



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL
DEL GEN 1er EN *Escherichia coli* ENTEROHEMORRÁGICA
O157:H7”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

ALMA LILIANA TOVAR DÍAZ



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA

2004



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

"Análisis de la Regulación Transcripcional del Gen ler en Escherichia coli enterohemorrágica 0157:H7"

realizado por Alma Liliana Tovar Díaz

con número de cuenta 09619152-1 , quien cubrió los créditos de la carrera de:
Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario Dr. José Luis Puente García

Propietario Dr. José Antonio Ibarra García

Propietario Dr. Víctor Manuel Valdes López

Suplente M. en C. Fernando Hernández Sánchez

Suplente Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán

Consejo Departamental de
Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de los Drs. Edmundo Calva Mercado y José Luis Puente García, dentro del Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en Cuernavaca, Mor., bajo la tutoría del Dr. José Luis Puente García.

Durante la realización de éste trabajo recibí una beca de alimentación y hospedaje otorgada por el Instituto de Biotecnología, UNAM.

DEDICATORIAS

Muy grande y especialmente a mi **ABUELITA ELISA** (madre y amiga). Abuelita gracias por tu amor y comprensión, por ser mi amiga incondicional y mi segunda mamá.

Aunque ausente en la recta final, sé que me has acompañado hasta aquí. Te amo y te extraño abuelita.

Desde luego a mis **PADRES**

MAMI, te agradezco tu paciencia, tu apoyo aún cuando algunas cosas parecían fuera de lugar, tus apapachos. Gracias por darme la oportunidad de estar aquí y por acompañarme.

Papá: por tu cariño tan especial y tus palabras.

FAMILY: porque no podría tener una mejor y más cotorra. A mis HERMANOS Elisa, Arturo, Miguel-Kitty, Jorge, por su generosidad y solidaridad en todo momento; por ser buenos hermanos. A los chiquitos de la casa por alegrarla con su presencia.

A las familias **Díaz y Melo**.

A **Ti** mi vida: porque sin ti quizá habría desertado, me ayudaste a recuperar la confianza, llegando a mi vida justo cuando te necesitaba, impulsándome a continuar, apoyándome a pesar de los problemas. Eres mi ángel de la guarda, Te Quiero.

A **Jesús**, Dios, o como te llames, pero existes.

AGRADECIMIENTOS

Dr. José Luis Puente: infinitamente gracias por aceptarme en tu grupo, por creer en mí desde el principio, por apoyarme después del final. Al Dr. Calva por el chance de ocupar su espacio, por su sentido del humor.

A mis amigos: Adriana, Mirna, Nela, Tere, Tona, Alex Hunab, por ser verdaderos amigos. A los que conocí después: Alejandra, Siomara, Marlen, Nancy, Yanko, Lina, Itzel, Abraham, la pasé muy bien con todos.

A los compañeros del Taller: Margaro, Alex, Vero, Nancy, Idalia, Olga, Rebeca, Ingrid, Mayra, porque juntos conformamos esta generación. Suerte a todos.

A los profes Fernando, Toño, Aquiles, Conchita, Víctor: fue un placer tomar clases con ustedes, e hicieron de la estancia en la fac, algo más que digno de recordar.

A los compañeros del lab: Pancho, Víctor, Beatriz, Ale, Vero, Miguel Angel, Oli, Marcos, Ricardo, Carmen, Ulises, Cristina, Diana, Juan, Tomás, de cada uno aprendí una actitud.

De manera particular a Jeannette por brindarme las primeras enseñanzas en la mesa de trabajo; a Karol por su amistad y confianza; a Miryam por los ratitos y comidas juntas. También especialmente a Toño y Norma por sus consejos tan valiosos al final y su empatía. Gracias a Paty y Elvira, por su paciencia y atención en la preparación del material.

A los cuates de reven: Oly, Lalo, Carlos, Olga, porque con ustedes me divertí de verdad. Por supuesto también a Arturín.

De nuevo a Arturo: por tu amor.

A los sinodales: Dr. Antonio Ibarra, Dr. Víctor Valdes, M. en C. Fernando Hernández y Dr. Víctor Bustamante, gracias por aceptar echarle un ojo a este trabajo, sus críticas, comentarios y ayuda para llevarlo a buen término.

Dios: gracias por cuidarme siempre y darme justo lo que he necesitado en cada momento de mi vida. Gracias por darme la oportunidad de estar donde me gusta y quiero estar.

ÍNDICE DE CONTENIDO

TEMAS	Pág.
Resumen	1
Introducción	3
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica.....	4
Patogenicidad.....	4
Factores de virulencia.....	7
Locus de Destrucción del Enterocito.....	8
Regulación genética.....	8
Señales ambientales.....	9
“Quorum-sensing”	9
Ler.....	10
IHF.....	10
H-NS.....	11
GrlA y GrlR.....	11
Justificación	14
Hipótesis	14
Objetivos	15
Materiales y Métodos	16
Resultados	27
Construcción de fusiones transcripcionales <i>ler-cat</i>	27
Expresión de las fusiones transcripcionales <i>ler-cat</i> en DMEM.....	27
Expresión de las fusiones transcripcionales <i>ler-cat</i> en otras condiciones de crecimiento.....	30
Papel de GrlA y Ler en la expresión de <i>ler</i>	33
Papel de IHF en la expresión de <i>ler</i>	34
Caracterización de los promotores de <i>ler</i>	35
Discusión y conclusiones	39
Perspectivas	43
Bibliografía	44

ÍNDICE DE CONTENIDO

TEMAS	Pág.
Resumen	1
Introducción	3
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica.....	4
Patogenicidad.....	4
Factores de virulencia.....	7
Locus de Destrucción del Enterocito.....	8
Regulación genética.....	8
Señales ambientales.....	9
“Quorum-sensing”	9
Ler.....	10
IHF.....	10
H-NS.....	11
GrlA y GrlR.....	11
Justificación	14
Hipótesis	14
Objetivos	15
Materiales y Métodos	16
Resultados	27
Construcción de fusiones transcripcionales <i>ler-cat</i>	27
Expresión de las fusiones transcripcionales <i>ler-cat</i> en DMEM.....	27
Expresión de las fusiones transcripcionales <i>ler-cat</i> en otras condiciones de crecimiento.....	30
Papel de GrlA y Ler en la expresión de <i>ler</i>	33
Papel de IHF en la expresión de <i>ler</i>	34
Caracterización de los promotores de <i>ler</i>	35
Discusión y conclusiones	39
Perspectivas	43
Bibliografía	44

RESUMEN

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) es una importante bacteria patógena para los humanos, siendo el serotipo O157:H7 el principal implicado en epidemias esporádicas de Colitis Hemorrágica (CH) y Síndrome Urémico-Hemolítico (SUH), enfermedades que llegan a ser mortales principalmente en niños pequeños y ancianos. EHEC pertenece a una familia de patógenos conocida como A/E (“Attaching and Effacing” o Adherencia y Destrucción), capaces de producir lesiones caracterizadas por la destrucción de las microvellosidades de las células epiteliales del intestino y por la reorganización de diversas proteínas del citoesqueleto de la célula huésped en estructuras denominadas pedestales. Además, produce al menos dos potentes citotoxinas denominadas Stx (“Shiga toxin-like”), responsables de gran parte de los síntomas asociados a las enfermedades producidas por EHEC.

Los genes necesarios para la formación de las lesiones A/E están codificados en una isla de patogenicidad llamada Locus de Destrucción del Enterocito o LEE (“Locus of Enterocyte Effacement”) en el cromosoma de EHEC. Esta isla está dividida en cinco grandes operones que codifican diversos factores de virulencia, un Sistema de Secreción Tipo III, diversas proteínas efectoras secretadas, chaperonas, proteínas translocadoras y reguladores. Ler es un regulador transcripcional positivo de los genes del LEE y codificado por el primer gen del operón *LEE1*, ubicado en la isla de patogenicidad.

El objetivo del presente trabajo fue estudiar la regulación transcripcional del gen *ler* de EHEC. Para esto se construyeron una serie de fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, de la región promotora de *ler*. La expresión de estas fusiones fue evaluada en diferentes fondos genéticos y condiciones de crecimiento.

Todas las fusiones generadas fueron inactivas en un fondo genético de *E. coli* no patógena (i.e. K-12), demostrando que se requiere de un factor específico de EHEC para la activación de *ler*. Además, la eliminación de una región reguladora entre la posición -402 y -268, contribuyó a una mayor expresión de *ler*, sugiriendo que dicha región se encuentra involucrada en un control negativo de la expresión del gen.

Recientemente, se describió un nuevo regulador global codificado en el LEE, GrlA, que afecta de manera positiva la expresión de *ler*. En este estudio en una mutante en dicho regulador se disminuye la expresión de las fusiones *ler-cat*, pero no de manera dramática, como se ha observado para *Citrobacter rodentium*, indicando que, si bien se requiere de este regulador para una expresión óptima de *ler*, no se trata de un factor esencial.

Así mismo, como se ha reportado para EPEC (*Escherichia coli* enteropatógena), se demostró que el regulador global IHF (“**I**ntegration **H**ost **F**actor”) es esencial para la expresión de *ler*, pues en una cepa de EPEC $\Delta ihfA$ se abolió la expresión de las fusiones.

Por otro lado, se evaluó el efecto en la expresión de las fusiones al cultivar las cepas en los medios de cultivo DMEM y M9, sin encontrarse diferencias en la expresión. Además, en EHEC la expresión de *ler* no se vio afectada al añadir amonio al medio de cultivo, lo que contrasta con lo que se ha reportado para el gen *ler* de EPEC, el cual es reprimido por amonio.

En EHEC se ha reportado un segundo promotor de *ler*, o promotor proximal, el cual no es compartido con EPEC, cuya presencia podría implicar diferencias en el mecanismo regulador de *ler* entre EHEC y EPEC. Para corroborar su existencia y su papel en la regulación, se llevó a cabo un experimento de “primer extension”; sin embargo, en este experimento no se detectó un producto que iniciara de dicho promotor. Así mismo, mutantes en la caja -35 del promotor proximal se comportaron igual que las fusiones silvestres, sugiriendo que dicho promotor no existe.

Aunque se encontraron datos interesantes sobre la regulación del gen *ler* en EHEC, se propone que algunos aspectos relacionados al papel que juegan diferentes reguladores como H-NS y GrlA, así como al efecto de las condiciones de crecimiento y la presencia de, por ejemplo, el amonio en el medio de cultivo, sean evaluados en mayor detalle y desde otras perspectivas, con el fin de entender mejor el mecanismo de regulación.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es un bacilo Gram-negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, la cual comprende al menos 157 especies agrupadas en 29 géneros⁴⁷, y ha sido por más de medio siglo el principal modelo para realizar estudios sobre fisiología, bioquímica, genética, biología molecular, así como sobre el papel fisiológico de las bacterias entéricas como parte de la microbiota intestinal^{47, 53, 59}.

La mayoría de las cepas de *E. coli* se consideran inocuas para sus organismos hospederos; sin embargo, existen cepas patógenas para animales y humanos^{36, 52, 53, 54, 59}. Éstas se diferencian porque expresan factores de virulencia que han sido adquiridos, probablemente, en eventos de transferencia horizontal^{16, 47, 52, 53, 56}. Se conocen alrededor de 200 cepas de *E. coli* patógenas que causan diversas enfermedades en humanos, por ejemplo: varios tipos de diarrea, infecciones del tracto urinario (UTI's) y sepsis/meningitis. Las cepas causantes de diarrea se han dividido en varias categorías con base, principalmente, en el mecanismo de virulencia^{36, 47, 52, 59}. Así, se han descrito los siguientes grupos:

E. coli enterotoxigénica (ETEC): causa la llamada “diarrea del viajero”, la cual es acuosa y se contrae al ingerir agua y alimentos contaminados. Estas cepas producen al menos una de dos enterotoxinas, termoestable y termolábil. Colonizan la superficie de la mucosa del intestino delgado por medio de un conjunto de fimbrias denominadas factores de colonización, o CFAs^{36, 52, 59}.

E. coli enteroinvasiva (EIEC): produce diarrea acuosa y algunos pacientes pueden desarrollar enfermedad tipo disentería, cuyos síntomas son virtualmente idénticos a los producidos por *Shigella spp.* Invade el epitelio colónico y elabora una o más enterotoxinas secretoras^{36, 52, 59}.

E. coli enteropatógena (EPEC): es la causa predominante de diarrea en niños menores de 2 años en países en vías de desarrollo. Produce la lesión de Adherencia o Destrucción o A/E (“Attaching and Effacing”) y la mayoría de las cepas poseen un plásmido de alto peso molecular involucrado en un fenotipo característico llamado Adherencia Localizada, que contribuye de manera importante a la virulencia de estas cepas^{36, 52, 59}.

E. coli enterohemorrágica (EHEC): causa epidemias esporádicas de colitis hemorrágica (CH) y síndrome urémico-hemolítico (SUH), o “enfermedad de las hamburguesas”, a causa de la producción de una potente citotoxina denominada Stx. Al

igual que EPEC produce las lesiones A/E y algunas cepas contienen un plásmido de alto peso molecular (pO157), el cual codifica para factores potenciales de virulencia^{36, 52, 54, 59}.

E. coli enteroagregativa (EAEC): se asocia con diarrea pediátrica de tipo acuoso y a menudo mucoso. Presenta un patrón de adherencia agregativa sobre las células que infecta; produce las enterotoxinas EAST1, Pet y una hemolisina^{36, 52, 59}.

E. coli difuso-adherente (DAEC): produce diarrea acuosa persistente en niños entre 2 y 5 años. Se adhiere de forma difusa a las células epiteliales, promoviendo daño a las microvellosidades después de su adherencia; no se le conoce alguna toxina^{36, 52, 59}.

***E. coli* enterohemorrágica**

EHEC pertenece a un subgrupo de *E. coli* también llamado STEC (“Shiga-Toxin producing *E. coli*”), caracterizado en 1977 por Konowalchuk *et al.*⁵⁴. El serotipo O157:H7 es el agente causal de la Colitis Hemorrágica (CH) y del Síndrome Urémico-Hemolítico (SUH), con al menos 60,000 casos y 50 muertes al año⁴⁷. Fue reconocido como patógeno humano en 1982 y después en 1983 por Karmali *et al.*, quienes reportaron una probable asociación entre la infección con STEC y el SUH^{49, 52, 54}.

EHEC es transmitida a través de alimentos contaminados o mal cocinados, particularmente de origen bovino, y tiene una dosis infectiva de 10-100 organismos, con un alto grado de incidencia en Norteamérica, Reino Unido y Japón^{35, 36, 47, 52, 54}. Las infecciones son esporádicas, siendo los niños y adultos mayores los más susceptibles a la infección y a desarrollar el SUH.

Patogenicidad

Luego de su paso por el estómago, EHEC debe establecer la colonización adhiriéndose a las células del epitelio intestinal. El fenotipo de adherencia varía aún dentro de las cepas O157:H7, de difuso a localizado⁵⁴.

Se han identificado potenciales factores de adhesión en EHEC codificados en la isla de patogenicidad LEE o fuera de ella^{37, 69, 70}. Entre éstos, la presencia de un plásmido de alto peso molecular llamado pO157 se ha correlacionado con la expresión de fimbrias y adherencia a células epiteliales Henle 407³⁷. Torres y colaboradores en el 2002⁶⁹ caracterizaron en el cromosoma de EHEC, un operón que codifica para una fimbria, el cual mostró gran similitud con el operón de la fimbria polar de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Los autores proponen que este operón facilita la adherencia de la bacteria, favoreciendo la formación de microcolonias. Por otro lado, OmpA, una proteína altamente conservada entre las enterobacterias, también se ha involucrado en la adherencia de EHEC a células HeLa y Caco-2⁷⁰.

Así, diversos elementos están involucrados en el mecanismo de adherencia de EHEC a las células del epitelio intestinal. Sin embargo, aún se desconoce el mecanismo inicial de adherencia de la bacteria a la célula huésped y su papel dentro del mecanismo de patogenicidad.

EHEC coloniza el intestino grueso, donde causa las lesiones referidas como de Adherencia y Destrucción o A/E (“Attaching and Effacing”), también producidas por otros patógenos como *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *Citrobacter rodentium*, debido a la presencia en el cromosoma de una isla de patogenicidad llamada Locus De Destrucción del Enterocito o LEE (“Locus of Enterocyte Effacement”)^{16, 22, 56, 57}, la cual se describe más adelante. Esta lesión se caracteriza por la destrucción de las microvellosidades de la célula epitelial intestinal, la adherencia íntima de la bacteria a la membrana de la célula huésped y la acumulación de actina polimerizada en estructuras tipo pedestal por debajo de las bacterias adheridas.

