



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DE LOS DOMINIOS  
FUNCIONALES DEL REGULADOR  
TRANSCRIPCIONAL *Ler* DE *ESCHERICHIA*  
*COLI* ENTEROPATÓGENA (EPEC)

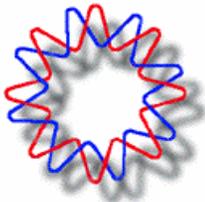
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A:

BIÓL. ALMA LILIANA TOVAR DÍAZ



DIRECTOR DE TESIS: Dr. VÍCTOR H. BUSTAMANTE SANTILLÁN

2006



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.

**EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, EN CUERNAVACA MORELOS, EN EL LABORATORIO DEL DR. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA, DENTRO DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR. ESTE TRABAJO ESTUVO DIRIGIDO POR EL DR. VÍCTOR HUMBERTO BUSTAMANTE SANTILLÁN.**

**DURANTE LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO FUI BECARIA DEL PROGRAMA DE BECAS CONACYT, CON NÚMERO DE REGISTRO 190031**

## DEDICATORIA

Por siempre a mi abuelita Elisa en el cielo, con infinito amor y admiración.

A mi familia, especialmente a mi madre por dejarme elegir este camino.

A todas aquellas personas que me acompañaron física y moralmente durante la realización de este trabajo.

Le doy gracias infinitas a mi Dios, por darme la fortaleza necesaria para terminar esta etapa de mi vida.

## AGRADECIMIENTOS

A mi abue para siempre.

A toda mi familia por estar a mi lado desde hace casi cuatro años que dejé el hogar y por recibirme de vuelta. A mi mamá por darme la confianza y la posibilidad de continuar con mis estudios. A mis hermanos por cada demostración directa o indirecta de cariño y apoyo. A mi padre. A todos ustedes les pertenece este logro.

A JLP, como antes, por creer en mí desde el principio, por sus comentarios acerca de este trabajo. Por su consejería en cuestiones propias y ajenas al lab. Porque sé que siempre podré contar con él.

A mi tutor VB por dirigir este trabajo a pesar de sus bajas, no lo hubiera logrado sin su apoyo incondicional tanto en la mesa de trabajo como en la escritura de la tesis.

A mis compañeros del lab.

A mis amigos de Morelos: Oly, Cris, Margarito, Carlos, Luary, Diana, Toño y Norma, por hacer estos años fuera de casa más agradables. Mientras haya cariño sincero, no importa que seamos diferentes.

A mis amigos del DF: Arturo, Marlen, Abraham y Mirna, por estar presentes en esta etapa tan importante de mi vida y que la distancia no haga nunca mella en nuestra amistad.

A mis compas de BQ: Luary, Karla G, Ericka y Arlette por ayudarme a sacar la materia, sin su compañía y ayuda hubiese sido un martirio.

A Cinthia Núñez y Enrique Rudiño por conformar mi Comité Tutoral y siempre aconsejarme para mi mejor desempeño académico, porque cada tutorial era exigirme más pero también alentarme.

A Rosalva y Amapola por su apoyo en esas cuestiones difíciles o tediosas.

A Elvira y Paty por su apoyo en la preparación de medios y materiales.

A mis sinodales: Guadalupe Espín, Enrique Merino, David Romero y Mario Soberón, por darse el tiempo de revisar este trabajo y sus comentarios oportunos.

Gracias Jesús por darme el valor para seguir adelante, sé que si me das cosas y me quitas otras es porque es lo mejor para mí. Hoy lo sé.

## ÍNDICE DE CONTENIDO

TEMAS	PÁG.
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	2
Patogénesis de <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC).....	3
Adherencia localizada.....	4
Transducción de señales.....	5
Adherencia íntima.....	7
Factores de virulencia.....	7
Locus de Destrucción del Enterocito (LEE).....	7
Regulación de los factores de virulencia de EPEC.....	8
“Quorum sensing”.....	9
Per (“Plasmid-encoded regulator” C).....	9
BipA (“Bvg-intermediate phase protein”).....	10
Fis (“Factor for Inversion Stimulation”).....	10
IHF (“Integration Host Factor”).....	11
Hha (“Hemolysin expression modulating protein”).....	11
GrlR y GrlA (“Global regulator of LEE, Represor y Activador, respectivamente).....	11
RpoS.....	11
H-NS (“Histone-like Nucleoid Structuring protein”).....	12
Ler (“LEE-encoded regulator”).....	12
 <b>ANTECEDENTES PARTICULARES</b>	
Ler y H-NS.....	13
H-NS: dominios funcionales.....	14
Ler: ¿dominios funcionales?.....	18
 <b>HIPÓTESIS</b> .....	20
 <b>OBJETIVOS</b> .....	20
 <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	21
 <b>RESULTADOS</b>	
Clonación de ler y obtención de mutaciones puntuales en Ler.....	31
Efecto de las mutaciones puntuales en Ler en la activación de una fusión transcripcional reportera <i>LEE2-cat</i> .....	33
Predicción de una estructura secundaria tipo “coiled coil” en las proteínas Ler silvestre y mutantes.....	34
Selección de mutantes en Ler para la caracterización de su capacidad de dimerización y unión al DNA.....	38
Ensayo de dimerización de las proteínas Ler mutantes.....	39

Purificación de las proteínas Ler silvestre y mutantes y ensayos de unión al DNA (“Electrophoretic Mobility Shift Assay”, EMSA’s).....	41
<b>DISCUSIÓN</b> .....	47
<b>CONCLUSIONES</b> .....	53
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	54
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	56

## FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Micrografía de microscopía electrónica de <i>Escherichia coli</i> .....	2
<b>Fig. 2.</b> Adherencia Localizada.....	4
<b>Fig. 3.</b> Sistema de Secreción Tipo III.....	5
<b>Fig. 4.</b> Activación de rutas de transducción de señales en la célula huésped por Proteínas efectoras de EPEC.....	6
<b>Fig. 5.</b> Pedestales formados por EPEC.....	7
<b>Fig. 6.</b> Organización transcripcional de los genes localizados en la isla de patogenicidad LEE.....	8
<b>Fig. 7.</b> Ler es el regulador maestro de los genes <i>LEE</i> .....	10
<b>Fig. 8.</b> Ensayo tipo EMSA demostrando la interacción de Ler y H-NS con la región promotora de los operones <i>LEE2</i> y <i>LEE3</i> .....	13
<b>Fig. 9.</b> Modelo de regulación de los operones <i>LEE2</i> y <i>LEE3</i> por Ler y H-NS.....	14
<b>Fig. 10.</b> Esquema de los dominios funcionales de H-NS.....	15
<b>Fig. 11.</b> Estructura del N-terminal de la proteína H-NS.....	15
<b>Fig. 12.</b> Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas H-NS, StpA y Ler.....	17
<b>Fig. 13.</b> Ler interactúa consigo misma pero no con H-NS.....	19
<b>Fig. 14.</b> Estrategia para introducir mutaciones sitio-dirigidas en el gen <i>ler</i> .....	27
<b>Fig. 15.</b> Sistema de dos híbridos en bacterias basado en LexA para detectar interacciones proteína-proteína.....	28
<b>Fig. 16.</b> Localización de las mutaciones obtenidas en Ler, tanto de manera espontánea como sitio-dirigida.....	33
<b>Fig. 17.</b> Cambios puntuales a lo largo de la secuencia de aminoácidos de Ler afectan su capacidad de inducir la expresión de la fusión transcripcional <i>LEE2-cat</i> .....	35
<b>Fig. 18.</b> Predicción de estructura secundaria tipo “coiled coil” en la región N-terminal de Ler.....	37
<b>Fig. 19.</b> Efecto de las mutaciones en las regiones N-terminal y C-terminal de Ler en la dimerización.....	40
<b>Fig. 20.</b> Interacción de las proteínas Ler silvestre y mutantes LerN8S,	

LerE61G, LerQ30P, LerL62P y LerY83A con la región reguladora del operón <i>LEE2</i> .....	44
---	----

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Cepas bacterianas y plásmidos empleados en este trabajo.....	22
<b>Tabla 2.</b> Antibióticos empleados en este trabajo.....	23
<b>Tabla 3.</b> Lista de oligonucleótidos empleados en este trabajo.....	23
<b>Tabla 4.</b> Pares de oligonucleótidos empleados para introducir las mutaciones puntuales en Ler.....	27
<b>Tabla 5.</b> Residuos modificados en las proteínas Ler mutantes obtenidas tanto al azar como por mutagénesis sitio-dirigida.....	34
<b>Tabla 6.</b> Resumen del efecto de los cambios de residuos en las funciones de Ler de inducción de la fusión <i>LEE2-cat</i> , dimerización y unión al DNA, así como en la predicción de la estructura secundaria “coiled coil” y la localización de cada uno de los cambios.....	46

## RESUMEN

*Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) y *Citrobacter rodentium* (*C. rodentium*), pertenecen a una familia de enteropatógenos que provocan una lesión intestinal característica conocida como la lesión de Adherencia y Destrucción, o fenotipo A/E (por las siglas en inglés "Attaching and Effacing"). De estos enteropatógenos, EPEC es una causa importante de diarrea en humanos, sobre todo en niños menores de seis meses. La patogenicidad de los enteropatógenos A/E está dada por la presencia en sus cromosomas de una isla de patogenicidad conocida como LEE (por las siglas en inglés "Locus of Enterocyte Effacement"). La mayoría de los genes localizados en esta isla se encuentran organizados en cinco operones policistrónicos (*LEE1* a *LEE5*), los cuales son regulados positivamente por el regulador transcripcional Ler codificado por el primer gen del operón *LEE1*. Ler pertenece a la familia de proteínas semejantes a histonas H-NS/StpA, cuyos miembros generalmente actúan como reguladores transcripcionales globales y participan en la organización del genoma bacteriano. Ler induce la expresión de los operones *LEE* contrarrestando la represión ejercida por H-NS sobre los promotores de éstos; así, Ler actúa como des-represor y no como un activador clásico de la transcripción. Se ha demostrado que Ler dimeriza y que se une a las regiones reguladoras de sus genes blanco. Sin embargo, no se han caracterizado mediante mutagénesis los dominios funcionales de este importante regulador. Así mismo, no se ha determinado si Ler tiene otros dominios necesarios para su función además de los supuestos dominios de unión al DNA y de dimerización.

