT plasmid was constructed by PCR amplifying a fragment comprising from position -394 to +127 of the transcription start site of the *dnaK* gene, using the DnaKF/DnaKR oligonucleotides. The product was digested with *BamHI-HindIII* enzymes and cloned into the pKK232-8 vector (Pharmacia Biotech) (Brosius, 1984), previously digested with the same enzymes.

Chromosomal DNA from the EPEC E2348/69 strain was used as the PCR template. All plasmids generated were verified by DNA sequencing and evaluated for their ability to complement the corresponding mutants through a profile of secreted proteins or western blotting against virulence proteins.

Construction of mutants and strains expressing FLAG-tagged proteins

The *grlR* and *grlA* mutants were produced by generating chromosomal in-frame deletions of *grlR* codons 6 to 118 or *grlA* codons 6 to 132 by the *sacB* gene-based allelic exchange method as described previously (Edwards et al., 1998). Deletion of the *grlRA* operon spans from codon 6 of *grlR* to codon 132 of *grlA*. Suicide plasmids were generated by cloning PCR-amplified fragments containing the described deletions flanked by approximately 800 to 1000 bp on each side into *XbaI/SacI*-digested plasmid pRE112. The resulting suicide plasmids pRE112DgrlREP, pRE112DgrlAEP, and pRE112DgrlRAEP, respectively ([Supplementary Table 1](#)), were conjugated into strains WT EPEC E2348/69, Δhns (JPEP36) and Δler to generate single and double mutants ([Supplementary Table 1](#)).

To generate the chromosomally 3xFLAG-tagged strains, a modification of the λ Red recombinase system was used as described previously (Datsenko and Wanner, 2000; Uzzau et al., 2001). The PCR fragment to tag the native *grlR* gene was generated using oligonucleotides grlR-FLAGH1P1 and grlR-FLAGH2P2 and the *grlA* gene using oligonucleotides grlA-FLAGH1P1 and grlA-FLAGH2P2, and plasmid pSUB11 DNA as template. The resulting PCR products were electroporated into WT EPEC or its $\Delta grlR$ or $\Delta grlA$ mutants to generate the EPEC *grlR*:3xFLAG, *grlA*:3xFLAG, *grlR*:3xFLAG $\Delta grlA$ and $\Delta grlR$ *grlA*:3xFLAG ([Supplementary Table 1](#)).

Single and double mutants were verified by PCR amplification and DNA sequencing. The tagged strains contain the tag in their native gene chromosomal locations; thus, are expressed from the *grlRA* operon promoter.

CAT assay

Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity, derived from the expression of the transcriptional fusions to the *cat* reporter gene, was determined as follows (Martinez-Laguna et al., 1999). The strains containing the transcriptional fusions were grown in 5 ml of LB supplemented with antibiotics and incubated overnight at 37°C. The next day, culture pellets were adjusted to an OD₆₀₀ = 1.0 with 1X phosphate buffered saline (PBS) (10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl and 2.7 mM KCl) and used to inoculate 50 ml of LB or DMEM supplemented with antibiotics with one ml of each suspension. Cultures were incubated at 37°C under shaking or static plus 5% CO₂ growth conditions, and 1 ml samples were collected when the cultures reached an OD₆₀₀ = 0.8 and 1.0. The cell pellet was obtained by centrifugation at 14,000 rpm for 2 minutes and washed with 1 ml of TDTT buffer (Tris-HCl 50 mM pH 7.8 and dithiothreitol 30 μM), centrifuged again and resuspended in 0.5 ml of the same buffer. Lysis was achieved by sonication for 5 min with pulses of 10 s per minute and 5 s rest. Soluble extracts were separated from cell debris by centrifugation at 12,000 rpm for 20 min at 4°C, and 5 μl aliquots of each extract were added in duplicate to a 96-well microtiter plate followed by the addition of 200 μl of the reaction mix containing 1 mM DTNB [5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)] (Research Organics), 0.1 mM Tris-HCl pH 7.8, 0.1 mM acetyl-CoA (Pharmacia LKB Biotech Inc., Alameda, CA, USA), and 0.1 mM chloramphenicol (Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA). Changes in absorbance at 410 nm were recorded every 5 s for 5 min with a CERES 900C automatic microplate reader and the KC3 program set to kinetic mode. A CAT standard curve (from 0 to 2500 U/ml) was used to interpolate the activities of each sample. The protein concentration of each extract was determined by adding 10 μl of each extract in duplicate and 200 μl of the reaction mixture (25 ml of solution A + 500 μl of solution B) of the "BCA Protein Assay Kit" (Pierce) to a 96-well plate. Then incubated at 37°C for 30 min; the absorbance was read at a wavelength of 562 nm using an automatic microplate reader CERES 900 C and the KC3 program. The CAT-specific activity was determined by dividing the CAT activity by the protein concentration of each extract. The data are expressed as μmol/min/mg of protein and are the results from at least three independent assays done in duplicate. The empty vector pKK232-8 did not show measurable levels of CAT activity in any of the strains used in the study (data not shown).

Protein secretion assay

EPEC secreted proteins were analyzed as described previously (Deng et al., 2004). Briefly, bacterial cultures in LB and DMEM were incubated at 37°C under shaking or static conditions. Triplicate 1.5 ml samples were collected per culture when the cultures reached an OD₆₀₀ of 1.0 and were subjected to centrifugation at 17,900 × g for 5 min in Eppendorf tubes. Bacterial pellets were saved when convenient, and 1.3 ml of each supernatant was separated into fresh tubes and 160 μl of 100% trichloroacetic acid (TCA) was added per tube. Proteins were allowed to precipitate at 4°C overnight. Subsequently, the proteins were concentrated by centrifugation at 20,000 × g for 30 min and resuspended in 10 μl of 1× Laemmli loading buffer and the triplicate samples were mixed in the same tube, boiled for 5 min and resolved by 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE).

Western blotting

Bacteria were grown in DMEM or LB under shaking or static conditions until they reached an OD₆₀₀ of 1. Total extracts were obtained from 3 ml samples of the bacterial cultures. Cells were resuspended in 500 μl of urea solution (8 M) and lysed by sonication. Aliquots of total extracts were mixed with Laemmli buffer, boiled for 5 min and analyzed by SDS-PAGE (12% acrylamide) and, subsequently, transferred to 0.45-μm-pore-size PVDF membrane (Millipore) using a semi-dry transfer chamber (BioRad, Hercules, CA, USA).

The membrane was blocked in 10% non-fat milk and incubated with one of the following primary antibodies: a 1:10,000 dilution of monoclonal anti-Tir, a 1:7,500 dilution of polyclonal anti-intimin (kindly provided by J.A. Giron), a 1:20,000 dilution of polyclonal anti-EspA (kindly provided by J. Kaper), a 1:10,000 dilution of polyclonal anti-EscJ (kindly provided by Dr. Bertha González-Pedrajo), a 1:5,000 dilution of monoclonal anti-FLAG M2 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), a 1:15,000 dilution of polyclonal anti-maltose binding protein (MBP) (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), a 1:10,000 dilution of polyclonal anti-DnaK (Invitrogen, Waltham, MA, USA) and a 1:50,000 dilution of monoclonal anti-GroEL (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). The membrane was washed with 1x phosphate buffer saline (PBS) containing 0.05% Tween 20 and incubated with a 1:10,000 dilution of secondary anti-rabbit or anti-mouse antibodies coupled to horseradish peroxidase (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The membrane was developed with the commercial kit "Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus" (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) according to the manufacturer's instructions.

Native gel electrophoresis

EPEC E2348/69 *griR*:3xFLAG, *griA*:3xFLAG, Δ *griR* *griA*:3xFLAG, and *griR*:3xFLAG Δ *griA* strains were transformed with pT3GrlA1/144A or pT3GrlA1/R54A and grown overnight in 5 ml of LB medium supplemented with antibiotics. The next day, 0.5 ml of these cultures were inoculated into 20 ml DMEM or LB medium supplemented with antibiotics and allowed to grow at 37°C with shaking. When the cultures reached an OD₆₀₀ of 1.0, 5 ml samples were taken and the cells were concentrated by centrifugation at 18,000 ×g at 4°C, resuspended in 500 μl PBS and lysed by sonication. Samples were taken at an OD₆₀₀ of 0.3, 0.6, 0.8, and 1.0 from 50 ml cultures when needed.

Total extracts were resuspended in a non-denaturing buffer (50% glycerol, 25 mM Tris-HCl pH 6.8 and 0.05% bromophenol Blue) and separated by 12% native PAGE at 4°C. The gel was transferred to a 0.45-μm-pore-size PVDF membrane (Millipore) and processed for western blotting.