Después del primer contacto de la bacteria con su célula hospedera, la bacteria se pone en contacto más íntimo con la célula a través de un Sistema de Secreción Tipo III (SSTT)^{8, 61, 74} (Fig. 1). Dichos sistemas son codificados en islas de patogenicidad de patógenos de plantas y animales, permitiendo a la célula secretar e inyectar proteínas efectoras al citosol de la célula huésped.

El SSTT se compone de aproximadamente 20 proteínas, de las cuales la mayoría se localizan en la membrana interna y son homólogas al aparato de biosíntesis flagelar sobre todo de bacterias Gram-negativas^{8, 74}. Es independiente de otras vías de secreción celular bacteriana, pero dicho proceso es regulado por señales ambientales como el contacto con la célula hospedera^{8, 61}.

En el caso de EHEC los componentes principales del canal de translocación son las proteínas EspA, EspB y EspD⁶¹. EspA es la subunidad mayor de un filamento hueco que se forma en la superficie bacteriana, mientras que EspB y EspD forman un translocón en la membrana celular del huésped. En conjunto, conforman una jeringa molecular a través de la cual son liberadas diversas moléculas efectoras al citoplasma, vía el filamento EspA, reconociéndose a EspF, EspG, EspH, Map, Tir y una proporción de las mismas EspB y EspD (Fig. 1). Al momento se han descrito diversas funciones para las proteínas efectoras; así, EspF está involucrada en la muerte celular de la célula huésped, aparentemente por apoptosis¹¹; EspH reprime la formación de filopodios y potencia la formación de pedestales de actina⁷¹; Map, por otro lado, está involucrada en la formación de filopodios y es dirigida a la mitocondria, donde interrumpe su función en el mantenimiento del potencial de membrana^{40, 42}. Para EspG no se ha definido aún un papel en la virulencia, aunque muestra homología con VirA, una proteína efectora secretada por el SSTT de *Shigella flexneri*²⁰.

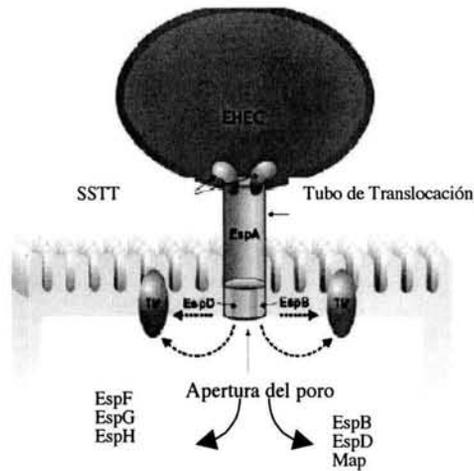


Figura 1. Sistema de Secreción Tipo III (SSTT). EspA forma una estructura filamentosa y hueca en la superficie bacteriana, mientras que EspB y EspD forman un poro que se inserta en la membrana celular del huésped. Esta estructura permite el paso de diversas moléculas efectoras, tales como Tir, EspB, EspD, EspF, EspG, EspH y Map, conduciendo a diversos cambios en las vías de señalización celular del huésped, que provocan, por ejemplo, el reordenamiento de proteínas del citoesqueleto (modificado de Vallance y Finlay, 2000⁷³).

La secreción de los efectores mencionados conduce a diversos cambios en las vías de transducción de señales del huésped, tales como la activación de la cascada de inositol trifosfato, aumento en el nivel intracelular de calcio³³, inducción de la respuesta inflamatoria y, característicamente, la reorganización del citoesqueleto^{29, 33}, llevando a la destrucción de las microvellosidades de la célula epitelial intestinal y a la pérdida de la capacidad de absorción, conduciendo probablemente a la enfermedad diarreica con la cual se asocia la infección⁵².

Entre las proteínas translocadas, y cuyo papel en la colonización e inducción de las lesiones A/E está muy bien documentado, se encuentra el Receptor Translocado de Intimina o Tir (“Translocated Intimin Receptor”)^{10, 13, 38, 43}. Una vez en el citoplasma celular, Tir es insertada en la membrana y actúa como el receptor para una proteína de membrana externa bacteriana llamada Intimina^{25, 58} (Fig. 2B). La interacción Tir-Intimina dispara el reordenamiento de diversas proteínas del citoesqueleto, particularmente de actina, conduciendo a la formación de estructuras características, conocidas como pedestales, por debajo de la bacteria adherida^{10, 13, 15, 25, 29, 38, 43, 58} (Fig. 2A). Es interesante que en EPEC y *C. rodentium*, se ha demostrado que la formación de pedestales *in vitro* es dependiente de la fosforilación en un residuo de tirosina en la posición 474, el cual no está presente en la proteína Tir de EHEC^{13, 15, 38}, lo cual, se ha postulado, indica que el proceso de formación del pedestal es diferente entre estos organismos.

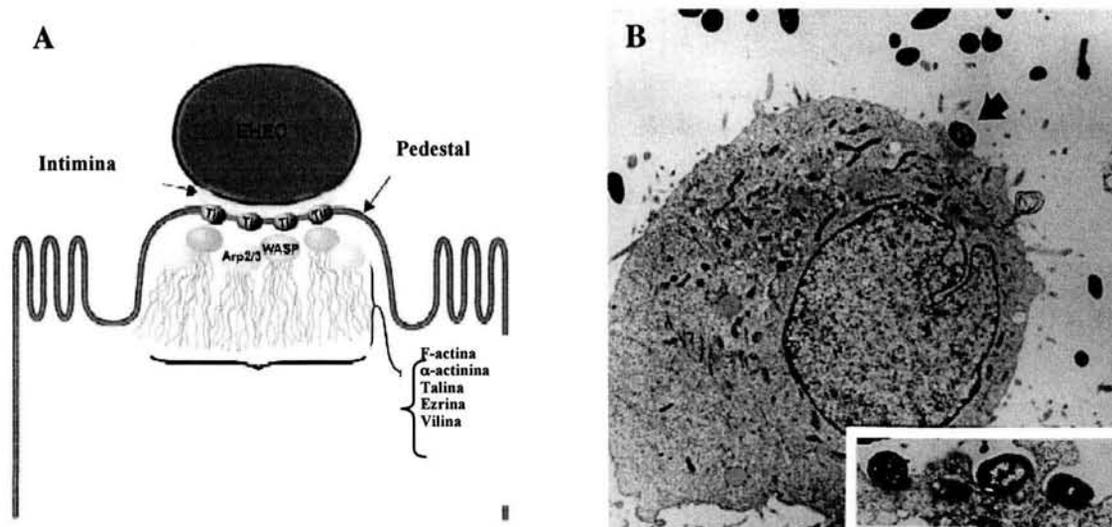


Figura 2. A) Diagrama esquemático del pedestal de actina; se muestran otras proteínas localizadas en el sitio de reclutamiento (modificado de Vallance and Finlay⁷³). B) Micrografía de transmisión electrónica de células epiteliales HEp-2 infectadas con EHEC. La punta de flecha indica la presencia de la bacteria adherida; en el recuadro, un acercamiento (tomado de Ismaili *et al.*³³).

Factores de virulencia en EHEC

Stx. Además de la lesión A/E, EHEC se caracteriza por producir una o dos citotoxinas tipo Shiga o Stx, denominadas así por su homología a la toxina de *Shigella dysenteriae*, codificadas en una variedad de bacteriofagos, y la cual es responsable de la mayoría de los síntomas de la CH y del SUH. Los miembros de esta familia de toxinas comprenden una subunidad catalítica A y 5 subunidades B⁹.

Una de las subunidades B se une al receptor glucolipídico globotriaosilcerámico 3 (Gb₃), cuya función es desconocida y se encuentra en las membranas de las células eucariontes. Después de la endocitosis mediada por el receptor, la subunidad A, con actividad N-glicosidasa, se vuelve enzimáticamente activa, cortando un residuo de adenina en el rRNA 28S, inhibiendo la unión del aminoacil tRNA dependiente del factor de elongación 1, previniendo la elongación de la cadena peptídica, inhibiendo la síntesis de proteínas y causando finalmente la muerte celular^{54, 59}.

pO157. Como se mencionó anteriormente, algunas cepas de EHEC, particularmente aquellas de serotipo O157:H7, contienen un plásmido de 60 MDa, el cual codifica un gran número de factores de virulencia conocidos o potenciales³⁷. Entre estos se encuentra una citotoxina-enterohemolisina de la familia RTX que, se ha propuesto, le permite a EHEC usar la sangre liberada al intestino como una fuente de hierro, estimulando así su desarrollo⁵⁴. También contiene una serin-proteasa denominada EspP, la cual comparte homología con una familia de proteínas llamadas autotransportadoras⁶. EspP es capaz de

cortar el factor de coagulación humano V, lo que podría contribuir a la hemorragia observada en la CH; además, se han encontrado anticuerpos contra esta proteína en suero de niños infectados con EHEC⁵⁴.

Locus de Destrucción del Enterocito (LEE)

Todos los factores necesarios para la formación de la lesión A/E están codificados en la isla de patogenicidad Locus de Destrucción del Enterocito o LEE, de 35.6 kb, insertada en el minuto 82 del cromosoma de EHEC. El LEE contiene 41 genes y se ha dividido en tres regiones funcionales y en al menos cinco operones principales^{12, 16, 21, 22, 24, 27, 51, 56, 57} (Fig. 3). Los operones *LEE1*, *LEE2* y *LEE3* codifican para los componentes del SSTT; el operón *LEE4* codifica para las proteínas secretadas a través de dicho sistema o Esp's, incluyendo a EspA, EspB y EspD, las cuales forman el translocón de secreción. El operón *LEE5* o *tir* contiene a los genes que codifican para Tir, CesT, la chaperona de Tir, y la intimina, proteínas importantes para la adherencia íntima de la bacteria con la célula huésped. El LEE está altamente conservado entre las diferentes cepas de EHEC, EPEC y *C. rodentium*, con una mayor divergencia en los genes codificantes para las proteínas secretadas^{16, 56, 57}.

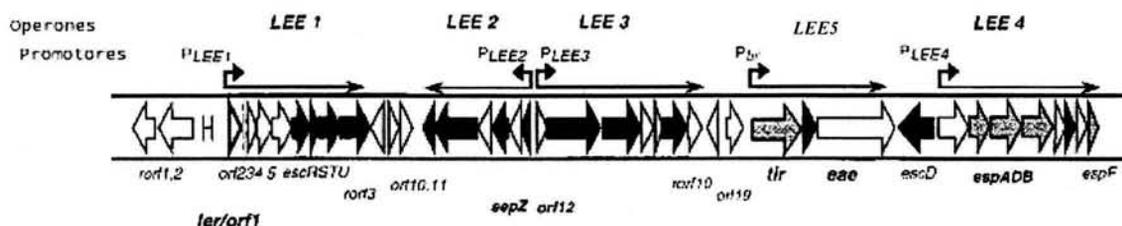


Figura 3. Isla de patogenicidad LEE. El Locus de Destrucción del Enterocito está compuesto de tres grandes regiones funcionales organizadas en cinco operones principales. *LEE1*, *LEE2* y *LEE3* contienen los genes que codifican para el SSTT; *LEE5* o *Tir* codifica a Tir, su chaperona CesT, e intimina, necesarias para la adherencia íntima; y *LEE4* codifica la mayoría de las proteínas secretadas (modificado de Elliott *et al.*²³).

Regulación Genética

Cabe mencionar que gran parte de lo que se conoce sobre regulación genética de los factores de virulencia en los patógenos A/E proviene del estudio de EPEC. Así, los genes del LEE son regulados de manera positiva por el regulador codificado en el LEE o Ler, el producto proteico de *ler*, el primer gen del operón *LEE1*^{7, 12, 21, 22, 24, 27, 32, 51, 55, 64, 65, 66}. Participan también proteínas y sistemas reguladores globales como el sistema de detección por consenso o “quorum-sensing”^{1, 4, 14, 34, 65, 67, 68}, las proteínas nucleoides de *E. coli*, IHF^{26, 27}.

^{48, 60} y H-NS^{2, 17, 32, 48, 60}, y diversas señales ambientales^{23, 50}. A continuación se menciona brevemente cómo interviene cada uno de estos reguladores en la expresión de los genes del LEE.

Señales ambientales. Los factores de virulencia están estrechamente regulados por varias señales ambientales, las cuales incluyen temperatura, concentración de iones, osmolaridad, pH, disponibilidad de fuentes de carbono y niveles de oxígeno^{23, 50}. El crecimiento en medio de cultivo para células eucariontes, por ejemplo DMEM, a 37°C, provee las condiciones óptimas para la expresión de los genes de virulencia del LEE^{7, 18, 39, 41, 55, 62, 64}. El crecimiento en medio rico, como el LB, y temperaturas por abajo o por arriba de 37°C, regulan negativamente la expresión de dichos genes^{7, 55, 64}. En EPEC el amonio juega un papel represor, no así en EHEC; más aún, la activación del promotor del operón policistrónico *LEE4*, que codifica para las proteínas EspA, EspB y EspD, es independiente de amonio, pero es inducida por alta osmolaridad y crecimiento a 37°C⁵.

“Quorum-sensing”. El “quorum-sensing” o “detección por consenso” es un mecanismo de señalización célula-célula que involucra la producción de compuestos tipo hormona, llamados autoinductores, en un ambiente dado, con los cuales la bacteria percibe incrementos en su población, así como en la de otras bacterias⁴. Cuando los autoinductores alcanzan una cierta concentración umbral en el medio, estos difunden hacia el interior de la bacteria para interactuar con proteínas reguladoras, controlando la expresión génica⁴. Estos sistemas se han reportado para una gran variedad de organismos Gram-positivos y negativos, incluidos *E. coli*, *Salmonella spp*, *Vibrio spp*, entre otros. Este tipo de regulación está involucrado en distintos eventos biológicos, por ejemplo, en *Vibrio fischeri* regula la bioluminiscencia en el calamar; en *Pseudomonas aeruginosa* regula un número de factores de virulencia, la producción de elastasa y la formación de biopelículas^{14, 68}. En *Agrobacterium tumefaciens* regula la transferencia conjugal y en *Staphylococcus aureus* regula la virulencia.

De acuerdo a algunos reportes, los genes del LEE son regulados por “quorum-sensing” a través de QseA, al activar los operones *LEE1*, *LEE2*, *LEE3* y *LEE5* vía Ler^{65, 67, 68} (Fig. 4). QseA es un regulador de la familia LysR y tiene homología con otros reguladores de virulencia, tales como PtxR de *P. aeruginosa* y AphB de *V. cholerae*⁶⁵. El papel de QseA es controversial, ya que en una mutante en *qseA* se reducen las cantidades secretadas de Tir, EspA y EspB, pero aún produce la lesión A/E⁶⁵. También se ha identificado otro regulador perteneciente al sistema de “quorum-sensing”, SdiA, el único

homólogo de LuxR en *E. coli*, la proteína reguladora de la actividad luciferasa en *V. fischeri*. SdiA regula negativamente la expresión de EspD e intimina³⁴.

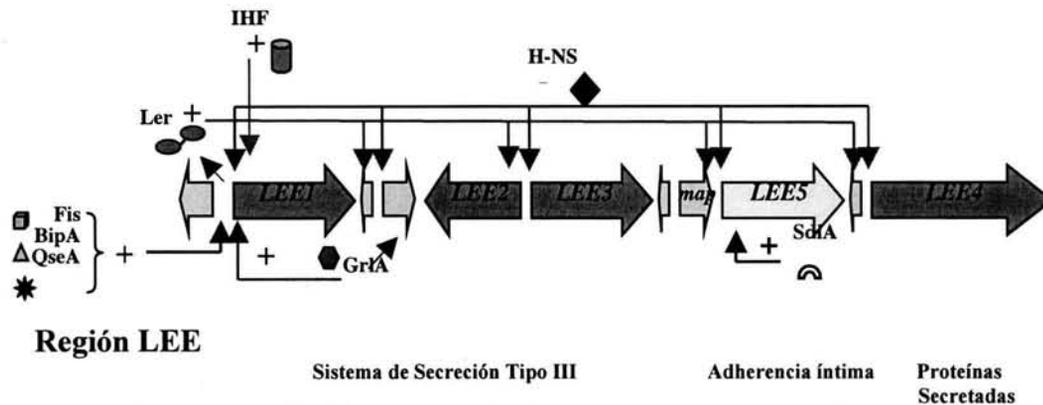


Figura 4. Modelo de regulación de los genes del LEE. Ler es el regulador positivo de los genes del LEE, que al vencer el efecto represor ejercido por el regulador global H-NS, activa la transcripción de los operones *LEE2* y *LEE3*, compitiendo por sitios de unión a DNA, activando también a los operones *LEE4* y *LEE5*. A su vez, Ler es regulado positivamente por el regulador global IHF, y por “quorum-sensing” a través de QseA. En EPEC, además se ha descrito que Ler depende de otro regulador global, Fis, y de BipA, un miembro de la superfamilia de GTPasas de unión a ribosoma^{26, 29}.