En este trabajo se generaron diferentes mutaciones puntuales a lo largo del gen *ler* de EPEC con el propósito de comenzar a definir a caracterizar los dominios funcionales de Ler. El análisis del efecto que tuvieron estas mutaciones sobre la funcionalidad de Ler de inducir la expresión de una fusión transcripcional *LEE2-cat*, de dimerizar y de unirse a la región reguladora del operón *LEE2*, reveló información importante sobre los dominios funcionales de dicho regulador. Mutaciones que afectan la predicción de una estructura secundaria tipo "coiled coil" en la región N-terminal, así como mutaciones en la región conectora y en el dominio de unión al DNA (éste último localizado en la región C-terminal), afectaron drásticamente la capacidad de Ler de inducir la expresión del operón *LEE2*. En contraste con lo reportado para H-NS, donde la dimerización depende de su dominio "coiled", la dimerización de Ler parece estar mediada por la región conectora. Además, nuestros resultados sugieren que el dominio "coiled coil" de Ler podría mediar la formación de oligómeros cuando este reguladores une al DNA. Por otro lado, la capacidad de Ler de unirse al DNA se afectó severamente al introducir mutaciones en el supuesto dominio de unión al DNA, como esperábamos.

## INTRODUCCIÓN

La microbiota intestinal tiene importantes funciones metabólicas, tróficas y protectoras y se compone de diversas especies microbianas, de las cuales las bacterianas representan hasta el 80% de la diversidad total. Entre estas, la especie *Escherichia coli* (*E. coli*) es la bacteria anaeróbica facultativa más abundante<sup>39</sup>.

*E. coli* es una bacteria Gram-negativa de tipo bacilar (Fig. 1), perteneciente a la familia de las Enterobacterias. *E. coli* ha sido por más de medio siglo el principal modelo de estudio en aspectos como fisiología, bioquímica y genética, así como en el estudio de las interacciones bacteria-hospedero<sup>39</sup>.

La mayoría de las cepas de *E. coli* son inocuas para sus organismos huésped, con los cuales desarrollan una relación de mutuo beneficio. Esto es debido a que crean un ambiente favorable para ellas mismas y previenen el crecimiento de otras poblaciones microbianas. Sin embargo, existen cepas patógenas de *E. coli* para animales y humanos, las cuales se diferencian porque expresan factores de virulencia que alteran la fisiología normal del huésped ocasionando enfermedades<sup>25, 38, 39, 43</sup>.



**Figura 1.** Micrografía de microscopía electrónica de *Escherichia coli* (<http://www.mbl.edu/astrobiology/Riley/image/E.coli.gif>).

Se conocen alrededor de 200 cepas patógenas de *E. coli*, las cuales causan varias enfermedades en humanos, incluyendo diversos tipos de diarrea e infecciones del tracto urinario (UTI's). Algunas cepas están asociadas a sepsis/meningitis<sup>25, 38, 43</sup>. Las cepas causantes de diarrea se han dividido en seis categorías con base, principalmente, en el mecanismo de virulencia<sup>25, 38, 43</sup>. Dichas categorías son:

*E. coli* enterotoxigénica (ETEC): causa la llamada “diarrea del viajero”, la cual se contrae al ingerir agua y alimentos contaminados. ETEC coloniza la superficie de la mucosa del intestino delgado por medio de un conjunto de fimbrias de colonización llamadas CFA's. La diarrea se produce por la acción de enterotoxinas, ya sea del tipo termoestable o termolábil, las cuales dan lugar a la secreción intestinal<sup>25, 38, 43</sup>.

*E. coli* enteroinvasiva (EIEC): produce diarrea y algunos pacientes pueden desarrollar enfermedad tipo disentería; esta bacteria se contrae a través de agua y alimentos contaminados. EIEC invade el epitelio intestinal, produciendo diarrea por la acción de una o más enterotoxinas secretoras con papeles variables en la patogénesis<sup>25, 38, 43</sup>.

*E. coli* enteropatógena (EPEC): es una causa predominante de diarrea en niños menores de 2 años en países en vías de desarrollo; se contrae por vía fecal-oral. EPEC produce el fenotipo denominado Adherencia Localizada, así como la lesión histopatológica A/E (“Attaching and Effacing”, Adherencia y Destrucción, ver más adelante). La mayoría de las cepas de EPEC poseen el plásmido de alto peso molecular EAF (“EPEC-Adherence Factor”, factor de adherencia de EPEC), que contribuye de manera importante a la virulencia. La diarrea no se ha asociado a la producción de toxinas; sin embargo, se ha propuesto que se debe a la destrucción de las microvellosidades de la célula epitelial, lo que reduce el área de superficie de absorción de los enterocitos<sup>25, 38, 43</sup>.

*E. coli* enterohemorrágica (EHEC): provoca la llamada “enfermedad de las hamburguesas”; se contrae a partir de agua o alimentos contaminados. EHEC es causante de epidemias esporádicas de Colitis Hemorrágica y Síndrome Urémico-Hemolítico, debido a la producción de una potente citotoxina conocida como Shiga o Stx. Como EPEC, produce la lesión A/E y algunas cepas contienen el plásmido de alto peso molecular pO157 que codifica para potenciales factores de virulencia<sup>25, 38, 43</sup>.

*E. coli* enteroagregativa (EAEC): se asocia con diarrea pediátrica con frecuencia mucosid, aunque también se presenta en adultos, en ambos casos tanto en países desarrollados como en vías de desarrollo. La diarrea causada por EAEC se debe a la colonización de la mucosa intestinal, sobre cuyas células se adhiere de manera agregativa, seguida por la secreción de enterotoxinas y citotoxinas tales como EAST1, Pet, y una hemolisina<sup>25, 38, 43</sup>.

*E. coli* difuso-adherente (DAEC): produce diarrea persistente en niños entre 2 y 5 años. DAEC se caracteriza por adherirse de forma difusa a las células epiteliales, promoviendo daño a las microvellosidades; se desconoce si produce toxinas y, por lo tanto, el mecanismo por el cual ocasiona diarrea<sup>25, 38, 43</sup>.

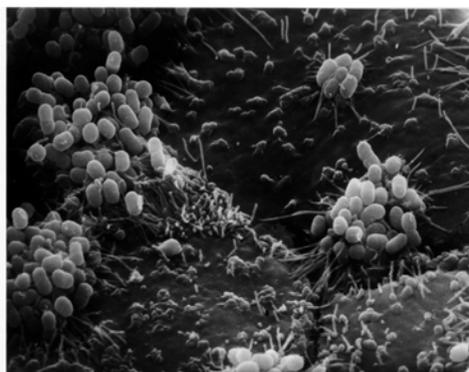
### ⇒ **Patogénesis de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)**

Históricamente EPEC fue el primer patotipo patógeno de *E. coli* descrito como EPEC y se distingue de otros porque no produce toxinas (p.e. EHEC) y no es invasiva (p.e. EIEC). EPEC es en la actualidad una de las principales bacterias causantes de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, la cual es potencialmente fatal en niños menores de 6 meses<sup>25, 38, 43</sup>. Así mismo, EPEC ha sido implicada en epidemias esporádicas de diarrea en ciudades desarrolladas, así como causante de diarrea en voluntarios adultos, luego de la ingestión de un alto inóculo bacteriano<sup>38</sup>.

EPEC pertenece a una familia de patógenos denominada A/E, la cual incluye a EHEC y al patógeno de ratones *Citrobacter rodentium*, entre otras cepas. Los patógenos A/E se caracterizan por producir la histopatología conocida como la Lesión de Adherencia y Destrucción o lesión A/E. Dicha lesión consiste en la destrucción localizada de las microvellosidades de la célula epitelial intestinal y la adherencia íntima de la bacteria a la membrana plasmática de la célula huésped<sup>25, 38, 43</sup>. El modelo de patogénesis que lleva a la producción de la lesión A/E se ha dividido en tres etapas, las cuales son:

**1) Adherencia localizada.** Esta etapa constituye la primera interacción bacteria-célula eucarionte, caracterizada por la adherencia no íntima de la bacteria a su célula hospedera por medio de un pilus tipo IV llamado BFP (“Bundle-Forming Pilus”, pilus formador de haces), el cual es codificado en el plásmido de alto peso molecular EAF<sup>5, 25, 34, 38, 43, 53</sup>. El fenotipo de Adherencia Localizada consiste en la formación de microcolonias bacterianas en la superficie de las células epiteliales colonizadas (Fig. 2). El BFP se produce dentro de las microcolonias adherentes de EPEC formando una matriz de fibras que estabilizan físicamente a la colonia adherida, conectando de este modo a la bacteria con la superficie del borde del cepillo intestinal y conduciendo a la agregación y formación de las microcolonias<sup>5, 53</sup>.

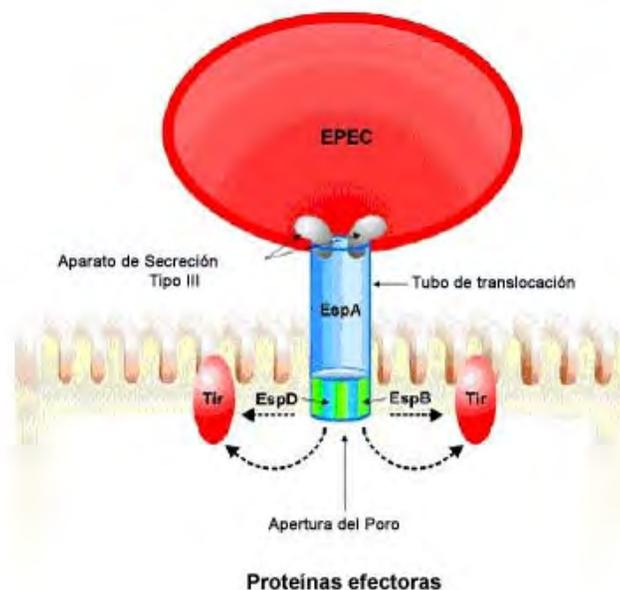
El BFP es de localización polar y se compone de la subunidad peptídica principal BfpA, la cual tiene una señal N-terminal muy conservada altamente hidrofóbica. Dicha señal consta de una estructura secundaria tipo “coiled coil” responsable de la interacción entre monómeros de BfpA para la polimerización del pilus en una fibra. Los genes responsables de la biogénesis del pilus BFP están codificados en el operón *bfp* contenido en el plásmido EAF<sup>5, 53</sup>. El operón *bfp* se compone de 14 genes y varias de las proteínas codificadas por dichos genes tienen similitud a otras proteínas involucradas en la biogénesis de otros pili tipo IV, tales como el pilus co-regulado por toxina (TCP) de *Vibrio cholerae* y el pilus de *Pseudomonas aeruginosa*<sup>5</sup>.



**Figura 2.** Adherencia Localizada. Micrografías de microcolonias formadas por EPEC en células epiteliales intestinales.