Simultaneously, aliquots obtained from the same assays were processed for 12% SDS-PAGE and western blotting.

Statistical analysis

Data analyses were performed by two-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons posttest using GraphPad Prism version 8.4.3 (471) for Mac OS. *P*-values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

GrIR negatively regulates LEE gene expression under repression conditions

GrIR represses LEE gene expression mainly under non-permissive conditions such as growth in LB (Deng et al., 2004; Lio and Syu, 2004; Iyoda and Watanabe, 2005). To further explore this feature, we evaluated the expression of the *LEE1*, *LEE2*, *LEE4*, *LEE5*, and *dnaK* promoters fused to the *cat* reporter gene in WT EPEC E2348/69 and its Δ *grIR* non-polar deletion mutant cultured under LEE inducing (DMEM/37°C) and repressing (LB/37°C) growth conditions. Under inducing conditions, the CAT reporter activity of all LEE fusions increased between 1.5- to 4-fold in EPEC Δ *grIR* compared to the WT strain (Figure 1A); however, under repression conditions, the fold increase was higher, between 5 and 13.5 (Figure 1A). In contrast, *dnaK-cat* expression, used as a LEE unrelated control, was similar in both strains and growth conditions (Figure 1A).

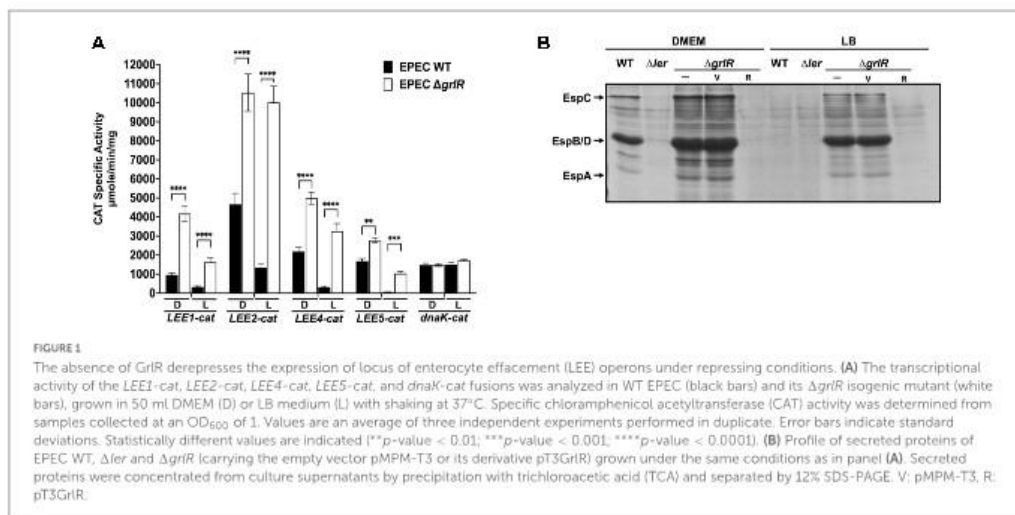
The analysis of the T3SS-dependent protein secretion profile of WT, Δ *grIR* and Δ *ler* EPEC strains showed that, under repressing conditions (LB), the Δ *grIR* mutant abundantly secreted proteins into the medium, while the WT strain did not secrete detectable levels of LEE-encoded proteins (Figure 1B). This phenotype reversed by complementing the mutant strain with a plasmid containing the *grIR* gene (pT3GrIR) (Figure 1B). Growth under inducing conditions (DMEM) allowed secretion of LEE-encoded proteins by the WT strain and higher secretion levels by the Δ *grIR* strain. Moreover, complementing the Δ *grIR* mutant with the pT3GrIR plasmid suppressed protein secretion, even under inducing conditions (DMEM), indicating that GrIR overexpression can override the presence of GrIA under T3S permissive conditions (Figure 1B). As expected, the Δ *ler* mutant did not secrete under both growth conditions.

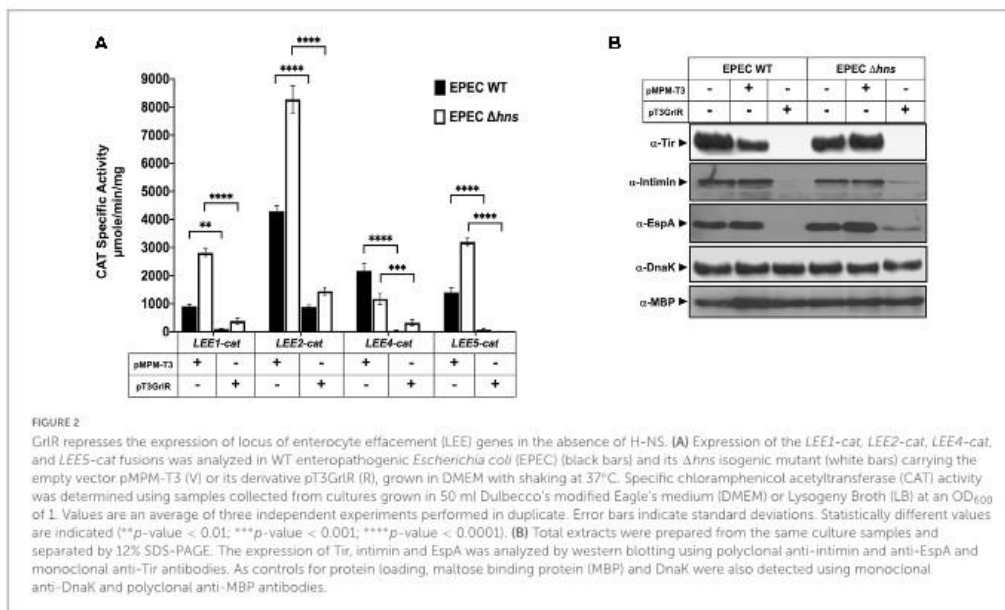
These results highlight the negative regulatory effect that GrIR exerts on the LEE genes in agreement with previous reports (Deng et al., 2004; Lio and Syu, 2004; Iyoda and Watanabe, 2005).

GrIR represses the expression of LEE operons in the absence of H-NS

H-NS globally represses LEE-gene expression, while Ler acts as an antagonist to overcome this repression; thus, in the absence of H-NS, the role of Ler is dispensable (Friedberg et al., 1999; Leh et al., 2017; Shin, 2017). Moreover, GrIR expression from a plasmid strongly represses the expression of the LEE genes in WT EPEC even under conditions permissive to LEE expression (Deng et al., 2004; Lio and Syu, 2004; Jobichen et al., 2007). Evidence showing that GrIR and GrIA establish protein-protein interactions led to propose that GrIR negatively regulates LEE gene expression by preventing GrIA from binding to and activating the *ler* promoter (Creasey et al., 2003; Jobichen et al., 2007; Jimenez et al., 2010; Padavannil et al., 2013).

Based on such evidence, we hypothesized that overexpression of GrIR in EPEC lacking H-NS, which expresses LEE genes constitutively even under non-permissive growth conditions in a Ler- and GrIA-independent manner, would not affect LEE gene expression. Therefore, we analyzed the transcriptional activity of the *LEE1*-, *LEE2*-, *LEE4*-, and *LEE5-cat* fusions and the expression of LEE-encoded proteins in WT and Δ *hns* EPEC strains carrying or not plasmid pT3GrIR (Supplementary Table 1). Consistent with previous reports for other A/E pathogens, overexpression of GrIR in WT EPEC repressed the transcriptional activity of all LEE fusions tested (Figure 2A), as well as the expression of Tir, intimin and EspA, as shown by western blot (Figure 2B), and of EspC (Supplementary Figure 1A), an autotransporter encoded outside the LEE and whose expression is also regulated by Ler (Elliott et al., 2000; Li et al., 2004; Vidal and Navarro-Garcia, 2008). Unexpectedly, GrIR also significantly repressed the transcriptional activity of the LEE promoters in the EPEC Δ *hns* mutant (Figures 2A, B). Under these conditions, all strains similarly expressed proteins DnaK and MBP,





used as loading controls, indicating that repression did not result from an unspecific pleiotropic effect in EPEC physiology due to GrIR overexpression.

To address this concept, we evaluated the effect of GrIR expressed from a plasmid under growth conditions where GrIA is not the primary activator of *Ler* expression. When EPEC grows in static DMEM cultures under 5% CO₂ atmosphere at 37°C, the EAF plasmid-encoded regulator PerC is the main activator of *LEE1* promoter expression and therefore of *ler* (Bustamante et al., 2011). Thus, we analyzed the secreted protein profile and intimin and EspA expression in WT EPEC and the Δhns mutant harboring plasmid pT3GrIR or the empty vector pMMP-T3, grown in shaken and static + 5% CO₂ DMEM. As shown, GrIR expressed from pT3GrIR repressed protein secretion (Supplementary Figure 1A) and expression of EspA and Intimin in both strains and conditions, but not that of DnaK (Supplementary Figure 1B), confirming the results shown in Figure 1B.