Ler (“LEE -encoded regulator”). Está relacionada a proteínas miembros de la familia H-NS/StpA de unión a DNA, con mayor similitud hacia el extremo carboxilo terminal, que contiene el dominio de unión a DNA^{2, 17}. Ler es capaz de regular la expresión de genes de virulencia codificados dentro y fuera del LEE y es necesaria para la formación de las lesiones A/E, la secreción de las proteínas efectoras y para la translocación de Tir^{22, 51}; no afecta la producción de la Stx ni de la enterohemolisina codificada en el pO157²². Por otro lado, en una mutante en *ler* se modifica el patrón de adherencia, haciendo que la bacteria se hiperadheriera con un patrón agregativo, identificándose nuevas fimbrias que no se observan en la cepa silvestre^{22, 54}, y las cuales podrían ser responsables de la adherencia inicial a la célula huésped. Ler activa a los operones *LEE2* al *LEE5*, pero no se autorregula^{7, 22, 32, 51, 55, 64, 66}.

El modelo actual de regulación por Ler propone que actúa como desrepresor desestabilizando el complejo represor formado por H-NS sobre las regiones reguladoras del *LEE2* al *LEE5*^{7, 32, 64, 72}, compitiendo por los sitios de unión al DNA^{7, 64, 72}. Es probable que también se una a las regiones reguladoras del *LEE4* y *LEE5* como se ha descrito para el *LEE2* y *LEE3* (Fig. 4).

IHF (“Integration Host Factor”). Es una proteína heterodimérica muy abundante en *E. coli* (20,000 a 100,000 moléculas por célula) de 21.8 kDa, miembro de la familia de proteínas tipo histona^{26, 48, 60}. Se une al DNA en sitios consenso altamente específicos de

proteínas tipo histona^{26, 48, 60}. Se une al DNA en sitios consenso altamente específicos de aproximadamente 35 pb, con lo cual induce curvaturas para formar complejos nucleoproteicos y permitir, en la mayoría de los casos, la transcripción de genes involucrados en diversos procesos celulares tales como recombinación sitio-específica, replicación del DNA, transposición y empacamiento^{26, 48, 60}.

Dentro de la cascada de regulación del LEE, se ha observado que en mutantes en la subunidad *ihfA* se disminuye drásticamente la producción de las proteínas Tir, intimina, EspB y EspF y no hay reorganización de actina²⁷. IHF es esencial para la formación de las lesiones A/E, regulando positivamente la expresión del operón *LEE1* al unirse corriente arriba de la secuencia promotora -35^{27} (Barba *et al.*, datos no publicados) entre las posiciones -83 y -53 (Fig. 4). Así mismo, mutantes en el sitio de unión a IHF no producen Ler⁷⁵.

H-NS (“Histone-like nucleoid-structuring protein”). Es una proteína asociada a nucleóide de 15.6 kDa, también miembro de la familia de proteínas tipo histona, que se une al DNA, preferencialmente hacia secuencias intrínsecamente curvadas y ricas en AT^{2, 17}. H-NS regula de manera negativa la expresión de genes involucrados en diferentes procesos celulares, incluyendo la virulencia, en respuesta a señales ambientales como la temperatura^{2, 17}.

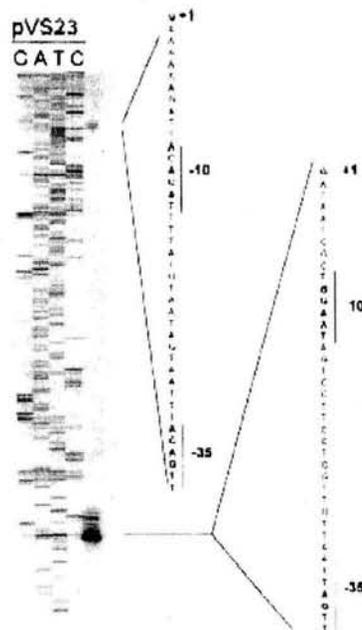
H-NS causa el silenciamiento de los promotores *LEE2* y *LEE3* por unión preferente a las Secuencias Reguladoras Silenciadoras (SRS) 1 y 2, descritas por Bustamante y colaboradores en el 2001⁷, requeridas para la regulación negativa de los operones *LEE2* y *LEE3* en ausencia de Ler, impidiendo el reconocimiento del promotor por la RNA polimerasa^{7, 66, 72}. Además, regula al *LEE4*, *LEE5* y al gen *espG*^{32, 64, 72} (Fig. 4).

GrlR y GrlA. Entre los operones *LEE1* y *LEE2* se encuentran dos marcos de lectura abiertos recientemente descritos, correspondientes a *orf10* y *orf11*, ahora *grlR* y *grlA*, respectivamente¹². Dichos genes codifican para dos nuevos reguladores de la expresión de *ler* y de otros genes del LEE. GrlR se propone como un modulador negativo, pues la sobreexpresión de este gen disminuye la expresión de *ler*. GrlA, por el contrario, se propone que actúa como un activador (Fig. 4), dado que en una mutante en *grlA* se abate la expresión de *ler*. Más aún, una doble mutante en *ler* y *grlA*, al ser complementada con *ler*, recupera el fenotipo silvestre, pero la misma mutante complementada con *grlA* no lo hace, por lo que se propone que *grlA* actúa corriente arriba de *ler* en la cascada de regulación¹² (Barba *et al.*, datos no publicados).

En el modelo de regulación propuesto de los genes del LEE, IHF y GrlA se unen antes del promotor de *ler*, activando su transcripción. *Ler* activa a los operones *LEE2* a *LEE5*, venciendo la regulación negativa ejercida por H-NS, compitiendo probablemente por la unión al DNA.

Sorprendentemente, y a diferencia de lo descrito en EPEC, para EHEC se han reportado dos promotores en *ler*⁶⁵, uno proximal, que se encuentra a 32 pb corriente arriba del sitio de inicio de la traducción, presente sólo en EHEC, y otro que se encuentra 169 pb corriente arriba (promotor distal), común entre *ler* de EPEC y EHEC²². Al hacer un alineamiento de las regiones reguladoras del gen en ambos organismos, en EPEC se encontró una duplicación de 6 nucleótidos (ATAAGG) en una región que correspondería a una probable región -10 del promotor proximal *LEE1* de EHEC, interrumpiendo dicho promotor²² (Fig. 5). La relevancia del promotor proximal en EHEC no se ha estudiado, ni tampoco su funcionalidad, aunque es posible que implique diferencias en la regulación del gen y, en consecuencia, del resto de genes bajo el control de *ler*.

A



JUSTIFICACIÓN

En virtud del papel que Ler juega como regulador central de la transcripción de los factores de virulencia en EHEC y a la propuesta de que existe un segundo promotor en la región reguladora de EHEC, que podría implicar diferencias en el mecanismo regulador en respuesta a señales ambientales y fisiológicas con respecto a EPEC y *C. Rodentium*, consideramos importante estudiar su regulación. Se creía que Ler era el único regulador de los genes del LEE codificado en el LEE; sin embargo, la reciente descripción de los nuevos reguladores GrIR y GrIA, abre la posibilidad de encontrar datos interesantes que ayuden a completar la cascada de regulación, ya amplia hasta el momento, y a entender mejor el mecanismo de regulación de los genes de virulencia involucrados en la patogénesis A/E, específicamente en los codificados en el LEE de EHEC.

HIPÓTESIS

Ler es un regulador positivo de los genes de virulencia codificados por el LEE en EHEC, EPEC y *C. rodentium*. Existen diferencias en el mecanismo de regulación de *ler* entre EHEC y EPEC, no obstante que la secuencia nucleotídica de la región reguladora de *ler* está altamente conservada entre dichos patógenos. Dichas diferencias están dictadas por la presencia de un segundo promotor en la región reguladora proximal de *ler* en EHEC, que permite que su regulación, en relación a la cinética de expresión, y su comportamiento en respuesta a las condiciones de crecimiento y a reguladores transcripcionales, sea distinta que la del gen *ler* de EPEC.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Estudiar la regulación de los factores de virulencia de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC).

Objetivo particular:

- Estudiar la regulación transcripcional del gen *ler* en EHEC O157:H7.

Objetivos experimentales:

- Construir y caracterizar fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*, conteniendo diferentes porciones de la región reguladora del gen *ler* de la cepa EHEC O157:H7 EDL-933.
- Evaluar la expresión de las fusiones *ler-cat* en las cepas: *E. coli* K-12 (MC4100), EPEC O127:H6 (E2348/69) y EHEC O157:H7 (EDL-933).
- Evaluar la expresión de las fusiones *ler-cat* en diferentes condiciones de crecimiento.
- Confirmar el inicio o inicios de transcripción de *ler*.
- Mutar la caja -35 del promotor proximal propuesto para determinar su funcionalidad y papel en la expresión de *ler*.

MATERIALES Y MÉTODOS

➤ Cepas bacterianas y medios de cultivo

Las cepas y plásmidos empleados en este estudio se enlistan en la Tabla 1. Las bacterias fueron cultivadas en medio LB (Luria Bertani; contiene por litro 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, pH 7.5), medio de cultivo para células eucariontes tipo DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”, Gibco BRL. A un sobre de DMEM se le adicionaron 3.7 g de NaHCO₃ y 160 µl de piridoxal 25 µg/µl), o medio mínimo M9 (contiene por litro 6 g de Na₂HPO₄, 3 g de KH₂PO₄, 1.5 g de NaCl y 1 g de NH₄Cl, pH 7.4), suplementados con los antibióticos como indica la Tabla 2, o con otros componentes donde se indica.

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Cepa	Características	Referencia
EDL933	Cepa EHEC O157:H7 prototípica	Perna <i>et al.</i> , 2001 ⁵⁷
E2348/69	Cepa EPEC O127:H6 prototípica; Nal ^R	Levine <i>et al.</i> , 1978
MC4100	Cepa <i>E. coli</i> K-12 no patogénica; St ^R	Laboratorio
EDL933 <i>Δler</i>	EHEC O157:H7 con una inserción en <i>ler::Km</i> ; Km ^R	Vázquez, Alejandra; IBT-UNAM
EDL <i>ΔgrlA</i>	EHEC O157:H7 con una inserción en <i>grlA::Km</i> ; Km ^R	Vázquez, Alejandra; IBT, UNAM
E2348/69 <i>ΔihfA</i>	EPEC O127:H6 con una inserción en <i>ihf::Km</i> ; Km ^R	Morales, Claudia, Tesis de Maestría; BUAP
DH5α	Cepa <i>E. coli</i> supE44 <i>ΔlacU169</i> (F80 <i>lacZDM15</i>) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Stratagene
Plásmidos		
pKK232-8	Derivado de pBR322, contiene el gen <i>la</i> para la cloranfenicol acetil-transferasa (<i>cat</i>) sin promotor; Ap ^R	Pharmacia Biotech
plerEH-136	Derivado de pKK232-8, contiene sólo el promotor proximal de <i>ler</i> (posición -136 a +186)	Este trabajo
plerEH-268	Derivado de pKK232-8, contiene los dos promotores de <i>ler</i> reportados y el sitio de unión a IHF (posición -268 a +186)	Este trabajo
plerEH-402	Derivado de pKK232-8, contiene los dos promotores de <i>ler</i> reportados, el sitio de pegado de IHF y una región reguladora río arriba (posición -402 a +186)	Este trabajo
p268PSacII	Plásmido plerEH-268 mutante en el promotor proximal, por la inserción de un sitio <i>SacII</i> en la caja -35	Este trabajo
p268PBgIII	Plásmido plerEH-268 mutante en el promotor proximal, por la inserción de un sitio <i>BgIII</i> en la caja -35	Este trabajo
p402PBgIII	Plásmido plerEH-402 mutante en el promotor proximal, por la inserción de un sitio <i>BgIII</i> en la caja -35	Este trabajo
pSEPZ-11	Derivado del pKK232-8 conteniendo el operón <i>LEE2</i> de EHEC (equivalente al pSEPZ-11 de EPEC, posición -469 a +121)	Laboratorio
pSEPZ-17	Derivado del pKK232-8 conteniendo el operón <i>LEE2</i> de EPEC (posición -43 a +121)	Bustamante <i>et al.</i> ⁷

Tabla 2. Uso de antibióticos en los medios de cultivo

Antibiótico	Abreviatura	Concentración del "stock"	Concentración empleada
Ampicilina	Ap	200 mg/ml	100 µg/ml
Kanamicina	Km	25 mg/ml	30 µg/ml
Ac. Nalidíxico	Nal	25 mg/ml	150 µg/ml
Estreptomicina	St	100 mg/ml	100 µg/ml

➤ Construcción de las fusiones

Los fragmentos de DNA para la construcción de las fusiones se obtuvieron usando los oligonucleótidos listados en la Tabla 3 por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Como templado se utilizó DNA cromosomal de la cepa EHEC O157:H7 EDL-933, el cual se obtuvo por lisis celular. Brevemente, se inocularon 5 ml de LB con la cepa y se incubaron durante toda la noche en agitación a 37°C (sin antibióticos pues la cepa no tiene resistencia). Al día siguiente, se obtuvo una pastilla del cultivo, a la cual se le agregaron 100 µl de agua desionizada estéril, se resuspendió e hirvió durante 10 min en un baño María. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 rpm por 3 min, recuperando 100 µl del sobrenadante, que se usó en la siguiente reacción.

Reactivo	Volumen
DNA genómico (~10 ng)	10 µl
Regulador 10 X	5 µl
MgCl ₂ 25 mM	5 µl
Mezcla de dNTP* 25 mM	8 µl
Oligo F (25 µM)	1 µl
Oligo R (25 µM)	1 µl
Enzima <i>Taq</i> polimerasa (Altaenzymes, 5 U/µl)	0.3 µl
Enzima <i>Pfu</i> polimerasa (Stratagene, 5 U/µl)	0.2 µl
Agua desionizada	19.5 µl

*dATP, dCTP, dGTP, dTTP (New England Biolabs).

Las condiciones de alineamiento y tiempo de amplificación variaron en cada reacción según los pares de oligonucleótidos empleados y del tamaño del fragmento a amplificar. Las fusiones se nombraron con base al sitio de inicio de la transcripción del promotor distal.

Cuando fue necesario, el DNA se sometió a electroforesis en geles de agarosa (BIORAD) al 1 ó 2%, utilizando el regulador TAE 1X (contiene por litro 242 g de trisma base, 136 g de acetato de sodio trihidratado, 37 g de EDTA y 73 ml de ácido acético, pH 8.0) a 80-100 V. Al final, el gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), se visualizó en un transiluminador con luz ultravioleta de onda corta (AlphaImager) y se fotografió.