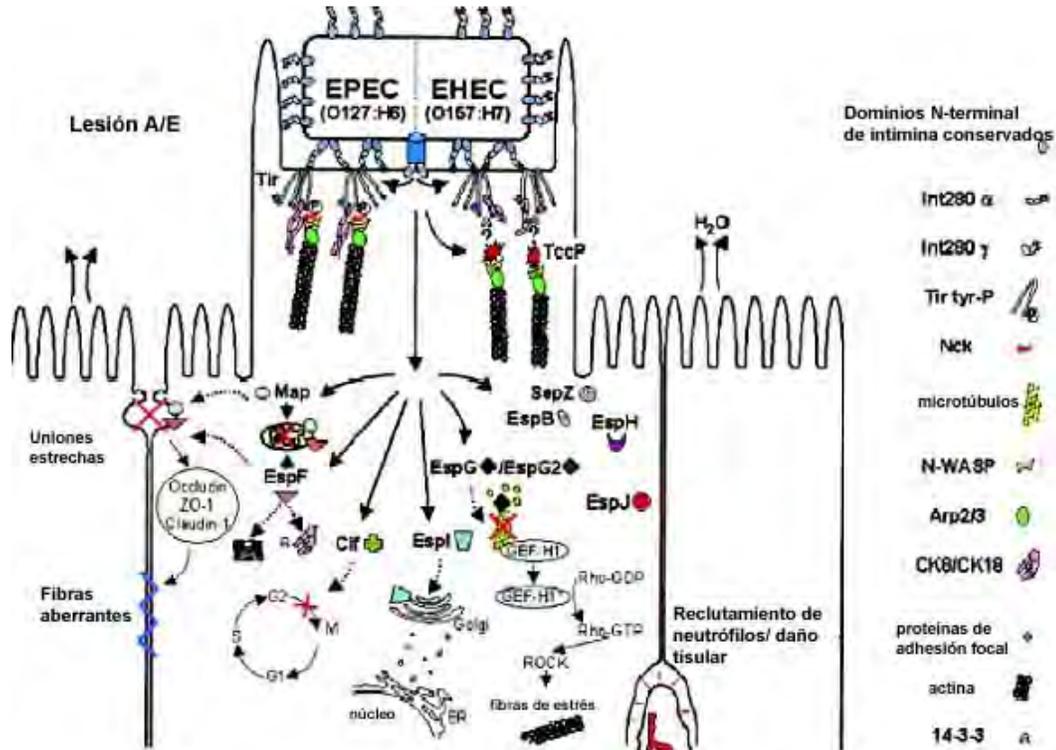
**2) Transducción de señales.** La adherencia de EPEC a las células epiteliales induce modificaciones en una variedad de vías de transducción de señales, debido a la translocación de proteínas efectoras de la bacteria al citoplasma de la célula huésped<sup>8, 10, 19, 26, 28, 33, 35, 38, 41, 57, 59</sup>. Esto se consigue por medio de un Sistema de Secreción Tipo III (SSTT) o complejo de aguja, el cual es utilizado por diversos patógenos para la translocación directa de factores de virulencia de la bacteria a la célula huésped (Fig. 3)<sup>16, 60</sup>. El SSTT consiste de un ensamblaje de anillos proteicos que atraviesan las dos membranas de la bacteria con una extensión tipo aguja o gancho flagelar<sup>60</sup>. La mayoría de las proteínas del complejo de aguja se localizan en la membrana interna de la bacteria y son homólogas a algunos componentes del cuerpo basal flagelar de bacterias Gram-negativas<sup>60</sup>.

Asociada al SSTT se encuentra una extensión filamentosa única de los patógenos A/E, conocida como el filamento EspA<sup>19</sup>. EspA constituye un enlace transitorio entre la bacteria y la célula huésped y es necesario para la translocación de las proteínas efectoras. Otras proteínas que forman parte del poro de translocación son EspD y EspB. EspD tiene un papel dual, por un lado, se requiere para la biogénesis de EspB y por otro, para anclar al filamento EspA a la membrana plasmática de la célula huésped, para lo cual necesita interactuar con EspB (Fig. 3)<sup>19</sup>. Entre las proteínas efectoras liberadas al citoplasma de las células epiteliales se encuentran: EspF, EspG, EspH, Map, Tir, Cif, así como las mismas EspD y EspB (Fig. 4)<sup>10, 19, 26, 28, 33, 35, 57, 59</sup>.



**Figura 3.** Sistema de Secreción Tipo III. El SSTT se compone del filamento EspA, ubicado en la membrana externa bacteriana y de las proteínas EspB y EspD, las cuales se insertan en la membrana celular del huésped. En conjunto, esta estructura llamada complejo de aguja, permite el paso de diversas moléculas efectoras, las cuales conducen a diversos cambios en las vías de señalización celular del huésped, tales como el reordenamiento de proteínas del citoesqueleto (modificado de Vallance y Finlay, 2000<sup>59</sup>).

Se han descrito diversas funciones para las proteínas efectoras (Fig. 4). EspF está involucrada en la interrupción de la función de la barrera intestinal, es dirigida a la mitocondria de la célula huésped interfiriendo con su función y está involucrada en la muerte celular aparentemente por apoptosis<sup>10</sup>. EspH se dirige a la membrana plasmática de la célula huésped, reprimiendo la formación de filopodios y potenciando la formación de los pedestales de actina<sup>57</sup>. Map, por otro lado, interfiere con el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial de la célula huésped, está involucrada en la formación de filopodios transitorios e interrumpe la función de la barrera intestinal, así como las uniones estrechas<sup>26, 28</sup>. EspG se une a tubulina en células HeLa, estimulando la desestabilización de los microtúbulos del citoesqueleto<sup>35</sup>. EspB es translocada junto con EspD a la membrana de la célula huésped y también es dirigida a, citoplasma, donde se ha observado que causa una redistribución de actina por reclutamiento de  $\alpha$ -catenina, modulando el citoesqueleto de la célula huésped<sup>19</sup>.



**Figura 4.** Activación de rutas de transducción de señales en la célula huésped por proteínas efectoras de EPEC. La activación de diversas rutas de transducción de señales genera varios cambios en la célula huésped, como son, aumento en el nivel intracelular de calcio, activación de la cascada de inositol trifosfato, y el reordenamiento de las proteínas del citoesqueleto (modificado de Garmendia *et al.*, 2005<sup>19</sup>).

También se ha descrito la función de efectores codificados fuera del LEE, de entre los cuales, Cif ("cell cycle inhibiting factor", factor de inhibición del ciclo celular) fue el primero. Cif produce un efecto citopático irreversible en células

HeLa, caracterizado por el reclutamiento de adhesiones focales, el ensamblaje de fibras de estrés y la detención de la proliferación celular, bloqueando de este modo la transición del ciclo celular de la fase G<sub>2</sub> a la fase M (Fig. 4)<sup>33</sup>. Otro efector llamado EspI/NleA (“non-LEE-encoded effector”) se requiere para la virulencia de *C. rodentium* en ratones<sup>19</sup>. Por otro lado, se ha visto que en *C. rodentium* y EHEC el efector EspJ codificado en un profago, juega un papel en la supervivencia del huésped y la transmisión del patógeno<sup>19</sup>.

**3) Adherencia íntima.** Como se mencionó anteriormente, la translocación de las proteínas efectoras conduce a diversos cambios en las vías de transducción de señales en el huésped, entre los cuales se encuentran: activación de la cascada de inositol trifosfato, aumento en el nivel intracelular de calcio y, característicamente, la reorganización de las proteínas del citoesqueleto en las estructura de copa o pedestal (ver más adelante)<sup>8, 19, 41, 59</sup>.

Una de las proteínas efectoras translocadas, Tir (“Translocated intimin receptor”, receptor translocado de intimina), una vez en el citoplasma de la célula huésped, es fosforilada en un residuo de tirosina, evento esencial para su actividad reclutadora de actina. Así mismo, eventos de fosforilación en otros residuos de la proteína inducen cambios conformacionales que ayudan a la inserción de Tir en la membrana de la célula huésped, donde actúa como el receptor para la proteína de membrana externa bacteriana denominada intimina (Figs. 3 y 4)<sup>41</sup>. La interacción Tir-intimina provoca el reordenamiento de diversas proteínas del citoesqueleto, particularmente de actina, induciendo la formación de las estructuras conocidas como copas o pedestales por debajo de la bacteria adherida (Fig. 5), evento que es acompañado por la pérdida de las microvellosidades de la célula epitelial intestinal, dando lugar a la generación de la de Adherencia y Destrucción<sup>25, 38, 43</sup>.

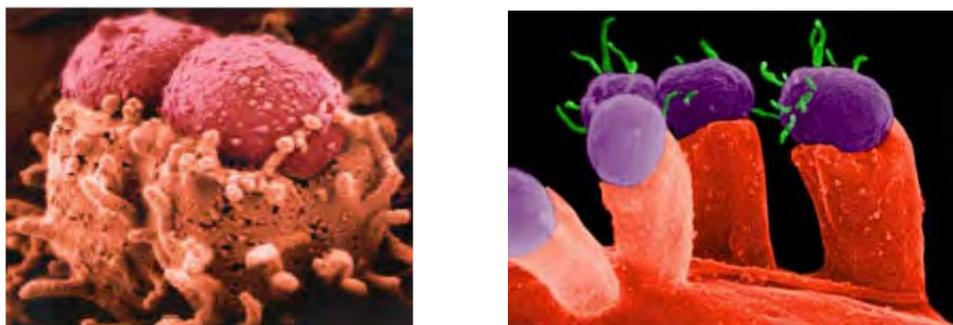


Figura 5. Pedestales formados por EPEC (tomado de Kaper, 2004<sup>25</sup>).

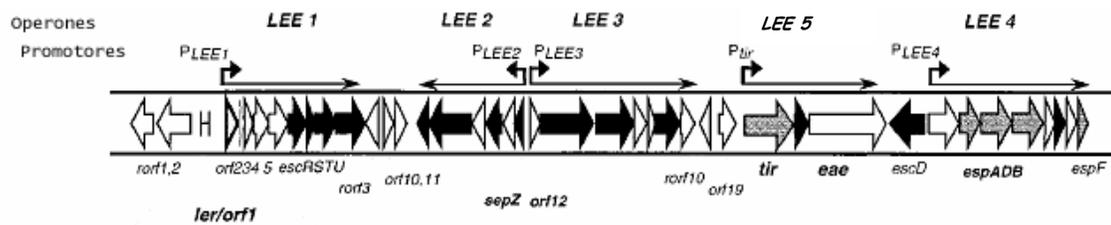
⇒ **Factores de virulencia de EPEC**

### **Locus de Destrucción del Enterocito (LEE)**

Todos los factores necesarios para la formación de la lesión A/E son codificados en una isla de patogenicidad con un alto porcentaje de conservación

entre los diferentes patógenos A/E, conocida como Locus de Destrucción del Enterocito, (“Locus of Enterocyte Effacement”, LEE)<sup>14</sup>. Esto se demostró al complementar a una cepa de *E. coli* K-12 (cepa no patógena) con la región del LEE, la cual le confirió la capacidad de inducir las lesiones A/E<sup>14</sup>.