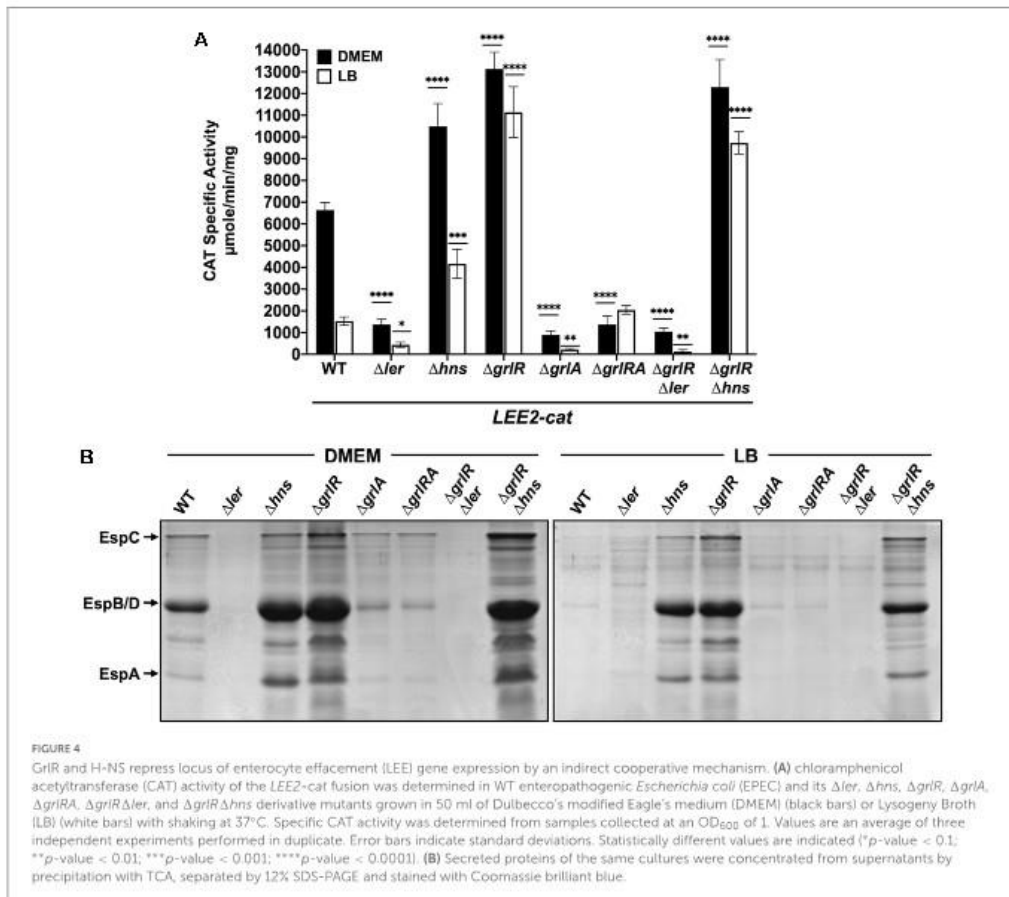
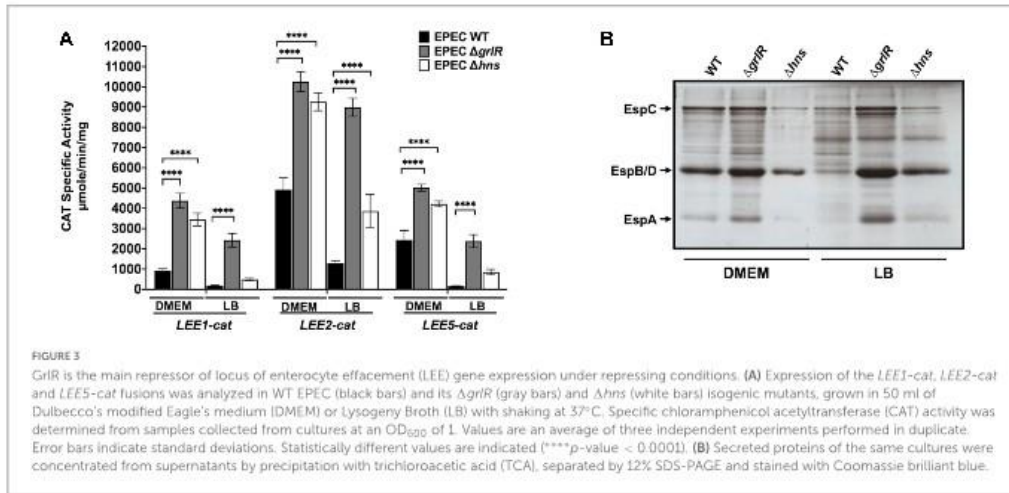
These data suggested that GrIR can repress LEE gene expression through an alternative pathway, probably independent of its interaction with GrIA.

The global regulator H-NS and the EPEC specific regulator GrIR act cooperatively, but at different levels, to repress the expression of LEE genes

Ler and GrIA establish a positive regulatory feedback loop that counteracts the repression exerted by H-NS (Barba et al., 2005; Jimenez et al., 2010). According to the results described above, GrIR and H-NS act cooperatively to repress the expression of LEE genes. To further explore this observation, we evaluated the expression of

the *LEE1-cat*, *LEE2-cat*, and *LEE5-cat* transcriptional fusions in EPEC WT and Δhns grown under inducing and repressing conditions and also analyzed the secretion profile of these strains from samples of their culture supernatants. Under inducing conditions, the activity of the *LEE2-cat* and *LEE5-cat* fusions increased about 2-fold in the absence of either of the two repressors, whereas that of the *LEE1-cat* fusion was 4.7-fold and 3.7-fold in the $\Delta grIR$ and Δhns mutants, respectively (Figure 3A). Under repressing conditions, the derepression observed for the *LEE1*, *LEE2*, and *LEE5* promoters operons was about 13-, 7-, and 14-fold, respectively, in the absence of GrIR; whereas in the Δhns mutant it was 2-, 3-, and 5-fold, respectively, relative to the activity displayed in the WT strain (Figure 3A). In agreement with these results, while the WT strain poorly secreted LEE-encoded proteins under repressing conditions (LB), the $\Delta grIR$ and Δhns mutants showed a clear increase in protein secretion (Figure 3B).

To delve deeper into the role of both H-NS and GrIR in the negative regulation of the LEE genes, we analyzed the transcriptional activity of the *LEE2-cat* fusion and the protein secretion profile in WT EPEC and its Δler , Δhns , $\Delta grIR$, $\Delta grIA$, $\Delta grIRA$, $\Delta ler \Delta grIR$, and $\Delta grIR \Delta hns$ isogenic mutants grown under inducing and repressing conditions (Figure 4). As expected, compared to the WT strain, the Δler and $\Delta grIA$ strains significantly downregulated *LEE2-cat* fusion expression and protein secretion, while the $\Delta grIR$ mutant expressed higher levels of *LEE2-cat* activity (Figures 4A, B). Interestingly, the $\Delta grIRA$ double mutant displayed a phenotype similar to the $\Delta grIA$ single mutant, confirming the important role of GrIA in *ler* activation and, indirectly, in derepression of *Ler*-dependent promoters that in the absence of GrIR remained repressed by H-NS (Figures 4A, B). In the $\Delta grIR \Delta hns$ double mutant, the transcriptional activity of the *LEE2-cat* fusion showed expression levels similar to those observed in the $\Delta grIR$ and Δhns single mutants under inducing conditions, while under repressing conditions, its expression was closer to the activity



observed in the $\Delta grlR$ strain (Figure 4A). These results coincided with the secreted protein profile since, in DMEM and LB, the $\Delta grlR$ and Δhns single mutants and the double $\Delta grlR\Delta hns$ mutant showed increased secretion in contrast to the WT strain (Figure 4B). Finally, the phenotype of the $\Delta grlR\Delta ler$ mutant confirmed that Ler is essential to antagonizing the repression exerted by H-NS regardless of the growth condition (Figures 4A, B).