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo*

Oligo	Secuencia 5' a 3'	Características
ler260-BHI-F	CTC CTG GG/G ATC CAC TCG CT	Oligonucleótido 5' que se empleó para generar la fusión plerEH-402.
ler120-BHI-F	ACT AAA TG/G ATC CGC AAT TAT TAA AG	Oligonucleótido 5' que se empleó para generar la fusión plerEH-268.
ler01-BHI-F	GAA AAC AGA GG/A TCC TAA CAT TTT AAG G	Oligonucleótido 5' que se empleó para generar la fusión plerEH-136.
orf1-H3-R	TCT ATA/ AGC TTA ATG TAT G	Oligonucleótido reverso que se empleó junto con los tres anteriores para generar las diferentes fusiones.
pKK-8-BHI-F	G/GA TCC CTC GGG GAT	Oligonucleótido correspondiente a una secuencia del vector en la región 5' del gene reportero que se empleó para secuenciar las tres fusiones anteriores.
pKK-8-H3-R	GTT TTC GA/A TAC AGC	Similar al anterior pero correspondiente a una secuencia del gen reportero.
ompA	TTT GCG CCT CGT TAT CAT CCA A	Oligonucleótido empleado para detectar el transcrito del gen <i>ompA</i> por "primer extension"
PP-F-BglII	ATT TAT ATC ATA/ GAT CTA ATT GTT GGT CC	Oligonucleótido mutagénico, introduce un sitio <i>BglII</i> que reemplaza la caja -35 del promotor proximal de <i>ler</i> .
PP-R-BglII	GGA CCA ACA ATT A/GA TCT ATG ATA TAA AT	Complementario al anterior.
PrPF-SacII	CTC ACA TAA TTT ATA TCA TCC GC/G GAT TGT TGG TCC TTC CTG	Oligonucleótido mutagénico, introduce un sitio <i>SacII</i> que reemplaza la caja -35 del promotor proximal de <i>ler</i> .
PrPR-SacII	CAG GAA GGA CCA ACA ATC CGC /GGA TGA TAT AAA TTA TGT GAG	Complementario al anterior.
SeQ1CAT	CGG TGG TAT AAT CCA GTG AT	Oligo que se empleó para secuenciar las fusiones y los plásmidos mutantes.

*Las diagonales indican el sitio de corte de la enzima; en negritas se indican los cambios introducidos para generar el sitio de restricción deseado.

➤ Digestiones

Los fragmentos de PCR se digirieron con distintas enzimas de restricción (Tabla 4) para ser clonados en el vector pKK232-8. El volumen de las reacciones varió entre 15-30 µl, según la cantidad de DNA a digerir y si eran sencillas o dobles. Para estas últimas, primero se digirió con una enzima y después con la otra. Todas las reacciones se llevaron a cabo según las indicaciones de cada compañía.

➤ Ligaciones

Una vez digeridos los productos de PCR y el vector, se llevaron a cabo las reacciones de ligación. A continuación se describe un ejemplo:

DNA inserto (~40 ng)	4 µl
DNA vector (~10 ng)	6 µl
Regulador 10 X	2 µl
Enzima T4 DNA ligasa (Promega, 3 U/µl)	0.5 µl
Agua	7.5 µl

La mezcla se incubó toda la noche a temperatura ambiente (~16°C).

Tabla 4. Endonucleasas de restricción utilizadas en este trabajo

Endonucleasas	Sitio de restricción	Compañía
<i>Bam</i> HI	G/GATCC	Invitrogen
<i>Hind</i> III	A/AGCTT	Invitrogen
<i>Sac</i> II/ <i>Sst</i> II	CCGC/GG	New England Biolabs/Invitrogen
<i>Bgl</i> II	A/GATCT	Invitrogen
<i>Dpn</i> I	GA/TC	New England Biolabs

Las diagonales indican el sitio de corte de la endonucleasa.

➤ Transformación

Para la transformación de las reacciones de ligación se prepararon células electrocompetentes como sigue:

Se inocularon 5 ml de LB más los antibióticos con la cepa de interés durante toda la noche en agitación a 37°C. Al día siguiente, se subcultivó con 200 µl del cultivo anterior, un matraz con 50 ml de LB y antibióticos y se incubó en agitación a 37°C hasta una $DO_{600nm} = 0.6$. El matraz se colocó en hielo y, posteriormente, se centrifugó todo el cultivo durante 5 min a 4°C a 10,000 rpm, obteniendo la pastilla del cultivo.

La pastilla se lavó dos veces con 20 ml de agua fría estéril y se centrifugó como en el paso anterior. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con 20 ml de glicerol al 10 % frío.

Al final, la pastilla se resuspendió en 1 ml de glicerol al 10 % y se alicuotaron 80 µl de células en tubos Eppendorf de 0.6 ml, almacenándolas a -70°C hasta su uso.

A un tubo de células electrocompetentes se le agregaron cantidades variables de DNA, dependiendo de si se trataba de reacciones de ligación o plásmidos. La mezcla se colocó en

una celda de electroporación para dar un pulso eléctrico (2.5 kV, 25 μ F, 5 msec), en un aparato “*E. coli* pulser” (BIORAD). Las células fueron transferidas a un tubo Eppendorf con 1 ml de medio SOC (2 g de bacto triptona, 0.5 g de extracto de levadura, 200 μ l de NaCl 5M, 250 μ l de KCl 1 M, 1 ml de MgCl₂ 1 M, 1 ml de MgSO₄ 1 M y 0.36 g de glucosa, aforado a 200 ml con agua desionizada) y recuperadas durante 1 ó 2 horas a 37°C en agitación. Posteriormente, se sembraron de 30 a 200 μ l de células en placas de LB (LB más 15 g de agar por litro) con el antibiótico de selección y se incubaron a 37°C.

➤ Purificación de DNA

Cuando se trató de obtener DNA a partir de colonias se purificó por la técnica de lisis alcalina o “miniprep”³:

Se obtuvo una pastilla de células a partir de un cultivo de 4 ml por centrifugación a 12,000 rpm durante 3 min, en tubos Eppendorf. Se agregaron 200 μ l de solución 1 (4.5 ml de glucosa al 20 %, 2 ml de EDTA 5 M, 1.25 ml de Tris-HCl 2 M pH 8.0, aforado a 100 ml con agua desionizada), se resuspendió y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se agregaron 200 μ l de solución 2 (2 ml de NaOH 10 N, 5 ml de SDS al 20 %, aforado a 100 ml con agua desionizada), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se agregaron 200 μ l de la solución 3 (acetato de potasio 3 M, pH 8.0), se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 10 min.

Transcurrido el tiempo, la mezcla se centrifugó durante 10 min a 12,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo y se le adicionaron 300 μ l de fenol pH 8.0 (Research Organics) y 150 μ l de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1. Se mezcló por inversión durante 5 min. La mezcla se centrifugó durante 8 min a 12,000 rpm y se recuperaron aproximadamente 500 μ l de la fase acuosa.

Se agregó 1 ml de etanol absoluto, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70 %, se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y el DNA se secó con calor al vacío durante 12 a 15 min.

Finalmente, el DNA se resuspendió en 35 μ l de agua tridestilada estéril.

También se utilizó el estuche comercial “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche) siguiendo las indicaciones de la compañía.

➤ Secuenciación

Una vez que las construcciones se verificaron por patrón de digestión, se procedió a la caracterización por secuenciación según el método de Sanger⁶⁰, usando el equipo comercial "Termosecuensasa" (Amersham).

En principio, se usaron los oligonucleótidos pKK-8-BHI-F y pKK-8-H3-R, los cuales se marcaron radioactivamente con la siguiente reacción:

Oligonucleótido (1.25 μ M)	0.4 μ l
Regulador de cinasa 10 X	1 μ l
[³² P]- γ ATP* (5 μ Ci)	0.4-1 μ l
Enzima T4 Polinucleótido cinasa (USB, 30 U/ μ l)	0.2 μ l
Agua	cbp 10 μ l

*depende de su decaimiento.

Esta mezcla se incubó a 37°C durante 30 min y se inactivó a 75°C por 5 min.

Posteriormente, se preparó la siguiente mezcla de reacción para secuenciar cada una de las fusiones:

DNA plasmídico (obtenido por el estuche comercial de Roche)	10 μ l
Regulador de Sequensasa 10 X	2.4 μ l
Oligo radiactivo (reacción anterior)	1 μ l
Enzima Sequensasa (USB, 4 U/ μ l)	0.6 μ l
Agua	cbp 20 μ l

Por otro lado, en cuatro tubos de 0.5 ml diferentes, se agregaron 4 μ l de cada uno de los dideoxiterminadores (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP). Posteriormente, se adicionaron 4 μ l de la mezcla de reacción antes descrita. Las reacciones se sometieron a los siguientes ciclos en un termociclador:

Evento	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	94°C	5 min	} 50
Desnaturalización	94°C	30 seg	
Apareamiento	47°C	30 seg	
Amplificación/Extensión	60°C	2 min	

Al término, se adicionaron 4 μ l de formamida al 95 %, o solución de paro, a las muestras. La secuencia se corrió en un gel de poliacrilamida al 8 % (80 ml de solución de

acrilamida al 8 %, 250 μ l de persulfato de amonio, PSA, al 10 % y 50 μ l de Tetrametiletilendiamina, TEMED), el cual se precalentó 40 minutos a 40 W en regulador TBE 1 X (Tris-Boratos-EDTA; 108 g de trisma base, 9.3 g de EDTA y 55 g de ácido bórico para 1 litro de solución 10 X). Las muestras se calentaron durante 3 min a 90°C, se cargaron 6 μ l en cada pozo del gel y se sometieron a electroforesis, con corridas de 4, 6, 8 y hasta 10 horas, según el tamaño del inserto. Al término del tiempo de corrida, el gel se secó al vacío a 80°C por una hora y se expuso en un cartucho tipo "PhosphorImager" (Molecular Dynamics) o bien en una película fotográfica.

➤ **Ensayos de actividad CAT**

La curva de actividad de cloranfenicol acetil-transferasa (CAT) de las fusiones transcripcionales se llevó a cabo como se describe a continuación:

Se inocularon matraces con 50 ml de LB con la cepa de interés y los antibióticos correspondientes. Se incubaron toda la noche en un baño María con agitación (Amerex Instruments) a 80 rpm a 37°C. Al día siguiente se midió la DO_{600nm} de cada cultivo, se tomaron 10 ml de cada uno y se centrifugaron durante 5 min a 10,000 rpm, desechando el sobrenadante.

Las pastillas se lavaron con 10 ml de PBS (Regulador Salino de Fosfatos; un litro de solución 10 X contiene 80 g de NaCl, 6.1 g de Na_2HPO_4 , 2 g de KH_2PO_4 y 2 g de KCl, pH 7.0). Se centrifugaron nuevamente durante 5 min a 10,000 rpm. Se ajustó la DO_{600nm} de los cultivos a 1.0 con PBS 1 X. Posteriormente se inocularon matraces con 65 ml de DMEM, adicionados de Ap y LB al 1 %, con 1 ml del cultivo ajustado y se incubaron en el baño a 37°C y a 210 rpm.

A la hora 2 de incubación se tomaron 15 ml del cultivo, registrando la densidad óptica, se centrifugaron a 4°C por 5 min a 10,000 rpm, se tiró el sobrenadante y la pastilla se lavó con 900 μ l de TDTT (Tris-DTT; 7.5 ml de Tris-HCl 1 M pH 7.8, 4.5 μ l de Ditioneitol 1 M y 142.5 ml de agua desionizada para un volumen final de 150 ml). Se centrifugó por 2 min, se desechó el sobrenadante y se guardó la pastilla a -20°C en tubos Eppendorf de 1.5 ml.

A la hora 3 se tomaron 10 ml del cultivo y se procesaron como en el paso anterior. A la hora 4 se tomaron 5 ml, 3 ml a la hora 5, y 1 ml a partir de la hora 6 y hasta la 12, procesando las muestras como en el paso 6.

Una vez colectadas todas las muestras se resuspendieron en cantidades variables de TDTT, desde 100 μ l para las muestras de la hora 2, hasta 500 μ l para las muestras de la hora 7 en adelante.

Las muestras se sonicaron por 4-6 ciclos durante 30 seg en un sonicador "Vibra Cell" (Sonics and Materials, Inc.). Se centrifugaron a 10,000 rpm por 25 min y los extractos se transfirieron a un tubo nuevo, almacenando pastillas y sobrenadantes a -20°C.

➤ **Actividad CAT y cuantificación de proteínas**

Para la cuantificación de proteínas, se colocaron 10 µl de la muestra por duplicado en una microplaca de 96 pozos (Costar) y se agregaron 200 µl de una mezcla de reacción del estuche "BCA Protein Assay Reagent" (Pierce). La placa se incubó durante 30 min a 37°C y, posteriormente, se realizó la lectura en un lector automatizado de microplacas tipo CERES 900C (Bio-Tek Instruments Inc.), usando el programa KC3 Jr.

En microplacas de 96 pozos se colocaron 5 µl de muestra por duplicado y se agregaron 200 µl de una mezcla de reacción que contenía 1 mM de DNTB (5,5'-ditio-bis-2-ácido nitrobenzoico, Research Organic, Inc.), 0.1 mM de Acetil-CoA (Pharmacia Biotech), 0.1 mM de cloranfenicol (Sigma), en 0.1 M de Tris-HCl pH 7.8. La lectura de absorbancia a 410 nm se llevó a cabo en el mismo lector de microplacas usando el programa KC3 Jr en el modo de cinética.

La actividad específica de CAT en µmol/mg-min se determinó dividiendo la lectura de la actividad de CAT entre la concentración de proteínas.

➤ **"Primer Extension"**

Para la obtención de muestras se inocularon 5 ml de LB más antibióticos con la cepa de interés y se preincubó en agitación a 37°C, durante toda la noche.

Al día siguiente se reinocularon 50 ml de DMEM más Ap y LB al 1 %, con 1 ml del inóculo de toda la noche ajustado a una $DO_{600nm} = 1.0$ con PBS 1 X.

Se tomaron 20 ml del cultivo a una $DO_{600nm} = 1.0$, obteniendo una pastilla por centrifugación a 4°C a 10,000 rpm durante 5 min; se desechó el sobrenadante.

Se extrajo el RNA de las muestras obtenidas usando un estuche comercial de extracción de RNA "RNeasy Mini Kit" (QIAGEN), según las instrucciones del proveedor. Al término de la extracción, el RNA fue resuspendido en 100 µl de agua tratada con DEPC (Diethyl Pirocarbonato, 100 µl en 100 ml de agua desionizada), un agente alcalinizante altamente reactivo empleado para inactivar RNAsas en reguladores y materiales de vidrio. Se cuantificó la concentración del RNA a 260 y 240 nm con luz UV en un espectrofotómetro y, posteriormente, se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 2 % tratado con tiocianato de guanidina, una sal caotrópica desnaturizante de proteínas, con

fuerte actividad inhibidora de ribonucleasas empleada en la extracción de RNA⁵⁹. Finalmente, se tiñó el gel y se fotografió como se mencionó anteriormente.

A continuación, se estandarizaron las condiciones de reacción del “primer extension” para las muestras como sigue:

Hibridación

RNA	30 µg
Agua DEPC	cbp 25 µl
NaCl 5 M	1.88 µl
Tris 1M pH 8.0	0.89 µl
Oligo radioactivo (~5 µCi)	0.8 µl

Esta mezcla se incubó en un bloque a 90°C durante 3 min. Posteriormente, se retiró el bloque dejándolo enfriar a temperatura ambiente hasta una temperatura de aproximadamente 50°C, entonces se preparó la mezcla para la segunda reacción:

Extensión

Inhibidor de RNasa (Invitrogen, 40 U/µl)	1.77 µl
Regulador 5 X	10 µl
DTT 100 mM	5 µl
dNTP's 25 µM	1.5 µl
Enzima AMV-RT (USB, 15 U/µl)	0.8 µl
Agua DEPC	cpb 50 µl

La mezcla de ambas reacciones se incubó durante 3 horas a 42°C y, posteriormente, se concentró por precipitación con butanol. A la reacción se le agregó 1 ml de butanol, se mezcló por pipeteo y se centrifugó durante 15 min a 14,000 rpm. Esto se repitió cuantas veces fue necesario para obtener 2 fases. Posteriormente, se tomó la fase superior, se centrifugó y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 70 %, centrifugando durante 3 min a 14,000 rpm; este paso se repitió 3 veces, desechando el sobrenadante. Finalmente, se resuspendió la pastilla en 5 µl de agua desionizada y se agregaron 3 µl de solución de paro. Las muestras fueron sometidas a electroforesis en un gel de secuencia como ya se describió.

Para el control de *ompA* las condiciones fueron las siguientes:

Hibridación

RNA	3 μ g
Agua DEPC	cbp 25 μ l
NaCl 5 M	1.35 μ l
Tris 1 M pH 8.0	0.64 μ l
Oligo radioactivo (~5 μ Ci)	1 μ l

Extensión

Inhibidor de RNasa	1.22 μ l
Regulador 5 X	7.2 μ l
DTT 100 mM	3.6 μ l
dNTP's 25 μ M	1.1 μ l
Enzima AMV-RT	1 μ l
Agua DEPC	cbp 36 μ l

Ambas reacciones se incubaron y precipitaron como ya se describió.