El LEE tiene un tamaño de 35.6 Kb y está insertado en el minuto 82 del cromosoma de EPEC<sup>14</sup>. Se compone de 41 genes y se divide en tres regiones funcionales, organizadas en al menos cinco operones policistrónicos principales (Fig. 6)<sup>7, 11, 14, 48</sup>.



**Figura 6.** Organización transcripcional de los genes localizados en la isla de patogenicidad LEE. Los operones *LEE1*, *LEE2* y *LEE3*, codifican para los componentes del SSTT, el operón *LEE4* codifica para algunas de las proteínas secretadas a través del SSTT y el operón *LEE5* codifica para las proteínas involucradas en la adherencia íntima (modificado de Elliott *et al.*, 2000<sup>14</sup>).

Los operones *LEE1*, *LEE2* y *LEE3* contienen la mayoría de los genes que codifican para los componentes estructurales y auxiliares del SSTT<sup>11, 14</sup>; el operón *LEE4* codifica para algunas de las proteínas secretadas a través de dicho sistema, así como algunos componentes del complejo de aguja, tales como EspA, EspB y EspD; y el operón *LEE5* codifica para las proteínas involucradas en la adherencia íntima (Tir, intimina y CesT, la chaperona de Tir)<sup>48</sup>. Un operón adicional caracterizado recientemente ubicado entre los operones *LEE2* y *LEE3*, codifica para los reguladores negativo y positivo de los genes *LEE*, GrlR y GrlA, respectivamente<sup>3, 11, 30</sup>.

### ⇒ Regulación de los factores de virulencia de EPEC

Los factores de virulencia de las bacterias patógenas se expresan en respuesta a diversas señales ambientales o condiciones de crecimiento, incluyendo temperatura, concentración de iones, osmolaridad, pH, disponibilidad de fuentes de carbono y niveles de oxígeno<sup>16, 36</sup>.

En EPEC, la expresión de los factores de virulencia codificados en el LEE es inducida bajo condiciones que asemejan las del tracto gastrointestinal. Dichas condiciones son el crecimiento en el medio de cultivo para células eucariontes DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”) a una temperatura de 37°C, las cuales proveen la condición óptima para la expresión de los genes *LEE* y *bfp*<sup>27, 46</sup>. Se ha demostrado que temperaturas por abajo o por arriba de 37°C y el crecimiento en medio rico como el LB (“Luria Broth”), regulan negativamente la expresión de los

genes de virulencia. Por otro lado, la presencia de sales de amonio en el medio de cultivo tiene un efecto negativo en la expresión de los genes *LEE*<sup>7, 27, 34, 46, 48</sup>.

Se propone que las señales ambientales mencionadas mimetizan las condiciones que encuentra EPEC dentro de su hospedero, particularmente en el intestino delgado distal, que constituye el nicho de colonización de la bacteria<sup>25, 38, 43</sup>. El intestino delgado distal contiene una baja densidad poblacional bacteriana, de lo cual deriva una baja concentración de compuestos de desecho provenientes del metabolismo, tales como el amonio. De este modo, la temperatura fisiológica (37°C) así como bajas concentraciones de amonio, le indicarían a EPEC que se encuentra en un nicho favorable para la colonización. Por otro lado, el NaHCO<sub>3</sub>, uno de los componentes del medio de cultivo DMEM, neutraliza en el intestino delgado el pH ácido del estómago, constituyendo otra de las señales que detecta EPEC para reconocer su nicho de colonización<sup>27</sup>.

La proteína Ler (“LEE-encoded regulator”), codificada por el primer gen del operón *LEE1*, es el regulador transcripcional positivo central de los genes *LEE* (Fig. 7)<sup>3, 4, 7, 11, 14, 17, 20, 23, 30, 37, 55</sup>. Ler induce la expresión de dichos genes contrarrestando la represión ejercida por el regulador global H-NS sobre las regiones promotoras, probablemente actuando como un des-represor (Fig. 9)<sup>3, 7, 23, 30, 55</sup>.

Dado su papel como regulador positivo central de los genes *LEE*, la expresión de Ler se encuentra bajo el control de un complejo mecanismo que involucra tanto reguladores globales presentes en las enterobacterias (p. e. H-NS), como específicos de EPEC (p. e. GrIR/A). A continuación se menciona brevemente cómo interviene cada uno de estos factores en la expresión del gen *ler* (Fig. 7).

### **“Quorum-sensing”**

El “quorum sensing” es un mecanismo de señalización célula-célula que involucra la producción de compuestos tipo hormona llamados auto-inductores, mediante los cuales la bacteria percibe incrementos en su población, así como en la de otras bacterias<sup>54</sup>. Cuando los auto-inductores alcanzan una cierta concentración umbral, interactúan con proteínas bacterianas reguladoras, controlando la expresión génica. Estos sistemas se han reportado para una gran variedad de organismos Gram-positivos y negativos, incluidos *E. coli*, *Salmonella spp*, *Vibrio spp*, entre otros.

De acuerdo a algunos reportes, los genes *LEE* son regulados en cascada por el sistema de “quorum sensing” a través de la activación de la transcripción de *ler* por QseA<sup>54</sup>. 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*.

### **PerC (“Plasmid-encoded regulator” C)**

Además del locus *bfp*, que codifica para el pilus tipo IV, el plásmido EAF contiene otro locus denominado *per* (“Plasmid-encoded regulator”, regulador codificado en plásmido), el cual codifica para las proteínas PerA, PerB y PerC<sup>37, 42</sup>.

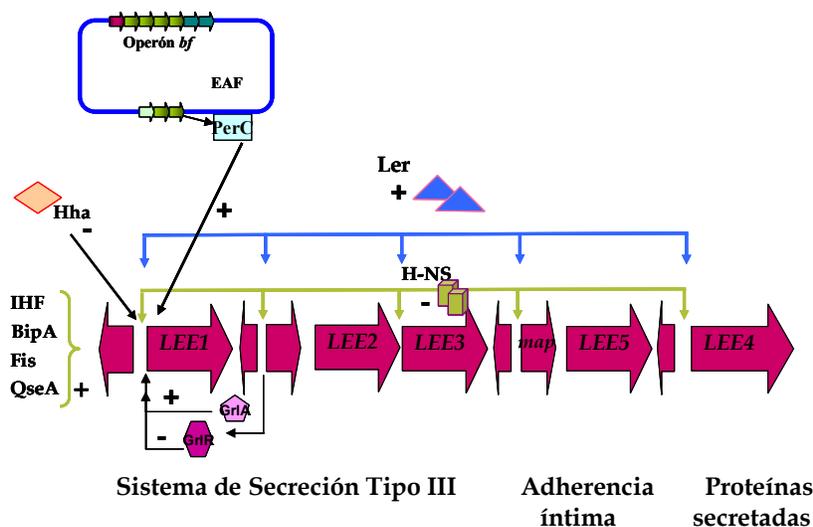
La proteína PerA, que presenta homología con miembros de la familia de reguladores AraC/XylS, regula su propia expresión y la del operón *bfp*, siendo importante en la primera etapa de la patogénesis de EPEC<sup>34</sup>. PerB no tiene homología clara con alguna proteína descrita a la fecha y una mutante en *perB* no tiene fenotipo. Por su parte, PerC modula positivamente la expresión de *ler* según la condición de crecimiento (p. e. el crecimiento en condición estática; Villalba M., datos no publicados)<sup>42</sup>.

### **BipA (“(Bvg-intermediate phase protein”)**

BipA es un miembro de la familia de GTPasas de unión a ribosoma y reside en el citosol. Se ha demostrado que BipA afecta la expresión de los operones LEE, regulando positivamente la transcripción de *ler*<sup>22</sup>. Diversos estudios han demostrado que mutantes en *bipA* tienen una habilidad disminuida para formar las lesiones A/E en células epiteliales. Así mismo, BipA regula la movilidad celular mediada por flagelo, un proceso implicado en la virulencia de muchos patógenos bacterianos<sup>22</sup>.

### **FIS (“Factor for Inversion Stimulation”)**

Fis es un activador transcripcional global de genes y operones asociados con el metabolismo primario; funciona como homodímero, curvando favorablemente las regiones reguladoras de sus genes blanco. Fis se requiere para invadir a las células epiteliales y formar las lesiones A/E, regulando positivamente la transcripción de *ler*<sup>21</sup>.



**Figura 7.** Ler es el regulador maestro de los genes *LEE*. Ler es codificado por el primer gen del operón *LEE1* y es el regulador positivo del resto de los genes *LEE*. Ler, a su vez, requiere de las proteínas IHF, Fis, BipA, GrlA y PerC para su expresión. Por otro lado, las proteínas H-NS, Hha y GrlR regulan negativamente la transcripción de *ler*.

### **IHF (“Integration Host Factor”).**

IHF es una proteína heterodimérica de 21.8 kDa muy abundante en *E. coli* (20,000 a 100,000 moléculas por célula) y es miembro de la familia de proteínas tipo histona<sup>18</sup>. IHF se une al DNA induciendo curvaturas para formar complejos nucleo-proteicos favorables para la transcripción de genes involucrados en diversos procesos celulares, tales como recombinación sitio-específica, replicación del DNA, transposición y empaquetamiento de DNA<sup>18</sup>.

En la cascada de regulación de los genes *LEE*, se ha observado que IHF es esencial para la formación de las lesiones A/E al regular positivamente la transcripción de *ler*. IHF se une río arriba de la secuencia promotora -35 de *ler*, entre las posiciones -83 y -53 respecto al sitio de inicio de la transcripción. Si se elimina el sitio de unión de IHF, *ler* es incapaz de transcribirse<sup>20, 61</sup>.

### **Hha (“Hemolysin expression modulating protein”).**

Hha es una proteína de 8.5 kDa asociada al nucleóide bacteriano, que modula negativamente la expresión génica de diferentes factores de virulencia en *E. coli* y *Yersinia enterocolitica* uniéndose a las regiones promotoras de sus genes blanco o interactuando con la proteína H-NS. Hha se ha implicado en la regulación negativa de los genes *esp* de EHEC a través de Ler<sup>50</sup>. Hha es capaz de unirse con alta afinidad a la región promotora de *ler*, disminuyendo su transcripción. Por el contrario, en ausencia de Hha la transcripción de *ler* se incrementa<sup>50</sup>.