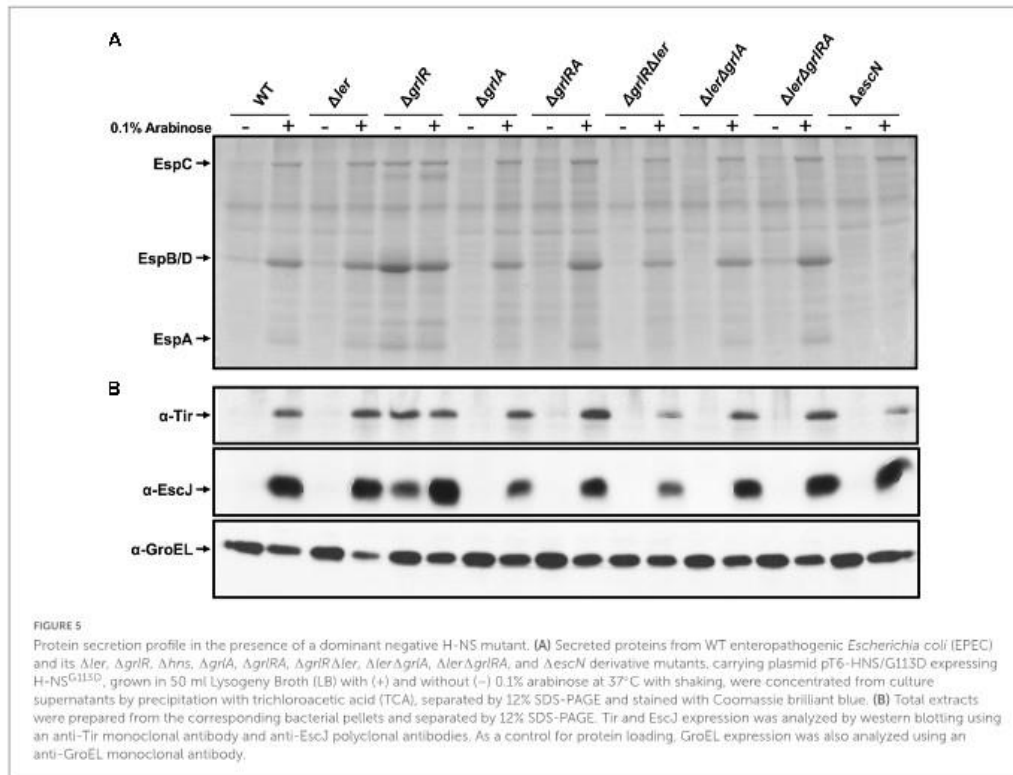
The inclusion of the $\Delta ler\Delta hns$ double and the $\Delta ler\Delta hns\Delta grlRA$ quadruple mutant in this assay was cumbersome due to the poor growth shown by these strains. To overcome this limitation, we expressed ectopically H-NS^{G113D}, a dominant negative version of H-NS that carries a mutation affecting its DNA binding capacity without altering the oligomerization domain (Ueguchi et al., 1996), to inhibit H-NS activity. WT EPEC and its mutant derivatives Δler , Δhns , $\Delta grlR$, $\Delta grlA$, $\Delta grlRA$, $\Delta ler\Delta grlR$, $\Delta ler\Delta grlA$, $\Delta ler\Delta grlRA$ and $\Delta escN$ carrying plasmid pT6-HNS/G113D, expressing H-NS^{G113D} under the control of an arabinose inducible promoter (Bustamante et al., 2008; Jimenez et al., 2010), were grown under repressing conditions with and without arabinose. We collected samples from these cultures to analyze the secreted proteins by PAGE and the expression of Tir and EscJ in total cell extracts by western blotting. In the absence of arabinose, we did not observe T3S of EspA, EspB and EspD nor Tir and EscJ expression in the WT or any strain carrying the Δler or $\Delta grlA$ deletions (Figures 5A, B). In contrast, upon induction of H-NS^{G113D}, de-repression of T3S was evident even in the absence of Ler and/or GrlA, while the $\Delta grlR$

mutant showed protein secretion and Tir and EscJ expression both without or with H-NS^{G113D} induction (Figures 5A, B). The $\Delta escN$ strain, a mutant defective in T3S, was used as a control that did not secrete virulence proteins even upon H-NS^{G113D} induction, except for EspC, a non-T3 secreted protein, whose gene is also repressed by H-NS and derepressed by Ler (Figure 5A). In contrast, Tir and EscJ were observed in total cell extracts of this strain when H-NS^{G113D} was induced (Figure 5B).

Taken together, these results indicate that GrlR and H-NS negatively regulate the expression of LEE operons at two independent levels that are indirectly cooperative (see Section "Discussion").

GrIA counteracts the repressor effect of GrlR through protein-protein interactions

We previously observed that under inducing conditions, the negative effect of GrlR is counteracted when co-expressed with GrlA in *C. rodentium* (Deng et al., 2004). A possible explanation of this phenotype is that the co-expression of both proteins prevents the titration effect that overexpressing only GrlR from a plasmid has on the native levels of GrlA. However, there is also the possibility that under these conditions, the interaction between GrlR and GrlA also plays a role in preventing the GrlR-mediated independent repression described above (Figure 2 and Supplementary Figure 1).



To evaluate this possibility, we transformed plasmids pT3GrlRA, pT3GrlR, pTEPGrlA1 and the empty vector pMPM-T3 (Supplementary Table 1) into WT EPEC and grew the resulting strains under inducing and repressing conditions to analyze the secretion profile. As shown in Figure 2, GrlR overexpression repressed the LEE genes and inhibited T3S even under inducing conditions, while overexpression of GrlA overcame the repressing effect of growth in LB (Figure 6A). In turn, as observed in *C. rodentium* (Deng et al., 2004), GrlR-GrlA co-expression prevented the negative effect of GrlR, even under repressing conditions, but to a lesser extent (Figure 6A).

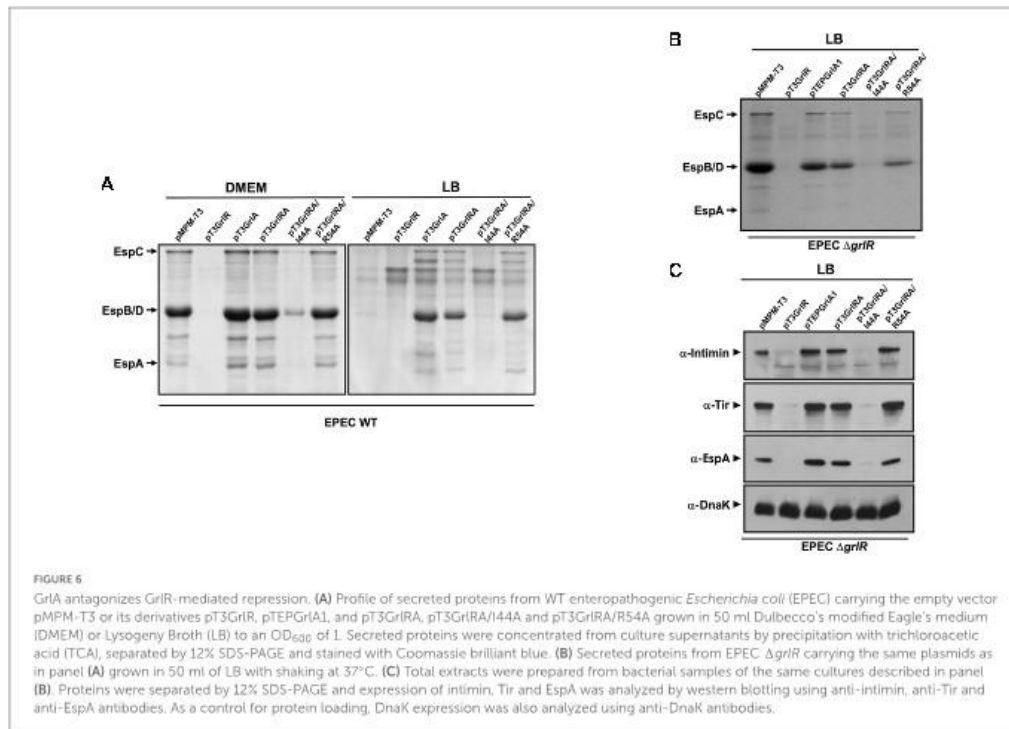
To further explore this notion, we took advantage of the phenotype of two GrlA mutants, GrlA/I44A and GrlA/R54A, that cannot activate the *LEE1* operon because they no longer bind to the *ler* regulatory region due to a single amino acid change in the HTH domain. Additionally, the GrlA/I44A mutant cannot interact with GrlR (Jimenez et al., 2010; Padavannil et al., 2013). The genes encoding these mutants were cloned into pT3GrlR to co-express them with WT *grlR*. WT EPEC containing the resulting plasmids pT3GrlRA/I44A or pT3GrlRA/R54A were then grown under inducing and repressing conditions to examine their T3S profile. Under inducing conditions, T3S in the presence of pT3GrlRA/I44A was similar to the secretion profile seen with pT3GrlR, as in both cases protein secretion was significantly reduced (Figure 6A). In contrast, in the presence of GrlR-GrlA/R54A, T3S was unaltered (Figure 6A), suggesting that GrlA/R54A probably prevented GrlR-mediated repression by interacting with it and not because it was over inducing *Ler* expression. Moreover, in LB