➤ Mutagénesis sitio-dirigida

Se empleó como molde el DNA de las fusiones previamente obtenidas, siguiendo el protocolo de mutagénesis sitio-dirigida del estuche comercial de Stratagene. Los oligonucleótidos diseñados reemplazan la caja -35 del promotor proximal de *ler* (ver tabla 3) por un sitio de restricción. El DNA se amplificó bajo las siguientes condiciones y ciclos:

Reactivo	Volumen
MgSO ₄ 100 mM	3 μ l
Regulador 10 X	5 μ l
dNTP's 25 mM	5 μ l
Oligo F 100 ng/ μ l	1.5 μ l
Oligo R 100 ng/ μ l	1.5 μ l
DNA plasmídico	7 μ l
Enzima <i>Pfu</i> (Stratagene, 5 U/ μ l)	0.5 μ l
Agua	26.5 μ l

*en algunos casos se añadió aceite mineral.

Evento	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización	95°C	5 min	} 18
Desnaturalización	95°C	30 seg	
Apareamiento	60-62°C	1 min	
Amplificación/Extensión	72°C	12 min	

La temperatura de apareamiento se determinó según el contenido de bases G y C de los oligonucleótidos; los ciclos se ajustaron de acuerdo al número de cambios introducidos por los oligonucleótidos y el tiempo de extensión con base en la longitud del plásmido molde (2 min por cada 1000 pb).

Posteriormente, las reacciones se sometieron a digestión con la enzima *DpnI* durante 1 hora a 37°C y se transformaron en una cepa de *E. coli* K-12 DH5 α . Se obtuvieron varias clonas conteniendo el probable plásmido mutagenizado, el cual se seleccionó por digestión. Una vez seleccionado el plásmido, se envió a secuenciar a la Unidad de Secuenciación del IBt.

RESULTADOS

Construcción de fusiones transcripcionales *ler-cat*.

Ler es un regulador transcripcional positivo de la expresión de los genes del LEE en EPEC y EHEC, codificado por *ler*, el primer gen del operón *LEE1*⁵¹. Con el propósito de estudiar la regulación genética de *ler* en EHEC, se construyeron tres fusiones transcripcionales que contienen diferentes porciones de la región reguladora del gen (Fig. 6), tomando en consideración fusiones equivalentes en EPEC que han sido analizadas en el laboratorio⁷ (Barba *et al.*, datos no publicados).

Los diferentes fragmentos de la región reguladora de *ler*, se amplificaron por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos se digirieron con las endonucleasas de restricción *Bam*HI y *Hind*III y se clonaron en el vector pKK232-8, que contiene al gen reportero *cat* carente de promotor y que había sido previamente digerido con las mismas enzimas, para generar las fusiones transcripcionales.

Los productos de la reacción de clonación se introdujeron por electroporación a la cepa *E. coli* K-12 MC4100. Las fusiones se caracterizaron mediante la purificación de DNA de plásmido de las clonas candidatas y la liberación del inserto del tamaño esperado después de digerir con *Bam*HI-*Hind*III, lo cual fue analizado en un gel de agarosa al 1 %. Una vez confirmada la secuencia correcta de la fusión en el plásmido, los plásmidos se transformaron en las cepas silvestres EPEC E2348/69 y EHEC EDL-933 para realizar ensayos de actividad de CAT.

Las fusiones plerEH-402 y plerEH-268 contienen fragmentos correspondientes a la región reguladora de *ler* que van de la posición -402 a +86 y -268 a +86, respectivamente, con respecto al inicio de la transcripción del promotor distal, abarcando el sitio de unión a IHF reportado para EPEC (Fig. 6). Ambas son equivalentes a fusiones de *ler* de EPEC generadas en el laboratorio que contienen los elementos reguladores mínimos para la expresión de *ler* a partir del promotor distal⁵⁵ (Barba *et al.*, datos no publicados). La fusión plerEH-136 contiene un fragmento que va de la posición -136 a +86 y abarca únicamente el promotor proximal (Fig. 6).

Expresión de las fusiones transcripcionales *ler-cat* en DMEM.

Con las cepas transformadas se realizó una curva de actividad de la enzima cloranfenicol acetil-transferasa (CAT), codificada por el gen reportero *cat*, de las diferentes fusiones *ler-cat* a lo largo de 12 horas de crecimiento bacteriano, en medio de cultivo para

células eucariontes DMEM en agitación a 37°C, condiciones previamente reportadas como óptimas para la expresión de los genes del LEE^{7, 18, 33, 41, 55, 62, 64}.

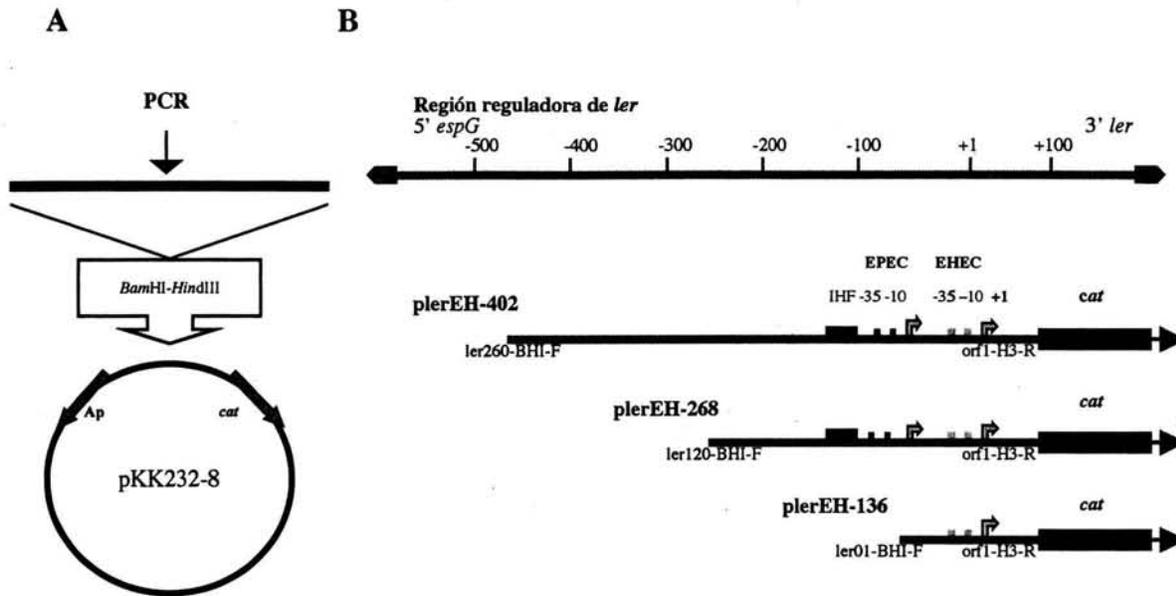


Figura 6. Diagrama de la construcción de las fusiones transcripcionales *ler-cat* de EHEC. A) Los fragmentos de DNA se obtuvieron por PCR a partir del cromosoma de la cepa de EHEC EDL933, cortando con las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III y se clonaron en el vector pKK232-8. B) Se muestran las coordenadas de acuerdo al inicio de transcripción descrito para EPEC, así como la ubicación de los inicios de transcripción y las cajas -10 y -35 reportadas para EHEC, además del sitio de unión de IHF.

La fusión plerEH-402 fue activa en los fondos genéticos EPEC y EHEC, con niveles máximos de aproximadamente 900 y 1200 unidades, respectivamente (Fig. 7A). Esta fusión contiene una región reguladora larga que abarca de la posición -402 a +86, (Fig. 6A). Al eliminar la región que va de la posición -402 a -268 en la fusión plerEH-268, la expresión aumentó alrededor de 4 veces en EHEC (4000 unidades) y casi 3 veces en EPEC (2500 unidades, Fig. 7B), con relación a los niveles máximos observados para la fusión más larga. Dicha región eliminada podría estar involucrada en la regulación negativa, probablemente mediada por H-NS o algún otro factor aún no identificado.

Por otro lado, ambas fusiones fueron poco activas en el fondo genético MC4100 (Fig. 7A y B), lo que sugiere que al igual que en EPEC, en EHEC se requiere de un factor adicional ausente en *E. coli* K-12 para la activación de *ler*²¹ (Barba *et al.*, datos no publicados).

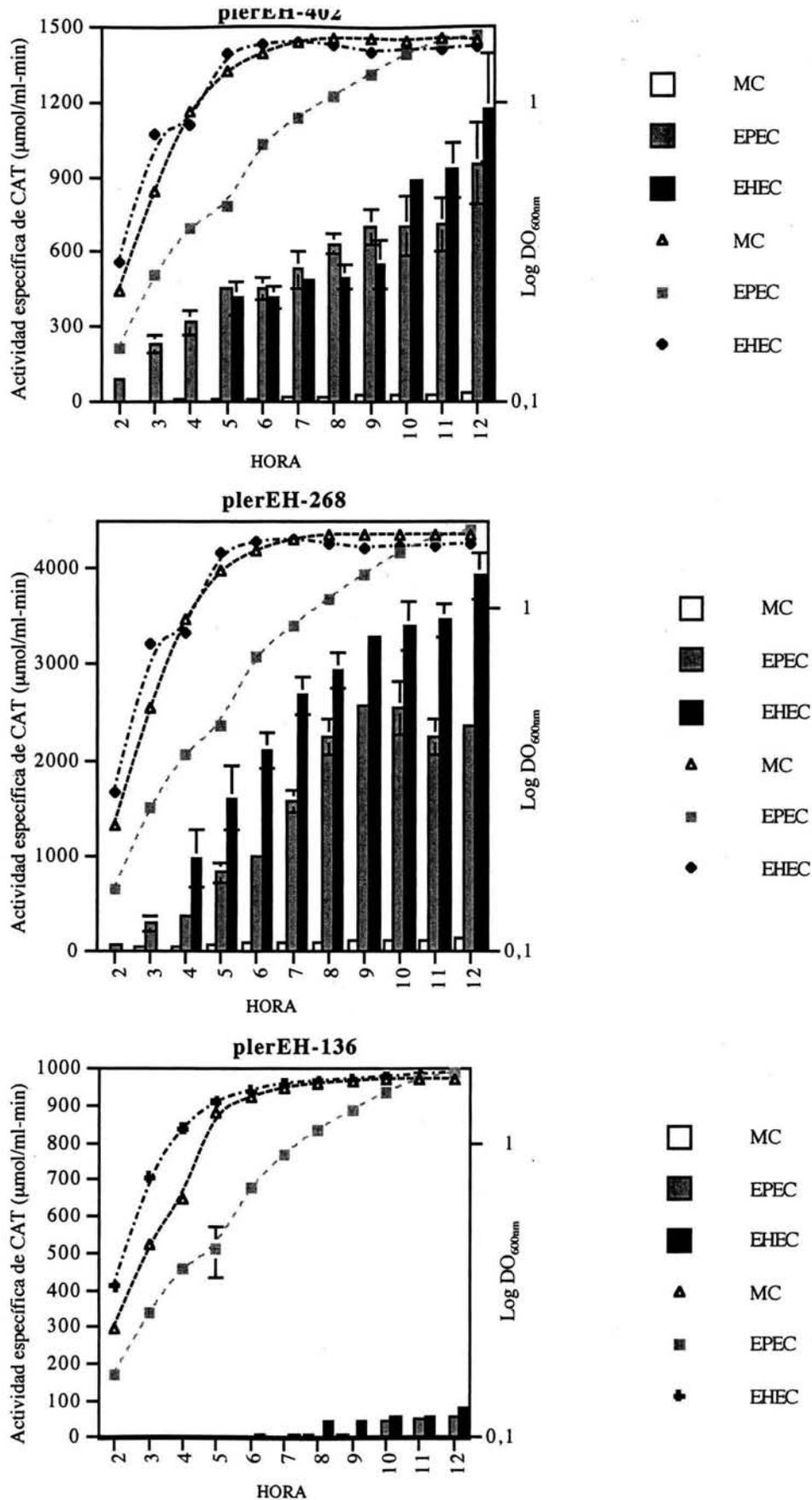


Figura 7. Actividad CAT con las fusiones *ler-cat* en DMEM a 37°C en agitación. Las cepas *E. coli* K-12 MC4100, EPEC E2348/69 y EHEC EDL-933 fueron transformadas con las fusiones plerEH-402 (A), plerEH-268 (B) y plerEH-136 (C), y su expresión evaluada a partir de muestras tomadas a intervalos de 1 hora, durante 12 horas. En el eje izquierdo se muestra la actividad específica de CAT (barras), y en el eje derecho, el logaritmo de la densidad óptica (líneas). Los datos en la gráfica corresponden al promedio de al menos tres experimentos independientes.

La fusión plerEH-136, que sólo contiene el presunto promotor proximal, presentó niveles muy bajos de actividad (Fig. 7C). Esto sugiere que el promotor proximal no existe, o bien, que podría requerir de IHF para su expresión, ya que su sitio de pegado no está presente en esta construcción, o de algún otro elemento de control positivo comprendido entre las posiciones -268 y -136.

Expresión de las fusiones transcripcionales *ler-cat* en otras condiciones de crecimiento.

La expresión de genes de virulencia en diferentes bacterias se ve afectada por las condiciones ambientales, como por ejemplo temperatura y pH, y nutricionales, como el medio de crecimiento o la presencia o ausencia de un nutriente o metabolito en particular, como por ejemplo el amonio^{23, 50}. Li y colaboradores en el 2000⁴⁵ reportaron que el medio de cultivo mínimo M9 induce de manera óptima la secreción de las proteínas EspA, EspB y Tir, en condiciones de crecimiento estático a 37°C y 5 % de CO₂ en la fase exponencial temprana. Con este antecedente, decidimos evaluar el efecto de dichas condiciones de crecimiento en la expresión de las fusiones *ler-cat*. El experimento se llevó a cabo como se describe en la figura 7, suplementando el medio con NaHCO₃ 44 mM, MgSO₄ 8 mM, glucosa 0.4 % y casaminoácidos 0.1 %, para un rápido crecimiento bacteriano, tal como sugieren los autores.

De manera interesante, la fusión plerEH-402 (Fig. 8A) alcanzó un pico máximo de actividad de 2000 unidades en EPEC, equivalente a más de dos veces lo observado en DMEM y fue más activa que en EHEC. La fusión plerEH-268 (Fig. 8B) no llegó a los niveles de actividad observados en DMEM en EHEC y en EPEC alcanzó un pico de 5000 unidades en la fase exponencial, más de dos veces la actividad observada en DMEM. La fusión plerEH-136 (Fig. 8C) fue ligeramente más activa en M9 que en DMEM en todos los fondos genéticos probados. Cabe mencionar que el MgSO₄ precipitó en las primeras horas del crecimiento, dificultando el procesamiento de las muestras y la determinación de la actividad CAT. Esto es, que durante las primeras horas del crecimiento, la concentración del MgSO₄ es mayor respecto a la población bacteriana y se acumula en el medio, generando dificultad para obtener únicamente células.

La presencia de sales de amonio en el medio de cultivo reprime la expresión de *ler* y otros genes de virulencia en EPEC^{7, 39, 55, 62}. Sin embargo, en EHEC se esperaría que esto no sucediera, porque su nicho de colonización (intestino grueso), al contrario del duodeno y yeyuno donde EPEC coloniza preferentemente, cuenta normalmente con niveles altos de este compuesto^{5, 18}.