### **GrlR y GrlA.**

Recientemente se caracterizó un nuevo operón localizado entre los operones *LEE1* y *LEE2*, compuesto por los genes *grlR* y *grlA*<sup>11</sup>. Dichos genes codifican para dos reguladores de la expresión de *ler*. GrlA tiene homología del 23% con la proteína CaiF, un activador transcripcional con un supuesto motivo hélice-vuelta-hélice de unión al DNA en su extremo N-terminal. GrlA actúa como un activador de la transcripción de *ler*<sup>3</sup>. Por su parte, GrlR no tiene homología clara con alguna proteína descrita; se propone que modula negativamente la expresión de Ler, pues al sobre-expresar la proteína la transcripción de *ler* disminuye<sup>11</sup>. Así mismo, en el laboratorio se ha demostrado que GrlA interactúa con GrlR, lo cual se propone que es importante para que GrlA pueda eliminar la represión ejercida por GrlR (Lara C., et al, datos no publicados).

### **RpoS**

Recientemente se describió que en EHEC el factor  $\sigma$  alternativo RpoS, así como DsrA, participan en la regulación de los genes *LEE*, regulando la transcripción de *ler*<sup>30</sup>. DsrA es un RNA no codificante de 85 nt que modula la expresión de H-NS y de RpoS. RpoS y DsrA regulan la expresión de los genes *LEE* a través de dos vías diferentes, una involucra la activación del promotor de *ler* por DsrA a través de RpoS y la otra involucra la activación de GrlA dependiente de H-NS. Se ha demostrado que la sobre-expresión de DsrA induce altos niveles de las proteínas

Esp's y dicha inducción requiere de Ler y RpoS. Por otro lado, una vez que GrlA es inducida por Ler, se incrementa a su vez, la transcripción de *ler*, que está siendo reprimida por H-NS<sup>30</sup>.

### **H-NS ("Histone-like Nucleoid-Structuring protein").**

H-NS pertenece a la familia de proteínas tipo histona, la cual consiste de más de 70 proteínas presentes en bacterias Gram-negativas -particularmente en enterobacterias- y a menudo con más de una copia por genoma, resultado probablemente de eventos de duplicación y transferencia horizontal<sup>1, 13, 45</sup>. Los miembros de la familia H-NS pueden ser codificados por genes localizados tanto en cromosoma como en plásmidos de virulencia<sup>1, 13, 45</sup>.

H-NS es una proteína muy abundante en *E. coli*, con alrededor de 20,000 moléculas por célula y está involucrada en la organización del nucleoide bacteriano, influenciando la recombinación y estabilidad del genoma<sup>1, 13, 45</sup>. A consecuencia de esto, H-NS actúa como un regulador transcripcional global, controlando generalmente de forma negativa la expresión de más de 200 genes en *E. coli* involucrados en diferentes procesos celulares, incluyendo la virulencia, así como en la respuesta a diversas señales ambientales, tales como la temperatura, osmolaridad, pH y fase de crecimiento<sup>1, 13, 45</sup>. Aunque H-NS no reconoce una secuencia consenso de DNA, muestra una preferencia hacia secuencias ricas en A-T y porciones de DNA intrínsecamente curvo.

En el caso de EPEC, H-NS causa el silenciamiento de los genes *LEE* uniéndose a sus regiones promotoras, incluyendo la región reguladora de *ler*, reprimiendo de este modo la transcripción<sup>7, 23, 48, 55</sup>. Para los genes *LEE*, se propone que H-NS forma dímeros que se unen al DNA, los cuales posteriormente se asocian formando oligómeros que impiden la unión de la RNA polimerasa (RNAP) al DNA, o la atrapan anclada a los promotores, impidiendo la transcripción (Fig. 7 y 9).

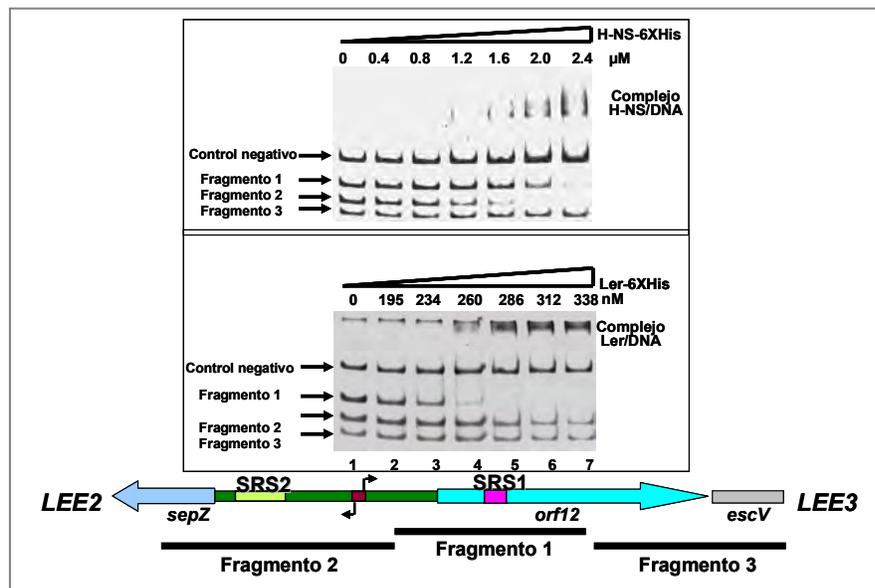
### **Ler**

Como ya se mencionó, Ler es el regulador positivo central de la expresión de los genes *LEE*. Ler es un miembro de la familia de proteínas tipo H-NS y con ésta tiene ~25% de similitud, sobre todo hacia el extremo C-terminal, el cual contiene el dominio de reconocimiento y unión al DNA (Fig. 11). Se ha demostrado que Ler interactúa con el DNA en las regiones reguladoras de los operones *LEE2*, *LEE3*, *LEE4* y *LEE5* para que se lleve a cabo la transcripción de los genes que codifican<sup>7, 23, 55</sup>. Además, Ler regula negativamente la expresión de su gen uniéndose a su región reguladora, limitando la concentración de proteína a la estrictamente necesaria para la inducción de la expresión de los demás genes *LEE*<sup>4</sup>.

## ANTECEDENTES PARTICULARES

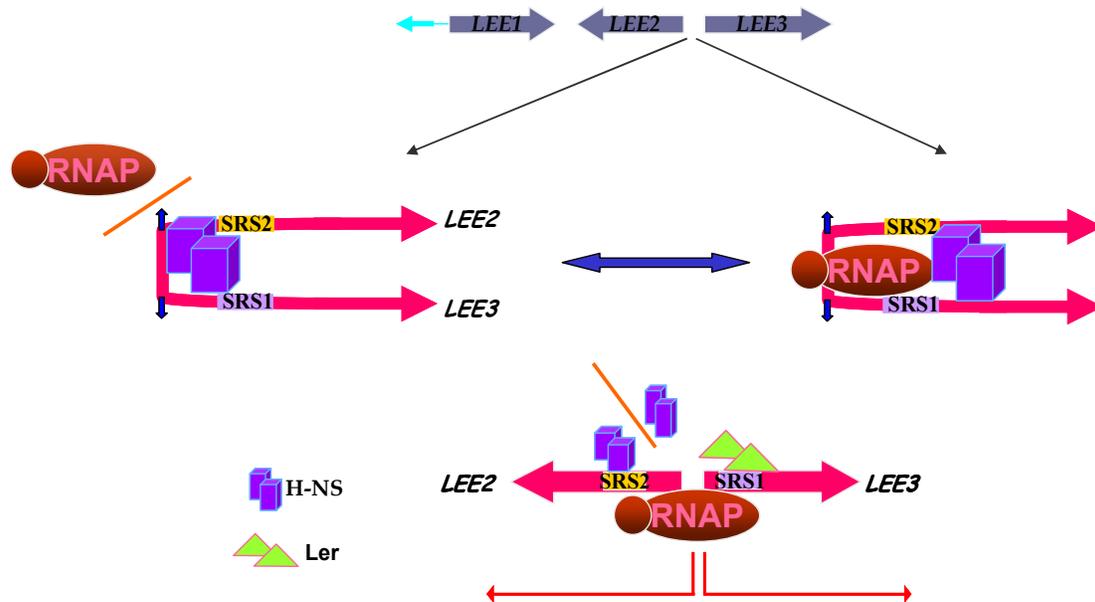
### ⇒ Ler y H-NS

En el laboratorio del Dr. José Luis Puente se han usado como modelos los operones *LEE2* y *LEE3* para estudiar el mecanismo de regulación mediada por Ler y H-NS de los genes *LEE*. Resultados de nuestro laboratorio demostraron que H-NS se une a las regiones denominadas Secuencias Reguladoras Silenciadoras (SRS) 1 y 2, las cuales se encuentran flanqueando los promotores de los operones *LEE2* y *LEE3* (Figs. 8 y 9)<sup>7</sup>. Se sabe que se requiere de la unión de H-NS a ambas SRS's para favorecer la formación de un complejo nucleoproteico que impide la transcripción. Dicho complejo es estabilizado por interacciones entre dímeros de H-NS y actúa, ya sea imposibilitando el reconocimiento del promotor por la RNAP, o atrapándola unida al promotor. Con la eliminación de cualquiera de las SRS's, se libera la represión ejercida por H-NS sobre los operones *LEE2* y *LEE3*<sup>7</sup> y la transcripción de estos operones se vuelve constitutiva. Esto es congruente con uno de los modelos propuestos para el mecanismo molecular de represión por H-NS, el cual plantea que se requiere la unión de H-NS a dos sitios blanco en el DNA, denominados puntos de nucleación<sup>44, 45, 56</sup>. H-NS tiene alta afinidad por dichos puntos y a partir de ellos puede polimerizar a lo largo del DNA, impidiendo la transcripción de sus genes blanco<sup>13, 44, 56</sup>.



**Figura 8.** Ensayo tipo EMSA demostrando la interacción de Ler y H-NS con la región promotora de los operones *LEE2* y *LEE3*. H-NS interactúa con las Secuencias Reguladoras Silenciadoras (SRS) 1 y 2 (A), mientras que Ler sólo interactúa con la SRS1 (B). Se propone que la unión de Ler a la SRS 1 desestabiliza el complejo nucleoproteico represor de H-NS, permitiendo la transcripción (Tomado de Bustamante *et al.*, en preparación).