medium, where the WT strain does not secrete T3S substrates, we observed a clear de-repression of virulence protein secretion in the presence of GrlR-GrlA/R54A, but not with GrlR-GrlA/I44A, suggesting that GrlA/R54A titrated away both the endogenous GrlR expressed from the chromosomal gene and that expressed from the plasmid (Figure 6A). To confirm the above observations, we performed a similar experiment with the EPEC Δ *grlR* strain but grown under repressing conditions (LB medium). Co-expression of GrlR with GrlA/I44A did not prevent GrlR from complementing the repression phenotype and the effect was similar to that observed for the strain with pT3GrlR (Figure 6B); however, this was not the case when GrlR was co-expressed with GrlA/R54A, as protein secretion was still observed (Figure 6B). Western blotting to detect intimin, Tir and EspA in total cell extracts of the same strains, showed similar results (Figure 6C).

These results are consistent with the notion that GrlA, in addition to its activating effect on the *ler* promoter as a DNA binding protein, could also counteract the alternative GrlR repression effect by interacting with it.

GrlR and GrlA are expressed and interact under inducing and repressing conditions

The results described above further indicated that GrlR has a critical role as a repressor under non-permissive growth conditions for LEE expression, thus implying that EPEC expresses it in both LB and DMEM. To analyze GrlR and GrlA expression and



their interaction in more detail, we grew the EPEC *grlR*:3xFLAG, *grlA*:3xFLAG, Δ *grlA*-*grlR*:3xFLAG and Δ *grlR*-*grlA*:3xFLAG strains, as well as the Δ *grlA*-*grlR*:3xFLAG strain carrying the plasmids encoding the GrlA/I44A and GrlA/R54A mutants (Supplementary Table 1), under inducing and repressing conditions and analyzed total cell extracts by native PAGE and western blotting from samples taken from each culture. As shown in Figure 7, the formation of the GrlR-GrlA complex occurred under both growth conditions (Figure 7A, lanes 1, 2, 7, and 8, upper band). The EPEC *grlR*:3xFLAG strain also showed the GrlR dimer and monomer (Figure 7A, lanes 1 and 7), while the banding pattern of the Δ *grlA*-*grlR*:3xFLAG strain, where the upper band is not present due to the absence of GrlA (Figure 7A, lanes 3 and 9), confirmed the nature of the second and third bands. The EPEC *grlA*:3xFLAG strain only showed a band corresponding to the GrlR-GrlA complex (Figure 7A, lanes 2 and 8), while in the absence of GrlR, GrlA-3xFLAG did not enter the gel (Figure 7A, lanes 4 and 10), likely due to its isoelectric point (theoretical pI: 9.71), which changes when in complex with GrlR. Moreover, the expression of the plasmid-encoded GrlA/I44A and GrlA/R54A mutants in the Δ *grlA*-*grlR*:3xFLAG strain further confirmed these observations as the GrlA/I44A mutant, which does not interact with GrlR, did not form the GrlR₂-GrlA complex (Figure 7A, lanes 5 and 11) seen with the GrlA/R54A mutant (Figure 7A, lanes 6 and 12). Interestingly, the GrlA/R54A mutant drove GrlR to mainly form the complex with GrlA since the dimeric and monomeric forms were not visible. In part, this may be why overexpression of GrlA in the EPEC WT strain overrode the repression in LB (Figure 6A). SDS-PAGE and anti-FLAG western blot with the same cell extracts showed the presence of the tagged proteins (Figure 7B).

Native PAGE analysis also suggested, based on the banding pattern shown by GrlR and GrlA (as discussed above), that GrlR and GrlA are expressed and interact, although not to the same extent, independently of the growth conditions. To analyze this observation in more detail, we took samples from LB and DMEM cultures of

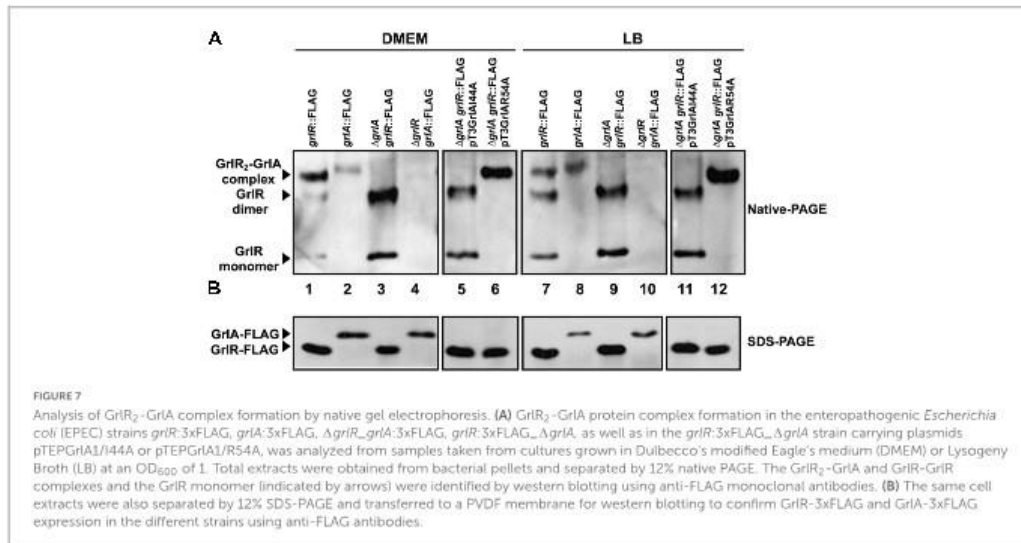
the EPEC *grlR*:3xFLAG and *grlA*:3xFLAG strains at different growth stages and analyzed them by SDS-PAGE and native PAGE followed by western blot. The qualitative analysis showed that GrlR and GrlA were expressed at moderately higher levels in DMEM than in LB; however, although enriched in DMEM, heterotrimers formed under both growth conditions independently of the expression levels of these proteins (Figures 8A, B, upper panels).

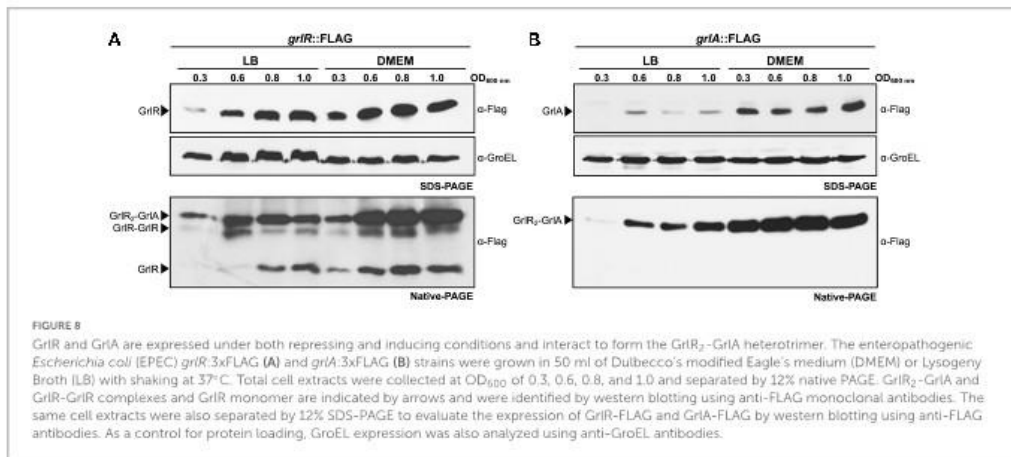
These data allowed us to hypothesize that heterotrimer formation plays a bidirectional role, on the one hand, preventing the activation of *ler* by reducing the levels of free GrlA and, on the other, antagonizing the independent repressor function of GrlR. A future more quantitative analysis of the relative concentrations of GrlA under both growth conditions, as well as the effect of these conditions on the ability of GrlA to activate the *ler* promoter and on the kinetics of GrlR-GrlA interaction, will allow a better understanding of the mechanism that regulates the expression of LEE genes in response to environmental cues.