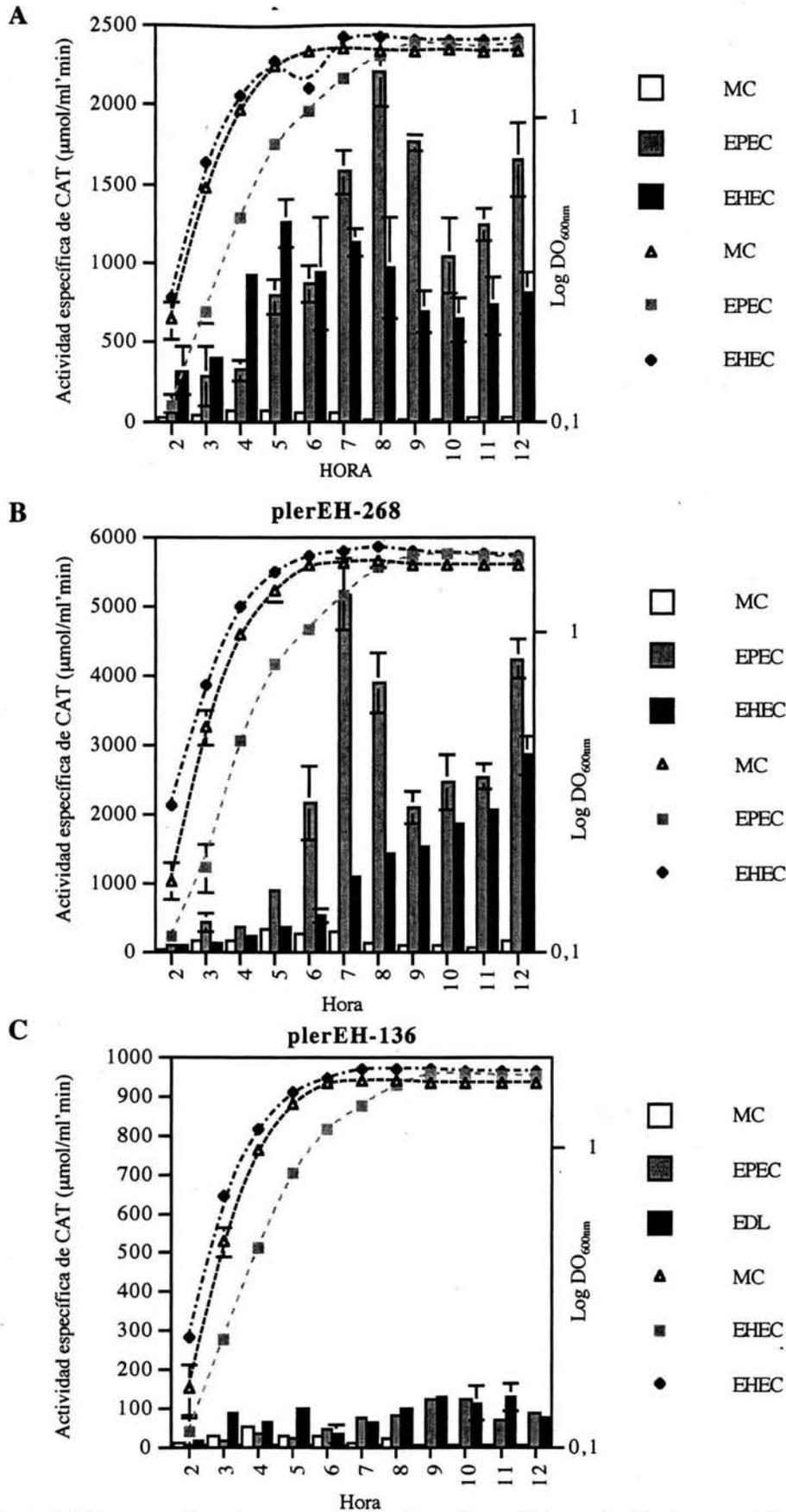


Figura 8. Actividad CAT de las fusiones *ler-cat* en medio mínimo M9 a 37°C en agitación. Las cepas *E. coli* K-12 MC4100, EPEC E2348/69 y EHEC EDL-933 fueron transformadas con las fusiones transcripcionales pleEH-402 (A), pleEH-268 (B), pleEH-136 (C), y su expresión evaluada a partir de muestras tomadas a intervalos de 1 hora, durante 12 horas. En el eje izquierdo se muestra la actividad específica de CAT (barras) y en el derecho, el logaritmo de la densidad óptica (líneas). Los datos en la gráfica corresponden al promedio de al menos tres experimentos

Con el fin de evaluar esta posibilidad, se transformaron cepas de EHEC silvestre con la fusión *plerEH-402* y, como control, la fusión de EHEC *pSEPZ-11*, que contiene el promotor del operón *LEE2*, incluyendo toda la región intergénica *LEE2-LEE3*, así como, la secuencia del gen estructural *orf12*, y la fusión de EPEC *pSEPZ-17*, que incluye únicamente el promotor del operón *LEE2*, sin el dominio de regulación negativa *SRS1*, por lo que su expresión es constitutiva e independiente de *Ler*⁷. Las cepas se cultivaron en medio DMEM adicionado de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mM y se crecieron en agitación a 37°C.

La expresión de ninguna de las fusiones probadas fue reprimida por amonio (Fig. 9). Esto es interesante pues en EPEC se ha observado que el amonio reprime la expresión de *ler*^{7,55} (Barba *et al.*, datos no publicados), así como de los operones *LEE2*, *LEE3* y *LEE5*^{7,64}. Como se esperaba, la fusión control *pSEPZ-17* no se regula por amonio, como se describió previamente⁷ (Fig. 9).

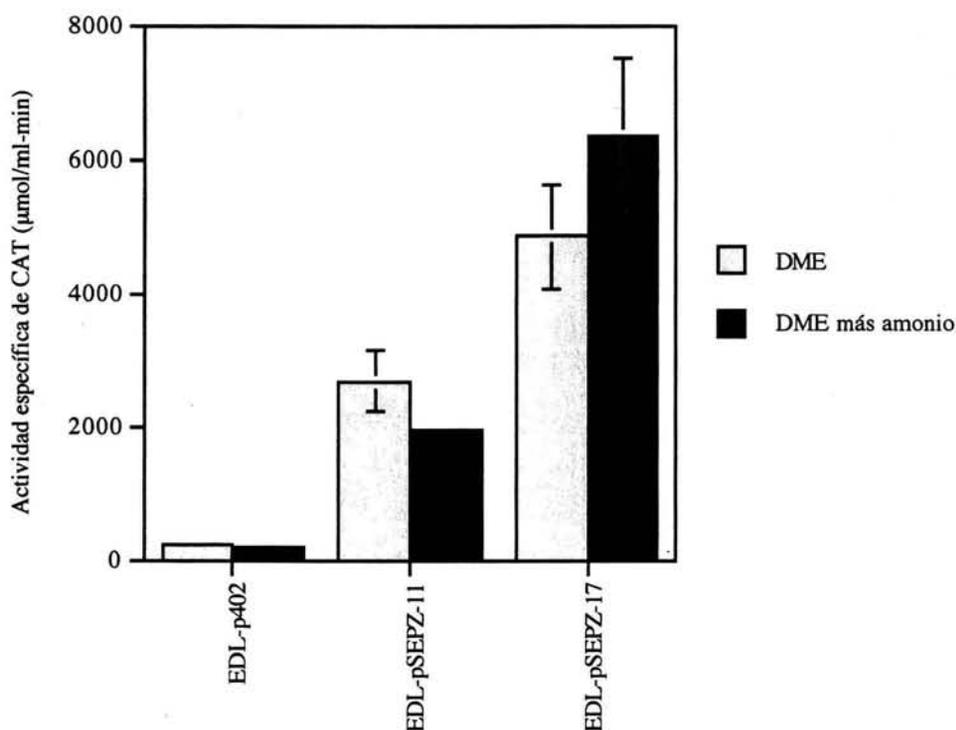


Figura 9. Efecto del amonio sobre la expresión de *ler*. La cepa silvestre de EHEC EDL-933 (EDL) se transformó con la fusión *plerEH-402* (*p402*) para evaluar el efecto de las sales de amonio en el medio de cultivo. Se realizó el ensayo de actividad CAT en DMEM a 37°C con agitación, muestreando a una $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1.0$. Como controles se emplearon una fusión *LEE2-cat* (*pSEPZ-11*), dependiente de *ler* de EHEC y una fusión *LEE2-cat* (*pSEPZ-17*) independiente de *ler* de EPEC.

Papel de GrlA y Ler en la expresión de *ler*.

Durante la realización de este trabajo se describieron dos nuevos reguladores globales de los genes de virulencia en el patógeno A/E relacionado *C. rodentium*, *orf10* y *orf11*, ahora *grlR* y *grlA*, respectivamente¹². GrlR se propone que actúa como un modulador negativo de la expresión de los genes del LEE, ya que la sobreexpresión del gen reduce dramáticamente la expresión de EspA, EspB y Tir, aunque el mecanismo por el cual lo hace aún no ha sido definido. GrlA, por el contrario, se propone que tiene un papel activador, probablemente actuando como regulador de *ler* estableciendo un nivel superior en la cascada de regulación de los genes del LEE. Interesantemente, para el caso de *C. rodentium* el efecto de estos reguladores se observó en condiciones de crecimiento estático con 5 % de CO₂ a 37°C¹². (Barba *et al.*, datos no publicados).

En el laboratorio se generó la mutante Δ *grlA* en EHEC con el fin de evaluar el papel de este activador en la expresión de los genes del LEE. Para determinar el papel de GrlA en la activación de *ler*, así como el de Ler en su autorregulación, se transformaron las cepas EHEC Δ *grlA* y Δ *ler* con las fusiones *ler-cat* y se realizaron ensayos de actividad de CAT tomando muestras a las 4, 6, 8 y 10 horas del crecimiento, incubando en una estufa a 37°C sin agitación y con 5 % de CO₂.

La cinética de expresión de las fusiones plerEH-402 y plerEH-268 de *ler* en la cepa silvestre fue muy similar a la observada anteriormente al cultivar las cepas en agitación (Fig. 7), pero con niveles de actividad hasta 4 veces menores (Fig. 10), mientras que la fusión plerEH-136 fue casi inactiva (dato no mostrado).

En la mutante en *ler* la fusión plerEH-268 fue aparentemente un poco más activa a partir de la hora 6 (datos no mostrados) y hasta la hora 10 (Fig. 10), mientras que en la mutante en *grlA* disminuyó su expresión aproximadamente en un 66 %. En el caso de la fusión plerEH-402 la actividad fue similar en la cepa EHEC silvestre y mutante Δ *ler*, mientras que en la Δ *grlA* disminuye sólo ligeramente (Fig. 10).

No obstante que la ausencia de GrlA afectó la expresión de ambas fusiones, se esperaba una caída más significativa de la expresión de *ler*, dados otros resultados obtenidos en el laboratorio y lo reportado por Deng y colaboradores¹². Es posible que las condiciones evaluadas no hayan sido las óptimas para observar un efecto de GrlA en la expresión del gen *ler*, por ejemplo agitación versus estático, o que GrlA en EHEC se requiera para la expresión óptima de *ler* pero no sea esencial, o bien, que haya diferencias en la regulación, dictadas por la existencia del segundo promotor o promotor proximal de *ler* de EHEC.

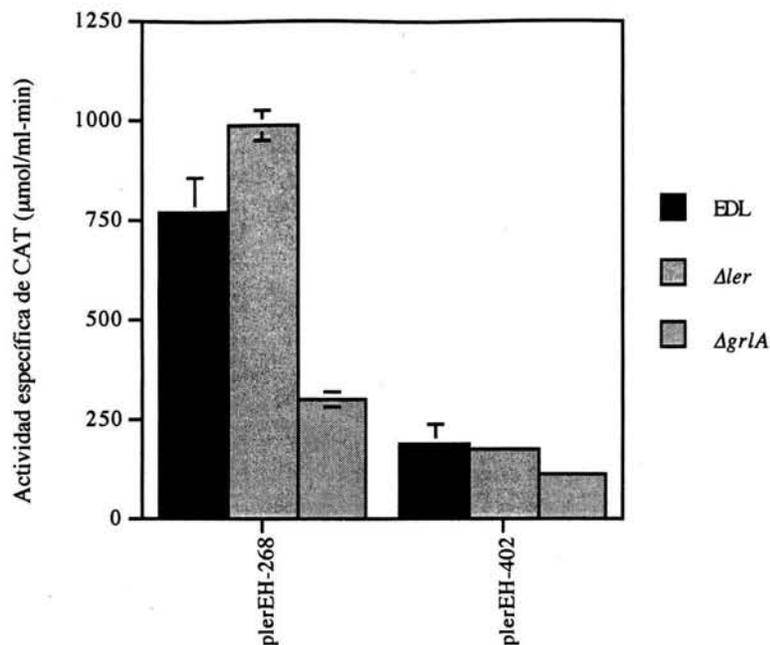


Figura 10. Papel de GrIA y Ler en la expresión de *ler* en condiciones estáticas. Las cepas EDL-933, EDL Δler y EDL $\Delta grlA$ fueron transformadas con las fusiones plerEH-136 (no se muestra), plerEH-268 y plerEH-402 y la actividad evaluada a las 4, 6, 8, y 10 horas del crecimiento en 5 % de CO₂ en DMEM a 37°C, sin agitación. Los datos en la gráfica corresponden al promedio de al menos tres experimentos independientes, de muestras tomadas a la hora 10.

Papel de IHF en la expresión de *ler*.

IHF es una proteína de unión a DNA involucrada en diversos procesos celulares tales como recombinación sitio-específica, replicación de DNA, transposición, empacamiento y regulación de la transcripción genética^{26, 48, 60}. En el caso de *ler* de EPEC, se ha observado que IHF es esencial para su expresión, interactuando con una secuencia localizada antes del promotor del gen^{24, 27, 75}. Dada la inactividad de la fusión plerEH-136, la cual sólo contiene al promotor proximal, se buscó determinar si esto se debía al efecto de la eliminación del sitio de pegado para IHF, para lo cual se aprovechó que se contaba con una mutante en la subunidad *ihfA* de EPEC generada en el laboratorio.

Las cepas EPEC E2348/69 y E2348/69 $\Delta ihfA::km$ fueron transformadas con todas las fusiones *ler-cat* de EHEC y evaluadas en condiciones de crecimiento estático a 37°C y 5 % de CO₂ (en el contexto del experimento anterior) muestreando a las 4, 6, 8 y 10 horas del crecimiento.

La fusión plerEH-136 fue inactiva en ambos fondos genéticos, mientras que la fusión plerEH-268 fue la más activa, con niveles de 1500 unidades, mientras la plerEH-402 tuvo niveles de 250 unidades (Fig. 11). Ninguna de las fusiones se expresó en la cepa

mutante, sugiriendo que el regulador genético IHF es importante para la expresión de *ler* de EHEC, como se ha descrito para EPEC^{24, 27, 75} (Barba *et al.*, datos no publicados).

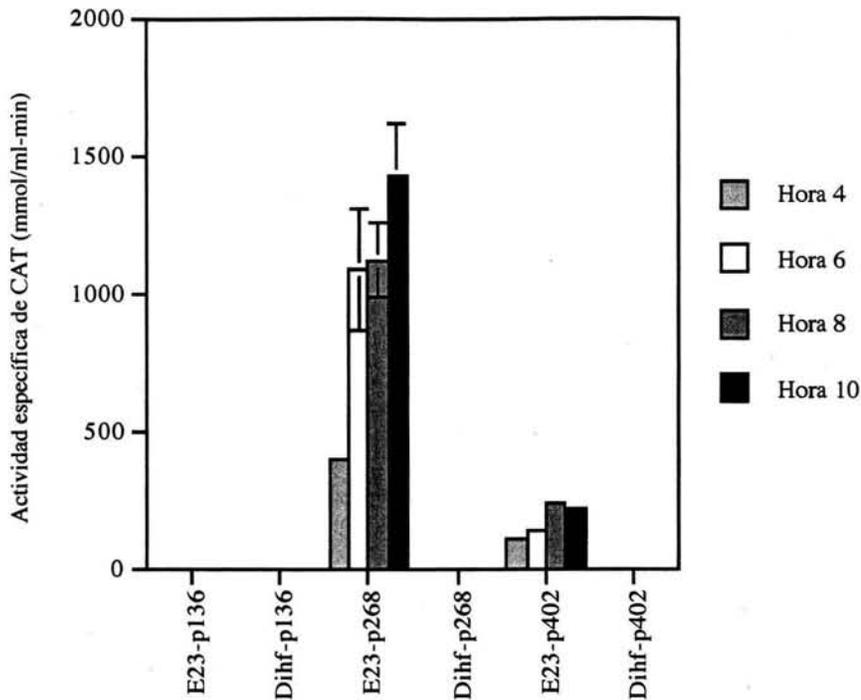


Figura 11. IHF se requiere para la expresión de *ler*. Las cepas EPEC E2348/69 silvestre y EPEC E2348/69 $\Delta ihfA$ fueron transformadas con las fusiones plerEH-136, plerEH-268 y plerEH-402 y la actividad de CAT evaluada en DMEM en condiciones estáticas a 37°C con 5 % de CO₂, durante 10 horas. Los datos en la gráfica corresponden al promedio de al menos tres experimentos independientes.

Caracterización de los promotores de *ler*.