En el laboratorio también se demostró que Ler se une únicamente a la SRS 1 pero con alta afinidad, desestabilizando el complejo nucleoproteico represor de H-NS sobre las regiones reguladoras de los operones *LEE2* y *LEE3*. Se desconoce cómo Ler contrarresta la represión ejercida por H-NS. Se especula que puede ser compitiendo con H-NS por los sitios de unión al DNA, cambiando la fase del DNA de modo que H-NS pierde estabilidad en la unión, o bien, impidiendo su oligomerización una vez que Ler está unida al DNA. En cualquier caso, Ler actúa como des-represor de H-NS permitiendo que se lleve a cabo la transcripción de los genes *LEE* (Fig. 8B y C, y 9)<sup>7</sup>. De este modo, se propone que Ler contiene un dominio de unión al DNA localizado en su extremo C-terminal, el cual es necesario para llevar a cabo su función de des-represor.



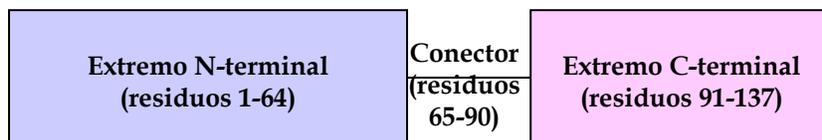
**Figura 9.** Modelo de regulación de los operones *LEE2* y *LEE3* por Ler y H-NS. H-NS se une a las SRS 2 y 1, formando un complejo núcleo-proteico represor que impide el acceso de la RNAP, o bien, la atrapa unida a los promotores. En ambos casos, se impide la transcripción de los operones *LEE2* y *LEE3*. Ler, al unirse a la SRS 1, impide la formación del complejo núcleo-proteico represor de H-NS y entonces la RNAP puede llevar a cabo la transcripción de los genes.

### **H-NS: dominios funcionales**

Por estudios *in vitro* e *in vivo* se determinó que H-NS consiste de al menos dos dominios funcionales independientes, ubicados en las regiones N-terminal y C-terminal, encargados de llevar a cabo la dimerización y la unión al DNA, respectivamente (Fig. 10)<sup>1, 13</sup>.

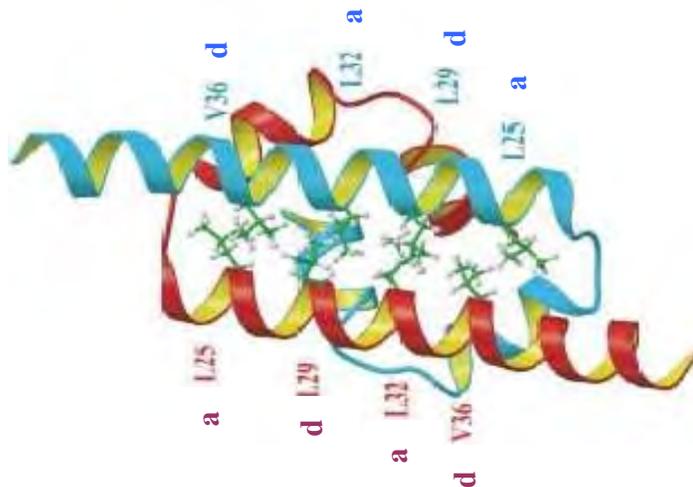
Mediante estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Cristalografía de Rayos X, se determinó la estructura de la región N-terminal de H-NS (residuos 1-64 y 1-46, respectivamente). Esta región es importante para estabilizar a las proteínas a través de interacciones proteína-proteína y está involucrada en la

formación de dímeros gracias a la presencia de una estructura secundaria tipo “coiled-coil”, que abarca los residuos de aminoácidos 22 a 46 (Fig. 11)<sup>6, 15, 44</sup>.



**Figura 10.** Esquema de los dominios funcionales de H-NS. Los residuos de aminoácidos 1-64 componen el dominio de dimerización, los residuos de aminoácidos 65-90 corresponden a la región conectora y los residuos de aminoácidos 91-137 componen el dominio de unión al DNA.

Los dominios “coiled coil” (Fig. 11) se componen de un haz de una o más  $\alpha$ -hélices anfipáticas de giro a la derecha y conforman un elemento estructural responsable de mediar interacciones proteína-proteína<sup>31</sup>. Los dominios “coiled coil” llevan a cabo una gran variedad de funciones, que van desde el ensamblaje de complejos macromoleculares (p. e. los SSTT) hasta el reconocimiento molecular (p. e. las chaperonas)<sup>31</sup>. Así mismo, la orientación de los dominios “coiled coil” puede ser paralela (H-NS de *Salmonella typhimurium*) o antiparalela (H-NS de *E. coli* y VicH de *Vibrio cholerae*) y tiene que ver con diferencias en la función de las diversas proteínas tipo H-NS<sup>6, 9, 15, 31, 44, 45</sup>.



**Figura 11.** Estructura del N-terminal de la proteína H-NS. Vista superior de la héptada repetida. Las letras y números indican los aminoácidos que componen el núcleo hidrofóbico del “coiled coil” (modificado de Rimsky, 2004<sup>45</sup>).

La secuencia de aminoácidos que definen al dominio “coiled coil” consiste de un patrón de siete residuos repetidos, llamado la héptada repetida (Fig. 11), donde las siete posiciones se representan como (a-b-c-d-e-f-g)<sub>n</sub> o con números del uno al siete. Los residuos en las posiciones a y d son hidrofóbicos y forman un núcleo en el centro del haz de hélices<sup>31</sup>. La orientación de las hélices es determinada principalmente por interacciones iónicas y polares entre residuos que flanquean el

núcleo hidrofóbico. Las interacciones electrostáticas entre los residuos de aminoácidos cargados de las posiciones e y g de hélices opuestas, proveen un balance de fuerzas de atracción y repulsión a través de la interfase hidrofóbica definiendo en gran parte, la estabilidad de las asociaciones hélice-hélice<sup>29, 31</sup>. Así mismo, la homo- o heterodimerización de hélices en un "coiled coil" depende en parte de las interacciones entre residuos de aminoácidos que flanquean el núcleo de aminoácidos hidrofóbicos. Por otra parte, el lugar que ocupan determinados residuos de aminoácidos en las diferentes posiciones clave en la héptada repetida, determina la unidad mínima de asociación proteína-proteína, tal como dímero, trímero o tetramero<sup>31</sup>.

El N-terminal de H-NS (residuos 1-64) contiene 3 segmentos de hélice: H1, H2 y H3. La H3 (residuos 22-46) contiene el dominio "coiled coil" responsable de la dimerización, mientras que la H1 y la H2 se encargan de estabilizarlo encerrando a la superficie hidrofóbica mediante contactos intra- e inter-moleculares en el núcleo del "coiled coil"<sup>15</sup>. Se ha demostrado que el complejo mínimo formado por H-NS en solución a través del "coiled coil" es un tetramero y dicha unidad es biológicamente activa<sup>44</sup>.

También se predijo mediante RMN la estructura tridimensional de un fragmento de H-NS correspondiente al extremo C-terminal (residuos 91- 137), el cual contiene el dominio de unión al DNA<sup>49, 51, 52</sup>. El extremo C-terminal se compone de una hoja plegada  $\beta$  (residuos 96-109), una  $\alpha$ -hélice (residuos 118-127) y una pequeña hélice de tipo  $3_{10}$  (residuos 130-134); todas estas estructuras forman un centro hidrofóbico en el C-terminal<sup>51, 52</sup>. Dicho centro hidrofóbico se compone de las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos Y97, Y99, W109, V118, I119 y F133 y es un elemento estabilizador de la estructura plegada de la región C-terminal. Es importante mencionar que tales aminoácidos están conservados en muchas de las proteínas tipo H-NS, lo cual indica que son importantes para la unión al DNA, en particular, las asas formadas por los residuos 90-95 y 110-115, que se propone están involucradas en la unión al DNA<sup>13, 51, 52</sup>.

Diversos análisis han arrojado información interesante acerca del papel de los dominios de H-NS en su función como represor de la expresión génica<sup>6, 15, 40, 44, 49, 51, 52, 56, 58</sup>. Por medio de mutagénesis al azar y sitio-dirigida, se demostró que cambios puntuales a lo largo de toda la secuencia de aminoácidos de la proteína, específicamente dentro del dominio "coiled coil" o del dominio de unión al DNA, afectan la estructura y función de H-NS<sup>6, 15, 40, 44, 49, 51, 52, 56, 58</sup>. Se sabe que mutaciones dentro de los primeros 15 residuos de aminoácidos de H-NS afectan su capacidad de represión. Por ejemplo, una sustitución en el residuo de arginina 12 a cisteína, altera el plegamiento de la H2 (Fig. 12), afectando la capacidad de H-NS de reprimir la expresión de sus genes blanco. Esto es debido a que se requiere de la integridad de los aminoácidos de la H2 para que se lleve a cabo la oligomerización. También mutaciones en los residuos leucina 25, leucina 29 y alanina 46, afectan el



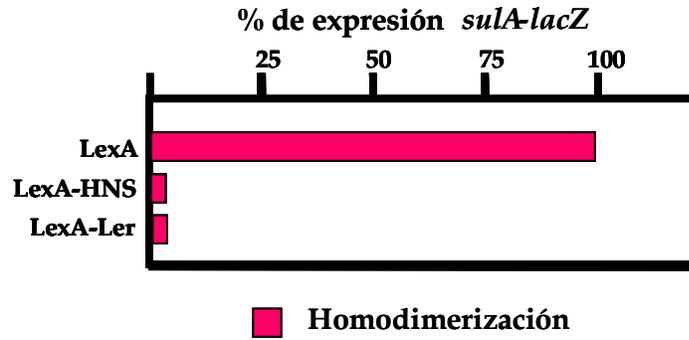
flexible, provee de una interfase de interacción que permite la asociación dímero-dímero y la posterior oligomerización de H-NS a lo largo de la secuencia del DNA blanco<sup>6, 15, 56</sup>. Un reporte reciente propone que la región conectora está involucrada en la oligomerización y que dicha función se requiere para la represión. En este mismo reporte, se propone que mutaciones en el C-terminal también afectan la capacidad de dimerización de H-NS, lo cual no se ha observado *in vitro*<sup>56</sup>.

Aunque los dominios de dimerización y de unión al DNA de H-NS son funcionalmente independientes, ambos se requieren para la función correcta de H-NS<sup>6, 56</sup>. Por ejemplo, versiones de H-NS conteniendo sólo la porción C-terminal pueden unirse al DNA pero con mucha menor afinidad<sup>51, 52, 56</sup>. Del mismo modo, mutaciones en el dominio de dimerización también tienen un efecto en la capacidad de H-NS de unirse al DNA<sup>6</sup>.