Together, these results further supported the notion that GrlA counteracts the repressor effect of GrlR by interacting with it and showed that the GrlR₂-GrlA heterotrimeric complex, the GrlR-GrlR dimer and the GrlR monomer are present in EPEC under both growth conditions.

GrlR represses the expression of LEE promoters in a non-EPEC background

To further explore the notion that GrlR can repress the constitutive expression of LEE promoters independently of its interaction with GrlA, we assessed the activity of the *LEE1* and *LEE2* promoters in a background lacking not only H-NS, but also GrlA and Ler. We then transformed the empty vector pMPM-T3 or plasmids pT3GrlR, pTEPGrlA1 or pT3GrlRA into the Δ *hns* mutant of the LEE-negative lab strain *E. coli* MC4100 (JPMC1) containing the *LEE1-cat*





or *LEE2-cat* fusion. The WT strain was the control, where the *LEE1-cat* fusion, but not the *LEE2-cat* fusion, was active in the presence of pTEPGrlA1 (Figure 9A), as previously shown (Bustamante et al., 2011). Interestingly, GrIR also repressed the constitutive expression of the *LEE1-cat* and *LEE2-cat* fusions in the Δ *hns* background but not when co-expressed with GrIA (Figure 9B). This result supported the proposal that GrIR also negatively regulates LEE gene expression independently of its interaction with GrIA. Also, GrIA had a dual role as a positive regulator by, in addition to its function as a *ler* activator, preventing GrIR's negative effect, most likely by trapping it in the heterotrimer. Defining the underlying mechanism by which GrIR represses the constitutive expression of the LEE promoters will require further investigation.

Discussion

In this study, we further investigated the role of GrIR as a repressor and the function of its interaction with GrIA in modulating LEE gene expression. Our results revealed a novel feature of its mechanism of action as GrIR also seems to act as a repressor independently of its interaction with GrIA; however, it remains to be seen if GrIR exerts this function by directly interacting with Ler-dependent promoters or with Ler-derived transcripts recognizing a common motif or indirectly by interacting with or modulating the function of a conserved element that is also present in *E. coli* K12.

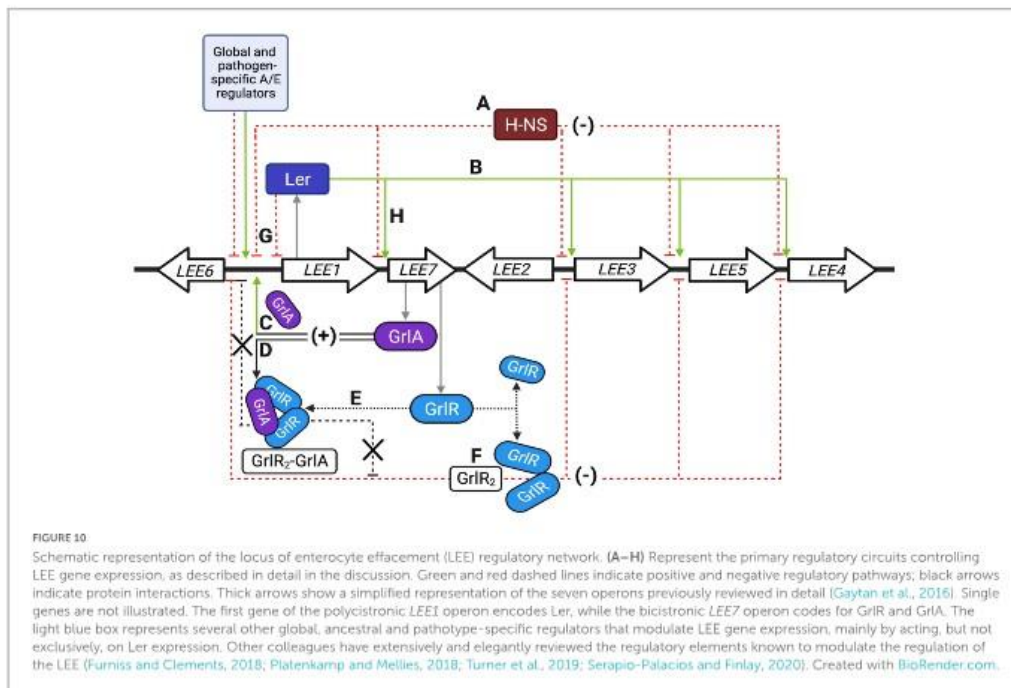
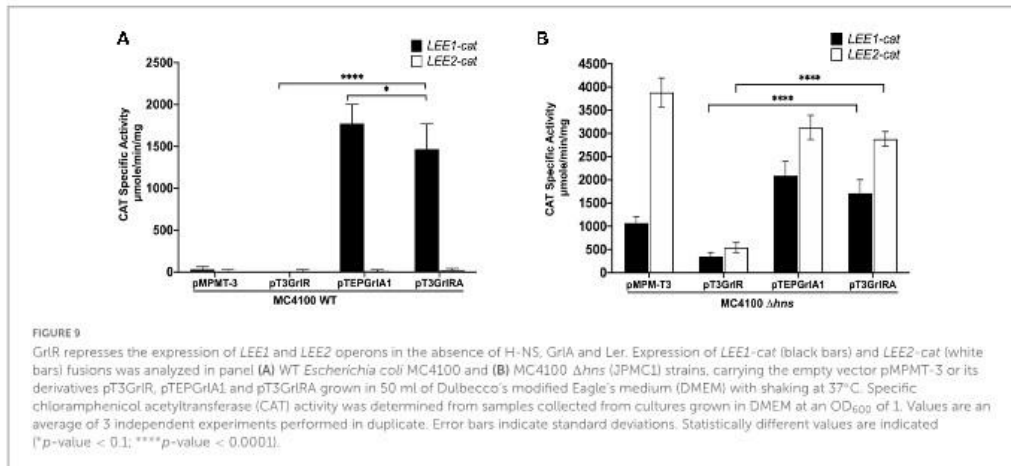
A summary of the events leading to the control of LEE gene expression in response to the growth conditions is shown in Figure 10 and described below. GrIR and H-NS act independently to negatively regulate the LEE at two different levels, establishing an indirect cooperative repressive effect on the expression of LEE operons when EPEC is grown under repressing conditions (Figures 10A, F, red dotted lines). In the WT strain, H-NS silences Ler-dependent promoters (Figure 10A), while GrIR inactivates GrIA by forming GrIR₂-GrIA heterotrimers previously shown to prevent GrIA binding to the *ler* promoter (Jimenez et al., 2010; Padavannil et al., 2013; Figure 10F). When GrIR is not present, free GrIA efficiently activates *ler* expression (Figure 10C), leading to Ler-dependent elimination of H-NS-mediated repression of LEE promoters (Figure 10B), thus

resembling the phenotype shown by the double Δ *grIR* Δ *hns* mutant; however, mutants lacking *grIR* but also *ler* or *grIA*, cannot activate LEE gene expression because H-NS is still present and there is no Ler to overcome this repression.

In addition to identifying the role of GrIR as a negative regulator independent of its interaction with GrIA, our findings show that GrIA plays a dual role in the positive regulation of LEE genes by binding to the *ler* regulatory region and activating its expression (Jimenez et al., 2010; Islam et al., 2011), and antagonizing the independent repressor activity of GrIR through the formation of the GrIR₂-GrIA heterotrimer (Figures 10C, D, respectively); thus establishing an indirect coherent-positive feedforward loop (Shoval and Alon, 2010).

How the growth conditions determine whether EPEC induces or represses the LEE genes when both proteins are present and interact needs to be clearly understood; however, current knowledge and the results described here open up interesting possibilities for future investigation. For example, GrIR, in addition to reciprocally antagonizing GrIA through their interaction, may also interact with other proteins to modulate the transcriptional activity of LEE genes or directly with DNA promoter regions or the RNA transcripts derived from Ler-regulated genes. Along with our results, reports showing that GrIA activity in EHEC is mechanoresponsive and modulated by its membrane-bound state (Sirisaengtaksin et al., 2020), that Hfq differentially regulates GrIR and GrIA synthesis (Hansen and Kaper, 2009; Bhatt et al., 2017; Sudo et al., 2022) and that ClpXP posttranslationally regulates GrIR at the stationary phase (Iyoda and Watanabe, 2005), illustrate that there is more to learn about the mechanism of action of the GrIR and GrIA duet. How the growth conditions impact the GrIR and GrIA ratio in the cell, which seems to have a profound effect on the function and interaction between GrIR and GrIA, and thus in LEE gene expression, warrants future investigation.