Sperandio y colaboradores en el 2002⁶⁵ reportaron un segundo promotor de *ler* en EHEC, denominado proximal, 32 nucleótidos corriente abajo del sitio de inicio de la traducción, de acuerdo al promotor identificado para el gen *ler* de EPEC²² y denominado distal en EHEC (Fig. 5). Considerando este dato, y que la fusión plerEH-136 fue inactiva en todos los fondos genéticos probados, quedaba la posibilidad de que esto se debiera, además de la ausencia del sitio de pegado para IHF, a la inexistencia o inactividad del promotor proximal. Para determinarlo, se realizó un experimento de “primer extension”, para lo cual se extrajo RNA de la cepa silvestre EHEC EDL-933 transformada con las fusiones *ler-cat* activas, en DMEM a 37°C con agitación, a una DO_{600nm} = 1.0, de acuerdo a protocolos estándares^{3, 63}.

Usando un total de 30 μg por reacción de RNA total de las cepas transformadas con las fusiones transcripcionales plerEH-268 y plerEH-402, pudimos obtener un producto de extensión a partir del transcrito de *ler* que inicia en el promotor distal (Fig. 12). La señal fue más intensa cuando se utilizó el RNA obtenido de la cepa transformada con la fusión plerEH-268, lo que concuerda con el resultado de la figura 7B. Sin embargo, no se detectó la presencia de un transcrito que iniciara a partir del promotor proximal, apoyando la idea de que dicho promotor no existe. Para asegurarnos de que la concentración del RNA empleada para las dos reacciones fue la misma, se corrió en paralelo una reacción utilizando el oligonucleótido del gen *ompA*, de expresión constitutiva, y se observaron señales de intensidad similar. Las bandas minoritarias que se observan en el gel, probablemente sean productos de degradación o procesamiento del producto de la reacción, pues no corresponden al sitio de inicio de transcripción del promotor proximal descrito, aunque no se puede descartar la posibilidad de que sean promotores alternativos.

Usando otro enfoque, dado que por “primer extension” no se pudo observar transcrito de *ler* a partir del supuesto promotor proximal, se construyeron mutantes en dicho promotor a partir de las mismas fusiones, bajo el planteamiento de que si el promotor proximal existe y es funcional, una mutación dirigida hacia esa región tendría un efecto negativo sobre la expresión del gen, si bien no la abatiría por completo. En caso contrario, la mutación no tendría efecto sobre la expresión del gen.

La estrategia utilizada fue la mutagénesis sitio-dirigida, usando como DNA molde el de las fusiones plerEH-268 y plerEH-402, con los oligonucleótidos PrPF-SacII/PrPR-SacII (que introducen el sitio de restricción para la endonucleasa *SacII*), y PP-F-BglII/PP-R-BglII (que introducen el sitio para *BglII*). Los sitios de restricción sustituyen específicamente la supuesta caja -35 del promotor proximal para inactivarlo. Se llevó a cabo una PCR inversa cuyo producto fue posteriormente digerido con *DpnI* para eliminar DNA parental y conservar el DNA recién sintetizado y conteniendo la mutación, con el cual se transforma la cepa de *E. coli* DH5 α para recuperar clonas candidatas.

Se obtuvieron mutantes del promotor proximal en ambas fusiones, las cuales fueron verificadas, primero por patrón de digestión con las correspondientes endonucleasas y, posteriormente, confirmadas por secuenciación con el oligo SEQ1CAT (Tabla 3). Una vez obtenidos los plásmidos mutantes, se transformaron en las cepas EPEC y EHEC silvestres para evaluar la actividad de CAT. Se realizaron ensayos de actividad en DMEM con agitación a 37° C y las muestras se tomaron a $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1.0$.

Esto apunta nuevamente a la inexistencia del promotor proximal, lo cual coincide con la ausencia de señal de transcrito de *ler* en el experimento de “primer extension”. Así mismo, para la fusión plerEH-402 no se observaron cambios.

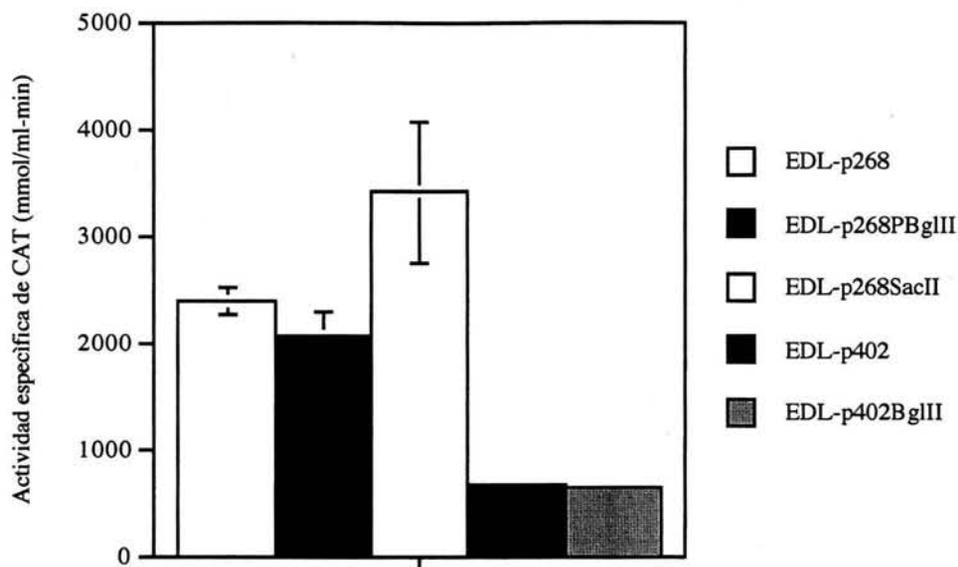


Figura 13. Efecto de la mutación en el promotor proximal de *ler*. Para determinar si la transcripción de *ler* en EHEC proviene del promotor proximal, se mutagenizó la caja -35 introduciendo sitios de restricción para las endonucleasas *Bgl*III y *Sac*II, a partir de los plásmidos plerEH-268 y plerEH-402. Los plásmidos mutantes se transformaron en la cepa Silvestre EHEC EDL-933 (EDL). Los datos en la gráfica corresponden al promedio de al menos tres experimentos independientes de muestras tomadas a una $DO_{600nm} = 1.4$.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

EHEC posee factores de virulencia no codificados por la isla de patogenicidad LEE, tales como la toxina Stx, los cuales están involucrados de manera importante en la generación del cuadro clínico asociado a las infecciones por esta bacteria. Sin embargo, mutantes en diversos genes codificados en el LEE pierden muchos de los fenotipos asociados a la formación de las lesiones A/E y atenúan la virulencia^{12, 27}. En la cascada reguladora de los genes de virulencia de los patógenos A/E, Ler es un elemento clave debido a su papel como regulador transcripcional positivo de los operones codificados dentro del LEE^{7, 12, 22, 51, 64, 66}. Ler es codificada por *ler*, el primer gen del operón *LEE1*^{22, 51}.

Los mecanismos de regulación de los genes del LEE se han estudiado extensivamente en EPEC, debido a que fue el primer patotipo de *E. coli* donde se describió dicha isla de patogenicidad³⁶. El alto grado de conservación del LEE en EHEC, EPEC y *C. rodentium*^{22, 56, 57}, hace suponer que los genes codificados en el LEE se regulan de manera similar. Sin embargo, el reporte de un segundo promotor de *ler* en EHEC abre la pregunta de si este promotor genera diferencias en la regulación⁶⁵. Más aún, se ha reportado que la clonación del LEE completo de EHEC en K-12, no es suficiente para causar las lesiones A/E, mientras que al clonar el LEE de EPEC, éstas sí se producen²¹. Por esto, se decidió investigar específicamente en esta bacteria la regulación transcripcional del gen *ler*.

Con base en lo anterior, se construyeron una serie de fusiones transcripcionales conteniendo diferentes porciones de la región reguladora del gen *ler*, que se probaron en diferentes fondos genéticos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento. Ninguna de las fusiones transcripcionales estudiadas fue activa en un fondo genético *E. coli* K-12 (Fig. 7 y 8), lo cual sugiere que se requiere de un factor ausente en cepas de *E. coli* no patógenas para la activación de *ler*.

En cuanto al papel de GrlA en la expresión de *ler*, en EHEC parece ser un factor que optimiza su expresión, ya que en la mutante EHEC Δ *grlA* la actividad de la fusión plerEH-402 sólo se redujo moderadamente, aunque la de la fusión plerEH-268 disminuyó aproximadamente el 66 % en comparación con el fondo silvestre (Fig. 10). Lo anterior contrasta con lo que se ha reportado para *C. rodentium*, donde la expresión de *ler* en la ausencia de GrlA se reduce en más del 90 %¹². Es importante señalar que aún queda por determinar el efecto que tiene la reducción en la transcripción de *ler* en la mutante en *grlA* de EHEC sobre la expresión del resto de los genes del LEE. También confirmamos que *ler* no se autorregula, pues en una mutante EHEC Δ *ler*, las fusiones se comportaron igual que

en la cepa silvestre, aunque se observó un ligero incremento en la expresión en la fusión plerEH-268 en esta cepa.

Por otro lado, en este trabajo demostramos indirectamente la importancia del regulador global IHF en la expresión de *ler* de EHEC, de manera similar a lo que se ha reportado para EPEC. Una mutante en *ihfA* de EPEC transformada con las fusiones *ler-cat* de EHEC fue evaluada para su capacidad de activar a *ler*. Esto pudo llevarse a cabo debido a que las fusiones fueron activas en EPEC. De este análisis se obtuvo que IHF también regula de manera positiva a *ler* de EHEC, pues en el fondo mutante no hubo expresión de ninguna de las fusiones (Fig. 11). Esto, sin embargo, será conveniente validarlo en una mutante *ihfA* de EHEC.

No se planteó como objetivo en este trabajo determinar la o las secuencias reguladoras involucradas en la regulación negativa de *ler* en EHEC, aunque se propone que se encuentran en la región que va al menos de la posición -402 a -268, pues al eliminarla en la fusión plerEH-268, la expresión de *ler* aumentó 4 veces respecto a la fusión plerEH-402, que sí la contiene. Estos datos no sugieren de qué factor o factores se trata, pero una posibilidad es que sea H-NS, que regula de manera negativa a *ler* de EPEC (Barba *et al.*, datos no publicados).

La topología del DNA en bacterias juega un papel importante en la regulación de factores de virulencia en diversas bacterias²³. H-NS es una proteína de unión a DNA que controla la expresión génica por silenciamiento transcripcional, ya sea por cambios en el superenrollamiento, curvamiento del DNA o la formación de complejos nucleopresores al unirse a la región promotora de un gen en particular^{2, 17, 48}. En el caso de EPEC, se ha demostrado que se une a la región reguladora del *LEE1*, probablemente en forma cooperativa formando complejos DNA-proteína, los cuales reprimen la expresión⁷² (Barba *et al.*, datos no publicados). Tomando en cuenta que la región reguladora de *ler* en EHEC y EPEC es casi idéntica, es probable que H-NS esté involucrado también en la represión de este gen en EHEC y, en consecuencia, del resto de los genes del LEE, aunque esto tiene que ser estudiado específicamente.

Sorprendentemente la expresión de *ler* en EHEC alcanzó su máximo en la fase estacionaria (Fig. 7), a diferencia de lo que se ha reportado con EPEC, donde la activación de *ler* ocurre principalmente durante la fase exponencial. La mayor actividad de *ler* hacia la fase estacionaria tardía del crecimiento puede relacionarse con el hecho de que EHEC, después de ser ingerida, resistiendo el ambiente altamente ácido del intestino, es capaz de establecer la colonización del intestino grueso por un mecanismo de resistencia a ácido que

involucre un factor σ de fase estacionaria codificado por el gen *rpoS*. Dicho factor σ puede estar implicado en la activación de *ler* hacia la fase exponencial tardía. A este respecto, por ejemplo, se ha reportado que *Shigella flexneri* se vuelve resistente a pH ácido hacia la fase de crecimiento exponencial tardía; la entrada a dicha fase es acompañada de grandes cambios fisiológicos mediados por un sistema regulador global en el cual el factor σ juega un papel clave³⁰.

Puesto que la expresión de genes involucrados en virulencia es regulada por señales ambientales, quisimos evaluar el efecto de diferentes medios y condiciones de crecimiento en la expresión de las fusiones *ler-cat*. Las cepas silvestres de EHEC, EPEC y *E. coli* K-12 transformadas con las fusiones *ler-cat* fueron crecidas en medio DMEM y en medio M9, como se ha reportado previamente^{18, 39, 41, 45}.

Al comparar la expresión de las fusiones en los medios de cultivo DMEM y M9, no se observaron diferencias significativas, aunque de manera interesante, las fusiones fueron más activas en la cepa EPEC en medio M9. En EHEC, los niveles de actividad de las fusiones *ler-cat* en M9 no alcanzaron los previamente observados en DMEM (Fig. 7 y 8).

En las primeras horas del ensayo el $MgSO_4$ precipitó, dificultando la determinación de los niveles de actividad CAT a partir de los extractos, que aún después de su procesamiento presentaban remanentes de sales. Esto probablemente contribuyó a que en este medio los niveles de actividad fluctuaran a lo largo de la curva de crecimiento, si bien las fusiones alcanzaron niveles similares a los observados en DMEM.

La presencia de sales de amonio en el medio de cultivo, no tuvo efecto en la expresión de las fusiones *ler-cat* y *LEE2-cat* de EHEC (Fig. 9A), lo cual es coherente con la literatura. En su paso por el tracto intestinal luego de ser ingerida, EHEC llega al intestino grueso, donde otras poblaciones bacterianas producen amonio como parte del metabolismo, generando altos niveles de este compuesto, de manera que no es empleado por la bacteria como señal ambiental de regulación para los genes virulencia del LEE; esto concuerda con lo que se ha reportado para el operón *LEE4* en EHEC, el cual no es reprimido por amonio⁵. En contraste, EPEC evolucionó un sistema de regulación por amonio, debido a que después de ser ingerida llega al intestino delgado, el cual tiene concentraciones bajas de dicho compuesto, por lo tanto, niveles altos de amonio reprimen la expresión de sus genes de virulencia, indicando que se encuentra en un ambiente desfavorable para llevar a cabo la colonización^{39, 41, 55}. En conjunto, estos datos soportan el hecho de que los genes del LEE están bajo un estricto control que involucra no sólo reguladores genéticos, sino también señales ambientales.

En relación a los dos promotores de *ler* reportados en EHEC, en el experimento de “primer extension” se observó señal de transcrito a partir del promotor distal con RNA de las fusiones plerEH-268 y plerEH-402, con mayor señal para la plerEH-268, lo que concuerda con el resultado de la figura 7. Sin embargo, no se observó señal de transcrito a partir del promotor proximal, sugiriendo que éste no es funcional, o que la transcripción ocurre principalmente desde el promotor distal (Fig. 12).

Las condiciones bajo las cuales se llevó a cabo la reacción de “primer extension” fueron similares a las empleadas en Sperandio *et al.*⁶⁵, aunque las cepas fueron diferentes. Mientras ellos emplearon la cepa EHEC 86-24, nosotros utilizamos la EHEC EDL933. Sin embargo, sugerimos que el resultado reportado por ellos es un artificio generado por la unión del oligonucleótido de manera inespecífica a otro transcrito presente en el RNA total. Además, al mutar la caja -35 del promotor proximal y transformar los plásmidos mutantes resultantes en EHEC para evaluar la activación de *ler*, se observaron comportamientos similares a los de los plásmidos silvestres, apoyando la idea de que el promotor proximal no existe (Fig. 13).

En este trabajo obtuvimos datos interesantes acerca de la regulación de *ler* de EHEC. Recalamos el hecho de que aunque se ha descrito un segundo promotor de *ler* en esta bacteria, no pudimos corroborarlo. Así también, aunque esperábamos que el mecanismo de regulación de *ler* sería similar entre EHEC, EPEC y *C. rodentium*, los datos obtenidos indican que no es así, pues las mismas señales o reguladores genéticos pueden no tener el mismo papel en la regulación. Tal fue el caso de la regulación por amonio, que de acuerdo a la literatura reprime la expresión de los genes del LEE, pero esto no se observó en EHEC. Así mismo, se analizó el papel que juegan IHF y GrlA en la regulación de *ler*; sin embargo, el papel de estos reguladores tiene que ser estudiado en mayor detalle, pues en el caso de IHF la evidencia generada fue indirecta y para GrlA se demostró un papel en la regulación más moderado que el observado en *C. rodentium*.