### **Ler: ¿dominios funcionales?**

Como ya se describió anteriormente, Ler es capaz de unirse al DNA mediante su dominio de unión al DNA ubicado en su extremo C-terminal y dicha región guarda homología con el dominio de unión al DNA de H-NS (Fig. 12). Por otro lado, en el laboratorio del Dr. José Luis Puente, utilizando el sistema de dos híbridos en bacterias basado en la proteína LexA, se demostró que Ler interactúa consigo misma formando dímeros, pero no interactúa con H-NS (Fig. 13). Un análisis de la secuencia de aminoácidos de Ler reveló la presencia de una estructura secundaria tipo "coiled coil" en la región N-terminal, que comprende los aminoácidos 19 a 46. Se ha reportado que mutaciones que cambian los residuos de isoleucina 26 y leucina 29 por arginina, afectan la capacidad de Ler de inducir la transcripción de una fusión transcripcional *LEE2::lacZ*<sup>55</sup>. Así mismo, la mutación L29R afectó drásticamente la capacidad de Ler de reprimir la transcripción de su propio promotor, al ser incapaz de unirse a la región reguladora del gen *ler*<sup>4</sup>. Sin embargo, no se ha demostrado directamente si las mutaciones evaluadas afectaron la capacidad de dimerización de Ler y si es debido a ello que se afectó su función.

Así, al igual que para H-NS, los posibles dominios de dimerización y de unión al DNA de Ler, parecen ser importantes para su función. A pesar de esto, dichos dominios no han sido caracterizados en detalle. La caracterización de los dominios funcionales de Ler nos permitirá entender mejor el mecanismo molecular por el cual esta proteína regula positivamente la expresión de los genes *LEE* y, particularmente, cómo antagoniza la función de H-NS.



**Figura 13.** Homodimerización de Ler y H-NS. El dominio N-terminal de unión al DNA de la proteína LexA no es capaz, por sí solo, de reprimir la expresión de la fusión transcripcional *sulA-lacZ*. Cuando las proteínas Ler o H-NS se fusionan al dominio de unión al DNA de LexA, restauran la capacidad de esta proteína de reprimir la expresión de la fusión *sulA-lacZ*, indicando que tanto H-NS como Ler homodimerizan (Bustamante *et al.*, datos no publicados).

## HIPÓTESIS

Los dominios de dimerización y de unión al DNA de Ler, son importantes para la función de Ler como antagonista de H-NS en la regulación de los genes *LEE*.

## OBJETIVOS

### ⇒ General:

- Estudiar los mecanismos de regulación de los factores de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC).

### ⇒ Particular:

- Caracterizar los dominios funcionales de Ler, el regulador transcripcional positivo de los genes de virulencia de EPEC.

### ⇒ Experimentales:

- Generar mutaciones puntuales en los dominios de dimerización y unión al DNA de Ler de EPEC.
- Evaluar el efecto de mutaciones puntuales en la función de la proteína Ler, determinando su capacidad para inducir la expresión de una fusión *LEE2-cat* en la cepa de *E. coli* MC4100 (no patógena).
- Evaluar la capacidad de dimerización de las mutantes de Ler mediante el Sistema de dos Híbridos en bacterias basado en LexA.
- Evaluar la capacidad de unión al DNA de las mutantes de Ler mediante Ensayos de Retardamiento de la Movilidad Electroforética ("EMSA").

## 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), o en 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 NaHCO<sub>3</sub> y 160 µl de piridoxal 25 µg/µl). Cuando se requirió, los medios fueron suplementados con los antibióticos como indica la Tabla 2.

- **Clonación del gen *ler***

Para amplificar el gen *ler*, se empleó como templado DNA cromosomal de la cepa EPEC E2348/69, obtenido mediante lisis celular<sup>2, 47</sup>. Dicho DNA se usó para las siguientes reacciones de PCR.

### Condiciones mutagénicas

En un volumen de reacción de 50 µl se colocaron 10 µl de DNA cromosomal (~10 ng), 1 µl de los oligonucleótidos plerEPBH-F y plerEPSI-R a una concentración de 25 µM (Tabla 3), 8 µl de una mezcla de dNTP's 1.25 mM (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, New England Biolabs), 5 µl de regulador 10 X con MgCl<sub>2</sub> 15 mM, y 0.75 µl de enzima *Taq* polimerasa Expand High Fidelity (3.5 U/µl, Roche), llevado a 50 µl con agua desionizada estéril. Las condiciones para la reacción fueron:

Desnaturalización: 94°C/5 min/1 ciclo	} 30 ciclos
Desnaturalización: 94°C/1 min	
Alineamiento: 60°C/1 min	
Extensión: 70°C/45 seg	
Extensión: 70°C/10 min/1 ciclo	

### Condiciones no mutagénicas

En un volumen de reacción de 50 µl se colocaron las mismas cantidades de los componentes anteriores, pero en esta ocasión se empleó una mezcla de *Taq* polimerasa y *Pfu* polimerasa y para la reacción de amplificación únicamente se disminuyeron los ciclos de alineamiento a 20.

Se verificó el tamaño del producto de PCR sometiendo al DNA a electroforesis en geles de agarosa (BIORAD) 1%, con regulador TAE (Tris-Acetatos-EDTA 0.5 X, pH 8.0) a un voltaje de 80-100 V. El gel se tiñó con bromuro de etidio (0.5 µg/ml), se visualizó en un transiluminador con luz UV de onda corta (AlphaImager) y se fotografió. El producto de PCR fue purificado con el estuche comercial GeneClean II (BIO-101) y digerido con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sst*I (Invitrogen), junto con el vector de clonación pMPM-T3.

**Tabla 1.** Cepas bacterianas y plásmidos empleados en este trabajo

Cepa	Características	Referencia
E2348/69 MC4100	Cepa EPEC O127:H6 prototípica; Nal <sup>R</sup> Cepa <i>E. coli</i> no patogénica; S <sup>R</sup> <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Levine <i>et al.</i> , 1978 Laboratorio
SU101	<i>JL1434 (lexA71::Tn5) sulA211 Δlac/F/lacIqlac2DM15</i> ; cepa de <i>E. coli</i> utilizada para la detección de homodimerización en el sistema LexA. Contiene dos operadores silvestres río arriba de la fusión cromosomal <i>sulA-lacZ</i>	Dmitrova <i>et al.</i> , 1998 <sup>12</sup>
Plásmidos	Características	Referencia
pMPM-T3	Derivado del pBKS-II; Tc <sup>R</sup>	Laboratorio
pTEP-Ler	Derivado del pMPM-T3; expresa la proteína Ler silvestre bajo el control del promotor <i>lac</i>	Este trabajo
pTEP-LerN8S	Derivado del pMPM-T3; expresa la proteína LerN8S	Este trabajo
pTEP-LerT11A	Derivado del pMPM-T3; expresa la proteína LerT11A	Este trabajo
pTEP-LerL29P	Derivado del pMPM-T3; expresa la proteína LerL29P	Este trabajo
pTEP-LerQ30P	Derivado del pMPM-T3; expresa la proteína LerQ30P	Este trabajo
pTEP-LerK34R	Derivado del pMPM-T3; expresa la proteína LerK34R	Este trabajo
pTEP-LerL36P	Derivado del pMPM-T3; expresa la proteína LerL36P	
pTEP-LerI48T	Derivado del pMPM-T3; expresa la proteína LerI48T	Este trabajo
pTEP-LerT53P	Derivado del pMPM-T3; expresa la proteína LerT53P	Este trabajo
pTEP-LerI57T	Derivado del pMPM-T3; expresa la proteína LerI57T	Este trabajo
pTEP-LerE61G	Derivado del pMPM-T3; expresa la proteína LerE61G	Este trabajo
pTEP-LerL62P	Derivado del pMPM-T3; expresa la proteína LerL62P	Este trabajo
pTEP-LerY83A	Derivado del pMPM-T3; expresa la proteína LerY83A	Este trabajo
pTEP-LerW91A	Derivado del pMPM-T3; expresa la proteína LerW91A	Este trabajo
pTEP-LerK102E	Derivado del pMPM-T3; expresa la proteína LerK102E	Este trabajo
pTEP-LerA104T	Derivado del pMPM-T3; expresa la proteína LerA104T	
pTEP-LerK111E	Derivado del pMPM-T3; expresa la proteína LerK111E	Este trabajo
pTEP-LerL115H	Derivado del pMPM-T3; expresa la proteína LerL115H	Este trabajo
pTEP-LerL115P	Derivado del pMPM-T3; expresa la proteína LerL115P	Este trabajo
pMPM-T6Ω	Derivado del pBKS-II; Tc <sup>R</sup>	Laboratorio
pT6-Ler	Derivado del pMPM-T6Ω; expresa la proteína Ler silvestre bajo el control del promotor <i>ara</i>	Este trabajo
pT6-LerN8S	Derivado del pMPM-T6Ω; expresa la proteína LerN8S	Este trabajo
pT6-LerQ30P	Derivado del pMPM-T6Ω; expresa la proteína LerQ30P	Este trabajo
pT6-LerE61G	Derivado del pMPM-T6Ω; expresa la proteína LerE61G	Este trabajo
pT6-LerL62P	Derivado del pMPM-T6Ω; expresa la proteína LerL62P	Este trabajo
pT6-LerY83A	Derivado del pMPM-T6Ω; expresa la proteína LerY83A	Este trabajo
pSR658-A	Derivado de la serie MCS; Tc <sup>R</sup>	Laboratorio
pSR-LerN8S	Derivado del pSR658-A; expresa la proteína LerN8S	Este trabajo
pSR-LerQ30P	Derivado del pSR658-A; expresa la proteína LerQ30P	Este trabajo
pSR-LerI57T	Derivado del pSR658-A; expresa la proteína LerI57T	Este trabajo
pSR-LerE61G	Derivado del pSR658-A; expresa la proteína LerE61G	Este trabajo
pSR-LerL62P	Derivado del pSR658-A; expresa la proteína LerL62P	Este trabajo
pSR-LerY83A	Derivado del pSR658-A; expresa la proteína LerY83A	Este trabajo
pSR-LerW91A	Derivado del pSR658-A; expresa la proteína Ler W91A	Este trabajo
pSR-LerL115H	Derivado del pSR658-A; expresa la proteína LerL115H	Este trabajo
pSR-LerL115P	Derivado del pSR658-A; expresa la proteína LerL115P	Este trabajo

La reacción de ligación usando productos de PCR obtenidos tanto en condiciones mutagénicas como no mutagénicas, consistió en una relación de concentración inserto:vector 3:1, llevada a 20 µl de volumen final con H<sub>2</sub>O desionizada estéril, 0.5 µl de enzima ligasa (Invitrogen, 5 U/µl) y 4 µl del regulador 5 X; la reacción se incubó durante toda la noche a 4°C. La reacción de ligación se purificó por precipitación con 1 µl de glucógeno, llevado a 500 µl de etanol absoluto; esta mezcla se incubó durante 10 min a -20°C y se centrifugó durante 15 min a 14,000 rpm. Se decantó y secó con vacío y temperatura y se resuspendió en agua desionizada estéril para transformar.