The presence of the GrIR₂-GrIA complex, GrIR dimer and its monomer under both growth conditions, which is consistent with previous observations indicating that the basal activity of the *grIA* promoter is higher than most of the LEE promoters under non-inducing conditions (Yerushalmi et al., 2014), indicate that certain levels of free GrIA are also present at any given moment during growth. Thus, the growth conditions must also play a role



in determining GrIR and GrIA competency to repress or activate, respectively, when the complex is disrupted, either due to its natural dissociation or by the influence of additional environmental factors. GrIR can displace GrIA from the *ler* promoter (Padavannil et al., 2013) and here we showed that overexpression of GrIR or GrIA drives the other protein to predominantly form the GrIR₂-GrIA complex (Figures 10D, E). In this complex, they reciprocally antagonize each other and, consequently, free GrIR or GrIA would act without competition with the other protein to either strongly

repress (Figure 10F) or activate (Figure 10C) LEE gene expression, respectively. Thus, this dynamic behavior is likely modulating the activation or repression state of the LEE, whose expression has, unsurprisingly, been shown to be bimodal and render a fitness advantage to the cell (Leh et al., 2017; Ronin et al., 2017).

The acquisition of a pathogenicity island imposes on bacteria the need to adopt and adapt pre-existent and horizontally acquired regulatory mechanisms to prevent the deleterious expression of recently incorporated genes (Navarre, 2016). Although LEE gene

expression is modulated by a complex assortment of global regulatory proteins, its specific activation relies on the LEE-encoded regulators Ler and GrlA. In contrast, its negative control is mediated at two levels by a global regulator (H-NS) and an EPEC-specific regulator (GrIR). In this context, self-regulation of gene expression mediated by GrIR and GrlA may have provided a fitness advantage during the acquisition of the LEE, where GrIR down-regulated its uncontrolled expression preventing detrimental effects on bacterial fitness, while GrlA counteracted this self-encoded sentinel function. It is tempting to speculate that the incorporation of pre-existing or ancestral regulatory mechanisms, such as the repression exerted by H-NS to finetune LEE gene expression further, led to the incorporation of additional regulatory proteins, such as Ler, as well as other regulators that are known to modulate Ler expression in response to various environmental, stress or metabolic signals (Furniss and Clements, 2018; Platenkamp and Mellies, 2018; Turner et al., 2019).

In line with the diversification and opposing effects of GrIR and GrlA functions, a $\Delta grIR$ mutant showed reduced levels of flagellin (FlhC) expression and motility, while overexpression of GrlA had the opposite effect suggesting that GrlA may be acting directly as a repressor on flagellar genes (Iyoda et al., 2006; Kitagawa et al., 2011). Iyoda's work also indicated that GrlA represses the expression of *flhD*, which encodes a master regulator of flagellar gene expression; consistently, GrlA binds to the *flhDC* regulatory region, while GrIR outcompetes this interaction (Padavannil et al., 2013), further supporting the notion that GrlA can also act as a repressor. Although details of the underlying mechanism remain undescribed, in the context of our work, the previously cited papers support the notion that the GrIR₂:GrlA interaction plays a reciprocal modulatory role in GrIR and GrlA activities.

Overall, LEE regulation is a fine example of the integration of ancestral and horizontally acquired regulators that now comprise a complex and coordinated set of network motifs (Shoval and Alon, 2010), orchestrating a consensus response to a myriad of signals concurring to regulate the expression of the LEE genes. For example, Ler negatively regulates its own expression, establishing a checkpoint that prevents the overexpression of the LEE (Figure 10G; Berdichevsky et al., 2005), while Ler and GrlA represent a positive feedback loop (Figures 10C, H; Barba et al., 2005); however, depending on the growth conditions, activation of the *grlRA* operon by Ler may also lead to an indirect coherent-negative feedforward loop where GrIR inactivates GrlA through the formation of heterotrimeric and independently represses the *ler* and other LEE promoters (Figures 10E, F; Jimenez et al., 2010; Padavannil et al., 2013). In contrast, GrlA controls an indirect coherent-positive feedforward loop by activating *ler* expression and antagonizing GrIR (Figures 10C, D; Jimenez et al., 2010; Islam et al., 2011; Padavannil et al., 2013; this work). Deciphering the unknown nuances of this intertwined regulatory network and the implications for virulence gene regulation during the transit of the pathogen from the environment to the host or within the host during the colonization process is an exciting challenge for future research.

Data availability statement

The original contributions presented in this study are included in this article/Supplementary material, further inquiries can be directed to the corresponding authors.

Author contributions

CL-O and JP conceived the project, designed the experiments, and wrote the original draft of the manuscript with input and edits from all authors. CL-O, AH-S, WD, and AM-L performed the experiments. CL-O, AH-S, AM-L, WD, BF, YM-L, and JP performed data analysis. BF, YM-L, and JP provided funding. All authors approved the submitted version.

Funding

This work was supported by Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (60796, 239659, and FC-2015-2/950) and Dirección General de Personal Académico (PAPIIT IN224107 and IN218322) to JP and Programa institucional del fortalecimiento a grupos de investigación de la VIEP/BUAP and a CIHR Foundation grant to BF.

Acknowledgments

We are particularly thankful to A. Vázquez for mutant construction, B. González-Pedrajo for the generous donation of anti-Tir, -EspA and -Intimin antibodies, F. Santana for technical assistance, R. Jiménez for sharing constructs and J. A. Ibarra for valuable comments on the manuscript. We also thank the Oligonucleotide Synthesis Facility of the Instituto de Biotecnología. CL-O and AM-L were supported by fellowships from CONACyT (165332 and 173678, respectively).

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1063368/full#supplementary-material>