PERSPECTIVAS

- ❖ Se sugiere comparar la expresión de las fusiones *ler-cat* de EPEC en EHEC, para dilucidar si el mecanismo de regulación de *ler* es similar independientemente del fondo genético, o bien, si éste determina las diferencias observadas en este trabajo.
- ❖ Aunque el “primer extension” y la mutagénesis sitio-dirigida del posible promotor proximal arrojaron datos claros acerca de su inexistencia, esto tiene que ser corroborado. Esto podría hacerse repitiendo los experimentos de “primer extension” con las fusiones mutantes y la cepa usada por Sperandio *et al.*⁶⁵. Además, habrá que generar mutantes en el promotor distal para confirmar que la transcripción de *ler* proviene principalmente de este promotor.
- ❖ Si bien se ha sugerido que H-NS puede ser el regulador negativo de *ler* en EHEC, esto tiene que ser evaluado a profundidad. Para esto se propone generar una mutante en *hns* en EHEC y evaluar la actividad de las fusiones *ler-cat* en dicho fondo genético, así como evaluar la expresión de las fusiones en una cepa de *E. coli* K12 mutante en *hns*, por ejemplo la cepa MC4100 Δhns , para demostrar que H-NS es efectivamente dicho regulador.
- ❖ Evaluar en detalle el papel que juega el amonio en la regulación de otros operones del LEE, así como definir porqué la regulación de *ler* en EPEC y EHEC es diferente en presencia de amonio.
- ❖ Evaluar el papel de GrlR y GrlA en la expresión de otras fusiones del LEE y en general en la regulación de factores de virulencia de EHEC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Anand, SK., and Griffiths, M. 2003. **Quorum-sensing and expression of virulence in *Escherichia coli* O157:H7**. Intl. J. Food Microbiol. **85**: 1-9.
2. Atlung, T., and Ingmer, H. 1997. **H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression**. Mol. Microbiol. **24**: 7-17.
3. Ausubel, F., *et al.* 2001. **Current Protocols in Molecular Biology**. John Wiley and Sons, **12**, pp. 1.1.1-1.1.2, 1.6.1-1.6.4, 1.8.4-1.8.8, 2.5.4-2.5.10, 4.4.5-4.4.6, 4.8.1-4.8.5.
4. Bassler, B. 2002. **Small Talk: Cell-to-Cell Communication in Bacteria**. Cell, **109**: 421-424.
5. Beltrametti, F., A. Kresse, and C. Guzmán. 1999. **Transcriptional Regulation of the *esp* Genes of Enterohemorrhagic *Escherichia coli***. J. Bacteriol. **181**: 3409-3418.
6. Brunder, W., H. Schmidt, and H. Karch. 1997. **EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V**. Mol. Microbiol. **24**: 767-778.
7. Bustamante, V., F. Santana, E. Calva, and J.L. Puente. 2001. **Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression**. Mol. Microbiol. **39**: 664-678.
8. Büttner D., and Bonas, U. **Port of entry –the type III secretion translocon**. Trends Microbiol. **10**: 186-192.
9. Calderwood, S., F. Auclair, A. Donohue-Rulfe, G. Keusch, and J. Mekalanos. 1987. **Nucleotide sequence of the Shiga-like toxin genes of *Escherichia coli***. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **84**: 4364-4368.
10. Campellone, K., and Leong, J. 2003. **Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7**. Curr. Opin. Microbiol. **6**: 82-90.
11. Crane, J., B. McNamara, and M. Donnenberg. 2001. **Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic *Escherichia coli***. Cell. Microbiol. **3**: 197-211.
12. Deng, W., J.L. Puente, S. Gruenheid, Y. Li, B. Vallance, A. Vázquez, J. Barba, J. Ibarra, P. O'Donnell, K. Ashman, S. Lee, D. Goode, T. Pawson, and B.B. Finlay. 2004. **Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island**. Proc. Natl Acad. Sci. USA, **101**: 3597-3602.
13. Deng, W., B. Vallance, Y. Li, J.L. Puente, and B.B. Finlay. 2003. ***Citrobacter rodentium* translocated intimin receptor (Tir) is an essential virulence factor**

- needed for actin condensation, intestinal colonization and colonic hyperplasia in mice. *Mol Microbiol.* **48**: 95-115.
14. De Kievit, T.R., and Iglewski, B. 2000. **Quorum-sensing in Pathogenic Relationships.** *Infect. Immun.* **68**: 4839-4849.
 15. DeVinney, R., M. Stein, D. Reinscheid, A. Abe, S. Ruschkowski, and B. Finlay. 1999. **Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Produces Tir, Which Is Translocated to the Host Cell Membrane but Is Not Tyrosine Phosphorylated.** *Infect. Immun.* **67**: 2389-2398.
 16. Donnenberg, M., and Whittam, T. 2001. **Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*.** *J. Clin. Invest.* **107**: 539-548.
 17. Dorman, C. 2004. **H-NS: A Universal Regulator for a Dynamic Genome.** *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 391-400.
 18. Ebel, F., C. Deibel, A. Kresse, C. Guzmán, and T. Chakraborty. 1996. **Temperature- and Medium-Dependent Secretion of Proteins by Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*.** *Infect. Immun.* **64**: 4472-4479.
 19. Edwards, R., and Puente, J.L. 1998. **Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis.** *Trends Microbiol.* **6**: 282-287.
 20. Elliot, S.J., Krejany, E., Mellies, J., Robins-Browne, R., Sasakawa, C., and Kaper, J.B. 2001. **EspG: A Novel Type III System-Secreted Protein from Enteropathogenic *Escherichia coli* with Similarities to VirA of *Shigella flexneri*.** *Infect. Immun.* **69**: 4027-4033.
 21. Elliott, S.J., J. Yu, and J.B. Kaper. 1999. **The Cloned Locus of Enterocyte Effacement from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Is Unable To Confer the Attaching and Effacing Phenotype Upon *E. coli* K-12.** *Infect. Immun.* **67**: 4260-4263.
 22. Elliott, S. J., V. Sperandio, J.A. Girón, S. Shin, J.L. Mellies, L. Wainwright, S.W. Hutcheson, T.K. McDaniel, and J.B. Kaper. 2000. **The Locus of Enterocyte Effacement (LEE)-Encoded Regulator Controls Expression of Both LEE- and Non-LEE-Encoded Virulence Factors in Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*.** *Infect. Immun.* **68**: 6115-6126.
 23. Finlay, B.B., and Falkow, S. 1997. **Common Themes in Microbial Pathogenicity Revisited.** *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 155-158.
 24. Frankel, G., A. Phillips, I. Rosenshine, G. Dougan, J.B. Kaper, and S. Knutton. 1998. **Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *-Escherichia coli*: more subversive elements.** *Mol. Microbiol.* **30**: 911-921.

25. Frankel, G., A. Phillips, L. Trabulsi, S. Knutton, G. Dougan, and S. Matthews. 2001. **Intimin and the host cell –is it bound to end in Tir(s)?** Trends Microbiol. **9**: 214-218.
26. Freundlich, M., N. Ramani, E. Mathew, A. Sirko, and P. Tsui, P. 2000. **The role of integration host factor in gene expression in *Escherichia coli*.** Mol. Microbiol. **6**: 2557-2563.
27. Friedberg, D., T. Umanski, Y. Fang, and I. Rosenshine. 1999. **Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*.** Mol. Microbiol. **34**: 941-952.
28. Goldberg, M.D., M. Johnson, J.C.D. Hinton, and P.H. Williams. 2001. **Role of the nucleoid-associated proteins Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*.** Mol. Microbiol. **41**: 549-559.
29. Goosney, D., R. DeVinney, and B.B. Finlay. 2001. **Recruitment of Cytoskeletal and Signaling Proteins to Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Pedestals.** Infect. Immun. **69**: 3315-3322.
30. Gorden, J., and Small, P. 1993. **Acid Resistance in Enteric Bacteria.** Infect. Immun. **61**: 364-367.
31. Grant, A., M. Farris, P. Alefounder, P. Williams, M. Woodward, and D. O'Connor. 2003. **Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC).** Mol. Microbiol. **48**: 507-521.
32. Haack, K., C. Robinson, K. Miller, J. Fowlkes, and J. Mellies. 2003. **Interaction of Ler at the *LEE5 (tir)* Operon of Enteropathogenic *Escherichia coli*.** Infect. Immun. **71**: 384-392.
33. Ismaili, A., D. Philpott, M. Dytoc, and O. Sherman. 1995. **Signal Transduction Responses following Adhesion of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli*.** Infect. Immun. **63**: 3316-3326.
34. Kanamaru, K., K. Kanamaru, L. Tatsuno, T. Tobe, and C. Sasakawa. 2000. **SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulators, controls the expresión of virulence factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.** Mol. Microbiol. **38**: 805-816.
35. Kaper, J.B. 1998. **Enterohemorrhagic *Escherichia coli*.** Curr. Opin. Microbiol. **1**:103-108.
36. Kaper, J.B., J. Nataro, and L. Mobley. 2004. **Pathogenic *Escherichia coli*.** Nat. Rev. Microbiol. **2**: 123-138.
37. Karch, H., J. Heesemann, R. Laufs, A.D. O'Brien, C. Tacket, and M. Levine. 1987. **A Plasmid of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 Is Required for**

- Expression of a New Fimbrial Antigen and for Adhesion to Epithelial Cells. *Infect. Immun.* **55**: 455-461.
38. Kenny, B. 2001. The enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (serotype O157:H7) Tir molecule is not functionally interchangeable for its enteropathogenic *E. coli* (serotype O127:H6) homologue. *Cell. Microbiol.* **3**: 499-510.
 39. Kenny, B., A. Abe, M. Stein, and B.B. Finlay. 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli* Protein Secretion is Induced in Response to Conditions Similar to Those in the Gastrointestinal Tract. *Infect. Immun.* **65**: 2606-2612.
 40. Kenny, B., S. Ellis, A. Leard, J. Warawa, H. Mellor, and M. Jepson. 2002. Coordinate regulation of distinct host cell signaling pathways by multifunctional Enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. *Mol. Microbiol.* **44**: 1095-1107.
 41. Kenny, B., and Finlay B.B. 1995. Protein Secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**: 7991-7995.
 42. Kenny, B., and Jepson. M. 2000. Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria. *Cell. Microbiol.* **2**: 579-590.
 43. 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.
 44. Kunkel, T.A. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 488-492.
 45. Li, Y., E. Frey, A. Mackenzie, and B.B. Finlay. 2000. Human Responses to *Escherichia coli* O157:H7 Infection: Antibodies to Secreted Virulence Factors. *Infect. Immun.* **68**: 5090-5095.
 46. Lin, J., M. Smith, K. Chapin, H.S. Baik, G. Bennett, and J. Foster. 1996. Mechanisms of Acid Resistance in Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 3094-3100.
 47. Madigan, M., Martinko, J., and Parker, J. 2003. **Brock, Biology of Microorganisms**. 10a ed. Prentice Hall.
 48. McLeod, S., and Johnson, R. 2001. Control of transcription by nucleoid proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **4**: 152-159
 49. Mead, P., and Griffin, P. 1998. *Escherichia coli* O157:H7. *The Lancet*, **352**: 1207-1211.
 50. Mekalanos, J. 1992. Environmental Signals Controlling Expression of Virulence Determinants in Bacteria. *J. Bacteriol.* **174**: 1-7.

51. Mellies, J. S. Elliott, V. Sperandio, M. Donnenberg, and J.B. Kaper. 1999. **The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler)**. *Mol. Microbiol.* **33**: 296-306.
52. Nataro, J., and Kaper, J. 1998. **Diarrheagenic *Escherichia coli***. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 142-201.
53. Neidhardt, F. 1996. ***Escherichia coli* and *Salmonella***. Cellular and Molecular Biology. 2a ed. American Society for Microbiology Press, USA, 1: 1-3.
54. Paton, J., and Paton, A. 1998. **Pathogenesis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections**. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 450-479.
55. Pérez-Pérez, Mario G. 2001. **Estudio de la expresión del gen *ler* de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)**. Tesis de Licenciatura, carrera de Biología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM).
56. Perna, N. G. Mayhew, G. Pósfai, S. Elliott, N. Donnenberg, J.B. Kaper, and F. Blattner, F. 1998. **Molecular Evolution of a Pathogenicity Island from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7**. *Infect. Immun.* **66**: 3810-3817.
57. Perna, N., G. Plunkett, V. Burland, B. Mau, J. Glasner, D. Rose, G. Mayhew, P. Evans, J. Gregor, H. Kirkpatrick, G. Pósfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. Grotbeck, W. Davis, A. Lim, E. Dimalanta, K. Potamouisis, J. Apodaca, T. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. Schwartz, R. Welch, and F. Blattner. 2001. **Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7**. *Nature*, **409**: 529-533.
58. Phillips, A., J. Girón, S. Hicks, G. Dougan, and G. Frankel. 2000. **Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* mediates remodeling of the eukaryotic cell surface**. *Microbiology*, **146**: 1333-1344.
59. Puente, J.L., and Finlay, B.B. 2001. **Pathogenic *Escherichia coli***. En: Principles of bacterial pathogenesis (Groisman, E., ed). Academic Press, pp: 388-456.
60. Rice, P. 1997. **Making DNA do a U-turn: IHF and related proteins**. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7**: 86-93.
61. Roe, A.J., D.E.E. Hoey, and D.L. Gally. 2003. **Regulation, secretion and activity of type III-secreted proteins of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157**. *Biochem. Soc. Transact.* **31**: 98-103.
62. Rosenshine, I., S. Ruschkowski, and B.B. Finlay. 1996. **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.

63. Sambrook, J., and Russell, W.D. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA, Vol. 1 y 2: 5.3-5.9, 5.14-5.17, 7.82-7-85, 8.8-8.9, 8.81-8.82, 8.108-8.109, 12.3-12.7, 12.45-12.47, 12.94-12.108, 13.19-13.25.
64. Sanchez-SanMartin, C., V. Bustamante, E. Calva, and J.L. Puente. 2001. **Transcriptional Regulation of the *orf19* Gene and the *tir-cesT-eae* Operon of Enteropathogenic *Escherichia coli***. J. Bacteriol. **183**: 2823-2833.
65. Sperandio, V., C. Li, and J.B. Kaper. 2002. **Quorum-sensing *Escherichia coli* Regulator A: a Regulator of the LysR Family Involved in the Regulation of the Locus of Enterocyte Effacement Pathogenicity Island in Enterohemorrhagic *E. coli***. Infect. Immun. **70**: 3085-3093.
66. Sperandio, V., J. Mellies, R. Delahay, G. Frankel, A. Crawford, W. Nguyen, W., and J.B. Kaper. 2000. **Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) *LEE2* and *LEE3* operons by Ler**. Mol. Microbiol. **38**: 781-793.
67. Sperandio, V., J. Mellies, W. Nguyen, S. Shin, and J.B. Kaper. 1999. **Quorum-sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli***. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**: 15196-15201.
68. Sperandio, V., A. Torres, J. Girón, and J.B. Kaper, J. 2001. **Quorum Sensing is a Global Regulatory Mechanism in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7**. J. Bacteriol. **183**: 5187-5197.
69. Torres, A.G., J. Giron, N. Perna, V. Burland, F. Blattner, F. Avelino-Flores, and J.B. Kaper. 2002. **Identification and Characterization of *lfpABCC'DE*, a Fimbrial Operon of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7**. Infect. Immun. **70**: 5416-5427.
70. Torres, A.G., and Kaper, J.B. 2003. **Multiple Elements Controlling Adherence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa Cells**. Infect. Immun. **71**: 4985-4995.
71. Tu, X.; L. Nisan, C. Yona, E. Hanski, and I. Rosenshine. 2003. **EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic *Escherichia coli***. Mol. Microbiol. **47**: 595-606.
72. Umanski, T., I. Rosenshine, and D. Friedberg. 2002. **Thermoregulated expression of virulence genes in enteropathogenic *Escherichia coli***. Microbiol. **148**: 2735-2744.
73. Vallance, B.A., and Finlay, B.B. 2000. **Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli***. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**: 8799-8806.

74. Winstanley, C., and Hart, A. 2001. **Type III secretion systems and pathogenicity islands.** *J. Med. Microbiol.* **50**: 116-126.
75. Yona-Nadler, C., T. Umanski, S. Aizawa, D. Friedberg, and I. Rosenshine. 2003. **Integration host factor (IHF) mediates repression of flagella in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*.** *Microbiology*, **149**: 877-884.