References

- Alsharif, G., Ahmad, S., Islam, M. S., Shah, R., Busby, S. J., and Krachler, A. M. (2015). Host attachment and fluid shear are integrated into a mechanical signal regulating virulence in *Escherichia coli* O157:H7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 5503–5508. doi: 10.1073/pnas.1422986112
- Barba, J., Bustamante, V. H., Flores-Valdez, M. A., Deng, W., Finlay, B. B., and Puente, J. L. (2005). A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *J. Bacteriol.* 187, 7918–7930.
- Berdichevsky, T., Friedberg, D., Nadler, C., Rokney, A., Oppenheim, A., and Rosenshine, I. (2005). Ler is a negative autoregulator of the LEE1 operon in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187, 349–357. doi: 10.1128/JB.187.1.349-357.2005
- Bhatt, S., Egan, M., Ramirez, J., Xander, C., Jenkins, V., Muche, S., et al. (2017). Hfq and three Hfq-dependent small regulatory RNAs-MgrR, RyhB and McaS-coregulate the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Pathog. Dis.* 75:ftw113. doi: 10.1093/femspd/ftw113
- Bingle, L. E., Constantinidou, C., Shaw, R. K., Islam, M. S., Patel, M., Snyder, L. A., et al. (2014). Microarray analysis of the Ler regulon in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains. *PLoS One* 9:e80160. doi: 10.1371/journal.pone.0080160
- Brosius, J. (1984). Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene* 27, 151–160.
- Bustamante, V. H., Martinez, L. C., Santana, F. J., Knodler, L. A., Steele-Mortimer, O., and Puente, J. L. (2008). Hfd-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 14591–14596. doi: 10.1073/pnas.0801205105
- Bustamante, V. H., Santana, F. J., Calva, E., and Puente, J. L. (2001). Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol. Microbiol.* 39, 664–678. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02209.x
- Bustamante, V. H., Villalba, M. I., Garcia-Angulo, V. A., Vazquez, A., Martinez, L. C., Jimenez, R., et al. (2011). PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 82, 398–415. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07819.x
- Creasey, E. A., Delahay, R. M., Daniell, S. J., and Frankel, G. (2003). Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 149(Pt 8), 2093–2106. doi: 10.1099/mic.0.26355-0
- Croxen, M. A., and Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 26–38.
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., and Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 822–880. doi: 10.1128/CMR.0022-13
- Datsenko, K. A., and Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6640–6645. doi: 10.1073/pnas.120163297
- Deng, W., Puente, J. L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B. A., Vazquez, A., et al. (2004). Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 3597–3602.
- Edwards, R. A., Keller, L. H., and Schifferli, D. M. (1998). Improved allelic exchange vectors and their use to analyze 987P fimbria gene expression. *Gene* 207, 149–157. doi: 10.1016/s0378-1119(97)00619-7
- Elliott, S. J., Sperandio, V., Giron, J. A., Shin, S., Mellies, J. L., Wainwright, L., et al. (2000). The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 68, 6115–6126. doi: 10.1128/IAI.68.11.6115-6126.2000
- Frankel, G., and Phillips, A. D. (2008). Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: Getting off the pedestal. *Cell Microbiol.* 10, 549–556. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01103.x
- Friedberg, D., Umanski, T., Fang, Y., and Rosenshine, I. (1999). Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 34, 941–952. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01655.x
- Furniss, R. C. D., and Clements, A. (2018). Regulation of the locus of enterocyte effacement in attaching and effacing pathogens. *J. Bacteriol.* 200:e00336-17. doi: 10.1128/JB.00336-17
- García-Angulo, V. A., Martínez-Santos, V. I., Villaseñor, T., Santana, F. J., Huerta-Saquero, A., Martínez, L. C., et al. (2012). A distinct regulatory sequence is essential for the expression of a subset of nle genes in attaching and effacing *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 194, 5589–5603. doi: 10.1128/JB.00190-12
- Gaytan, M. O., Martínez-Santos, V. I., Soto, E., and González-Pedrajo, B. (2016). Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 6:129. doi: 10.3389/fcimb.2016.00129
- Guttman, J. A., and Finlay, B. B. (2008). Subcellular alterations that lead to diarrhea during bacterial pathogenesis. *Trends Microbiol.* 16, 535–542. doi: 10.1016/j.tim.2008.08.004
- Haack, K. R., Robinson, C. L., Miller, K. J., Fowlkes, J. W., and Mellies, J. L. (2003). Interaction of Ler at the LEE5 (tir) operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 71, 384–392. doi: 10.1128/IAI.71.1.384-392.2003
- Hansen, A. M., and Kaper, J. B. (2009). Hfq affects the expression of the LEE pathogenicity island in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 73, 446–465. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06781.x
- Huang, L. H., and Syu, W. J. (2008). GrlA of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 activates LEE1 by binding to the promoter region. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* 41, 9–16.
- Islam, M. S., Bingle, L. E., Pallen, M. J., and Busby, S. J. (2011). Organization of the LEE1 operon regulatory region of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and activation by GrlA. *Mol. Microbiol.* 79, 468–483. doi: 10.1111/j.1365-2958.2011.07460.x
- Iyoda, S., and Watanabe, H. (2005). ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 187, 4086–4094. doi: 10.1128/JB.187.12.4086-4094.2005
- Iyoda, S., Koizumi, N., Satou, H., Lu, Y., Saitoh, T., Ohnishi, M., et al. (2006). The GrlR-GrlA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and LEE-encoded type III protein secretion systems in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188, 5682–5692. doi: 10.1128/JB.00352-06
- Jimenez, R., Cruz-Migoni, S. B., Huerta-Saquero, A., Bustamante, V. H., and Puente, J. L. (2010). Molecular characterization of GrlA, a specific positive regulator of ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 192, 4627–4642. doi: 10.1128/JB.00307-10
- Jobichen, C., Li, M., Yerushalmi, G., Tan, Y. W., Mok, Y. K., Rosenshine, I., et al. (2007). Structure of GrlR and the implication of its EDED motif in mediating the regulation of type III secretion system in EHEC. *PLoS Pathog.* 3:e69. doi: 10.1371/journal.ppat.0030069
- Kitagawa, R., Takaya, A., and Yamamoto, T. (2011). Dual regulatory pathways of flagellar gene expression by ClpXP protease in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology* 157(Pt 11), 3094–3103. doi: 10.1099/mic.0.051151-0
- Leh, H., Khodr, A., Bouger, M. C., Slavi, B., Rimsky, S., and Bury-Mone, S. (2017). Bacterial-chromatin structural proteins regulate the bimodal expression of the locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island in enteropathogenic *Escherichia coli*. *mBio* 8:e00773-17. doi: 10.1128/mBio.00773-17
- Li, M., Rosenshine, I., Tung, S. L., Wang, X. H., Friedberg, D., Hew, C. L., et al. (2004). Comparative proteomic analysis of extracellular proteins of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* strains and their ihf and ler mutants. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5274–5282. doi: 10.1128/AEM.70.9.5274-5282.2004
- Lao, J. C., and Syu, W. J. (2004). Identification of a negative regulator for the pathogenicity island of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biomed. Sci.* 11, 855–863. doi: 10.1007/BF02254371
- Martínez-Laguna, Y., Calva, E., and Puente, J. L. (1999). Autoactivation and environmental regulation of bfpT expression, the gene coding for the transcriptional activator of bfpA in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 33, 153–166. doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01460.x
- Mayer, M. P. (1995). A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* 163, 41–46. doi: 10.1016/0378-1119(95)00389-n
- Navarre, W. W. (2016). The impact of gene silencing on horizontal gene transfer and bacterial evolution. *Adv. Microb. Physiol.* 69, 157–186. doi: 10.1016/bs.amphs.2016.07.004
- Padavannil, A., Jobichen, C., Mills, E., Velazquez-Campoy, A., Li, M., Leung, K. Y., et al. (2013). Structure of GrlR-GrlA complex that prevents GrlA activation of virulence genes. *Nat. Commun.* 4:2546. doi: 10.1038/ncomms3546
- Pearson, J. S., Gogha, C., Wong Fok Lung, T., and Hartland, E. L. (2016). The genetics of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence. *Annu. Rev. Genet.* 50, 493–513. doi: 10.1146/annurev-genet-120215-035138
- Platenkamp, A., and Mellies, J. L. (2018). Environment controls LEE regulation in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 9:1694. doi: 10.3389/fmicb.2018.01694
- Ronin, I., Katsowich, N., Rosenshine, I., and Balaban, N. Q. (2017). A long-term epigenetic memory switch controls bacterial virulence bimodality. *Elife* 6:e19599. doi: 10.7554/eLife.19599
- Saitoh, T., Iyoda, S., Yamamoto, S., Lu, Y., Shimuta, K., Ohnishi, M., et al. (2008). Transcription of the ehx enterohemolysin gene is positively regulated by GrlA, a global regulator encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190, 4822–4830. doi: 10.1128/JB.00231-08
- Sambrook, J., and Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez-SanMartín, C., Bustamante, V. H., Calva, E., and Puente, J. L. (2001). Transcriptional regulation of the orf19 gene and the tir-cesT-ae operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183, 2823–2833. doi: 10.1128/JB.183.9.2823-2833.2001

- Serapio-Palacios, A., and Finlay, B. B. (2020). Dynamics of expression, secretion and translocation of type III effectors during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Curr. Opin. Microbiol.* 54, 67–76. doi: 10.1016/j.mib.2019.12.001
- Shin, M. (2017). The mechanism underlying Ler-mediated alleviation of gene repression by H-NS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 483, 392–396. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.12.132
- Shoval, O., and Alon, U. (2010). SnapShot: Network motifs. *Cell* 143, 326–e321. doi: 10.1016/j.cell.2010.09.050
- Sirisengtaaksin, N., Odem, M. A., Bosserman, R. E., Flores, E. M., and Krachler, A. M. (2020). The *E. coli* transcription factor GrlA is regulated by subcellular compartmentalization and activated in response to mechanical stimuli. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 9519–9528. doi: 10.1073/pnas.1917500117
- Spears, K. J., Roe, A. J., and Gally, D. L. (2006). A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 255, 187–202. doi: 10.1111/j.1574-6968.2006.00119.x
- Sperandio, V., Mellies, J. L., Delahay, R. M., Frankel, G., Crawford, J. A., Nguyen, W., et al. (2000). Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler. *Mol. Microbiol.* 38, 781–793. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02168.x
- Sudo, N., Lee, K., Sekine, Y., Ohnishi, M., and Iyoda, S. (2022). RNA-binding protein Hfq downregulates locus of enterocyte effacement-encoded regulators independent of small regulatory RNA in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 117, 86–101. doi: 10.1111/mmi.14799
- Turner, N. C. A., Connolly, J. P. R., and Roe, A. J. (2019). Control freaks—signals and cues governing the regulation of virulence in attaching and effacing pathogens. *Biochem. Soc. Trans.* 47, 229–238. doi: 10.1042/BST20180546
- Ueguchi, C., Suzuki, T., Yoshida, T., Tanaka, K., and Mizuno, T. (1996). Systematic mutational analysis revealing the functional domain organization of *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS. *J. Mol. Biol.* 263, 149–162. doi: 10.1006/jmbi.1996.0566
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., and Bossi, L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 15264–15269.
- Vidal, J. E., and Navarro-Garcia, F. (2008). EspC translocation into epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli* requires a concerted participation of type V and III secretion systems. *Cell Microbiol.* 10, 1975–1986. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01181.x
- Yerushalmi, G., Litvak, Y., Gur-Arie, L., and Rosenzweig, I. (2014). Dynamics of expression and maturation of the type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 196, 2798–2806. doi: 10.1128/JB.00669-14