**Tabla 2.** Antibióticos empleados en este trabajo.

Antibiótico	Abreviatura	Concentración inicial	Concentración final
Ampicilina	Ap	200 mg/ml	100 µg/ml
Kanamicina	Km	25 mg/ml	30 µg/ml
Ácido nalidíxico	Nal	25 mg/ml	15 µg/ml
Tetraciclina	Tc	12 mg/ml	10 µg/ml
Estreptomina	St	100 mg/ml	100 µg/ml

**Tabla 3.** Lista de oligonucleótidos empleados en este trabajo.

Primers	Secuencia 5' a 3'	Referencia
plerEPBH-F	TAA GGA TCC GGT CGC TAA TAG C	Este trabajo
plerEPSI-R	CTT CGA GCT CAG TTA TCG TTA TC	Este trabajo
Ler157T-F	GAT TAC TTA TTA CAA TAC TAC CTT ACA AGA GCT G	Este trabajo
Ler157T-R	CAG CTC TTG TAA GGT AGT ATT GTA ATA AGT AAT C	Este trabajo
LerY83A-F	CGA AAG GTG TTT ACG CAC GCA ATG AAG AAG GG	Este trabajo
LerY83A-R	CCC TTC TTC ATT GCG TGC GTA AAC ACC TTT CG	Este trabajo
LerW91A-F	GAA GAA GGG CAG ACC GCA TCG GGC GTA GGC CG	Este trabajo
LerW91A-R	CGG CCT ACG CCC GAT GCG GTC TGC CCT TCT TC	Este trabajo
KS	TCG AGG TCG ACG GTA TC	Unidad de Secuenciación de DNA, IBt, UNAM
PMPM3-FW1	GTG CCG TAA AGC ACT AAA TCG G	Bustamante, V.; IBt-UNAM
PMPM3-RV1	CGC TAT CCC CTG AGT TCT GTG G	Bustamante, V.; IBt-UNAM
T6-D2B	TAG CGG ATC CTA CCT GAC GC	Bustamante, V.; IBt-UNAM
SDH-802	GTT GCC GCT GGT AGG TCG TG	Bustamante, V.; IBt-UNAM
Ler-15F	ATA TTA AAG CGG GAT CCG GAG ATT ATT TAT TAT G	Bustamante, V.; IBt-UNAM
Ler-Kpn	GCT CAG GTA CCG TTA TCA TT A	Bustamante, V.; IBt-UNAM
Ler-Nco	TTA AAC CAT GGG GAG ATT ATT T	Bustamante, V.; IBt-UNAM
Ler-His	TAT CAA GCT TAG TGG TGG TGG TGG TGA ATA TTT TTC AGC GGT ATT ATT TC	Bustamante, V.; IBt-UNAM
Ler-Xho	TTT TCT CGA GAA TAT TTT TCA GCG GTA TTA	Bustamante, V.; IBt-UNAM
SepZ-95	CCG ATT GAT TAA GCT TAT TCA T	Bustamante, V.; IBt-UNAM
SepZ-48	CTT CTT TCG AAC TTA TCC TAG GAC TAT AC	Bustamante, V.; IBt-UNAM

- **Electroporación**

Para la transformación con los diferentes plásmidos se prepararon células electrocompetentes como se describe a continuación:

Se inocularon 5 ml de LB con la cepa de interés y los antibióticos correspondientes, durante toda la noche en agitación a 37°C. Al día siguiente, se subcultivó con 200 µl del cultivo, un matraz con 50 ml de LB y los antibióticos correspondientes de la cepa y se incubó en agitación a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una  $DO_{600nm} = 0.6$ . Entonces se obtuvo la pastilla centrifugando todo el cultivo durante 7 min a 7,000 rpm a 4°C.

La pastilla se lavó dos veces con 20 ml de agua tridestilada estéril, centrifugando cada vez como ya se mencionó. Después, la pastilla se lavó dos veces con 20 ml de glicerol 10% y finalmente se resuspendió en 1 ml de glicerol al 10%, haciendo alícuotas de 60 µl de células en tubos Eppendorf de 0.6 ml, los cuales se almacenaron a -70°C hasta su uso.

A 60 µl de células electrocompetentes se le agregaron cantidades variables de DNA, según se tratara de reacciones de ligación o plásmido purificado. La mezcla se colocó en una celda para electroporación, dando un pulso eléctrico (2.5 kV, 25 mF, 5 mseg) en un aparato “*E. coli pulser*” (BIORAD). Las células fueron transferidas a tubos Eppendorf de 1.5 ml con 1 ml de medio SOC (2 g de bacto triptona, 0.5 g de extracto de levadura, 200 µl de NaCl, 250 µl de KCl 1 M, 1 ml de  $MgSO_4$  1 M y 0.36 g de glucosa, aforado a 200 ml con agua desionizada) y recuperadas durante 1-2 horas a 37°C en agitación. Cuando se transformó con la reacción de ligación en donde se empleó el producto de PCR obtenido en condiciones mutagénicas, las células se sembraron en placas de LB con 1.5% de agarosa, IPTG 0.1 mM (Isopropil 1-tio-β-D-galactopiranosido) y el sustrato cromogénico X-Gal 0.2 mM (5-bromo-4-cloro-3-indolil β-D-galactósido), con el antibiótico de selección; en el caso donde se empleó el producto de PCR obtenido en condiciones no mutagénicas, se platearon las células transformantes en placas de LB sin IPTG ni X-Gal. Cuando se transformó con plásmido purificado, se sembró en cajas de LB con 1.5% de agarosa y los antibióticos correspondientes. Las placas se incubaron a 37°C.

- **Purificación de DNA plasmídico**

Para purificar DNA a partir de colonias bacterianas, se empleó la técnica de lisis alcalina<sup>2, 47</sup>; brevemente:

Las colonias se inocularon en 5 ml de LB y los antibióticos correspondientes, durante toda la noche a 37°C y agitación. Al día siguiente se obtuvo la pastilla de 2.5 ml del cultivo, centrifugando durante 3 min a 12,000 rpm en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Las pastillas se resuspendieron con 200 µl de solución 1 (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 8.0), y se incubaron a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente se agregaron 200 µl de solución 2 (NaOH 0.2 N y SDS

1%), se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente por 5 min. Se agregaron 200  $\mu$ l de 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, las muestras se centrifugaron durante 10 min a 12,000 rpm. Los sobrenadantes se transfirieron a tubos Eppendorf nuevos y se les adicionaron 300  $\mu$ l de fenol pH 8.0 (Research Organics) y 150  $\mu$ l de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, se mezcló por inversión y se centrifugó durante 8 min a 12,000 rpm. Se recuperó la fase acuosa, transfiriéndola a tubos Eppendorf nuevos, y se agregó 1 ml de etanol absoluto; se mezcló por inversión y se centrifugó durante 15 min a 12,000 rpm a 4°C. Se tiró el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70%; se centrifugó como en el paso anterior durante 10 min. Se tiró el sobrenadante y se secó el DNA con calor al vacío durante 12 a 15 min. Finalmente se resuspendió el DNA con una solución de RNAsa 1mg/ml.

Cuando se trató de DNA plasmídico para secuenciación, se utilizó el estuche comercial "High Pure Plasmid Isolation Kit" (Roche), siguiendo las indicaciones de la compañía.

- **Secuenciación de DNA**

Para determinar la secuencia nucleotídica de los insertos de *ler*, se cuantificó el DNA plasmídico por absorbancia a 260 nm y las muestras se enviaron a la Unidad de Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

- **Ensayo de actividad CAT**

Para la determinación de la actividad de cloranfenicol acetyl-transferasa (CAT), se realizó lo siguiente:

Se inocularon matraces con 50 ml de LB con la cepa de interés y los antibióticos correspondientes, y se incubaron toda la noche en una incubadora 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 a 4°C, desechando el sobrenadante.

Las pastillas se lavaron con 10 ml de PBS 1 X pH 7.0 (regulador salino de fosfatos), centrifugando durante 5 min a 10,000 rpm. Se ajustó la  $DO_{600nm}$  de los cultivos a 1.0 con PBS 1 X. Con 1 ml del inóculo ajustado, se inocularon 50 ml de medio DMEM suplementado con el antibiótico correspondiente y 1% de LB. Los cultivos se colocaron en la incubadora a 37°C con agitación a 210 rpm.

Cuando los cultivos alcanzaron una  $DO_{600nm} = 1.0$  se tomaron muestras de 1.5 ml, las cuales se centrifugaron durante 5 min a 10,000 rpm a 4°C, se tiró el sobrenadante y las pastillas se lavaron con 900  $\mu$ l de solución TDDT (Tris-HCl 50 mM y Ditiotreitól 30  $\mu$ M), centrifugando durante 2 min a 10,000 rpm a 4°C. Se tiró el sobrenadante y las pastillas se resuspendieron en 500  $\mu$ l de la solución TDDT.

Las suspensiones bacterianas se sonicaron por 3 min en un sonicador “Vibra Cell” (Sonics and Materials, Inc), con pulsos de 9 seg y reposo de 3 seg entre cada pulso. Después las muestras se centrifugaron durante 15 min a 12,000 rpm, se transfirieron los extractos a tubos Eppendorf nuevos y se almacenaron a -20°C.

- **Cuantificación de proteínas y determinación de la actividad específica de CAT**

Para la cuantificación de proteínas, se colocaron por duplicado 10 µl de extracto en microplacas 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 de absorbancia en un lector automatizado de microplacas tipo CERES 900C (Bio-Tek Instruments Inc.) a 562 nm con el programa KC3. Las lecturas obtenidas se extrapolaron a una curva estándar de concentración de proteínas en µg/µl, previamente leída y almacenada en el programa KC3.

Para medir la actividad de CAT, se colocaron por duplicado 5 µl de muestra en las microplacas y se agregaron 200 µl de una mezcla de reacción que contiene DTNB 1 mM (5,5'-ditio-bis-2-ácido nitrobenzoico, Research Organics, Inc.), Acetil-CoA 0.1 mM (Pharmacia Biotech), cloranfenicol 0.1 mM (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, a intervalos de 5 seg durante 5 min, posicionado en el modo de cinética. Las lecturas obtenidas se extrapolan a una curva estándar de actividad CAT (0-2500 U/ml) previamente leída y almacenada en el programa KC3.

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

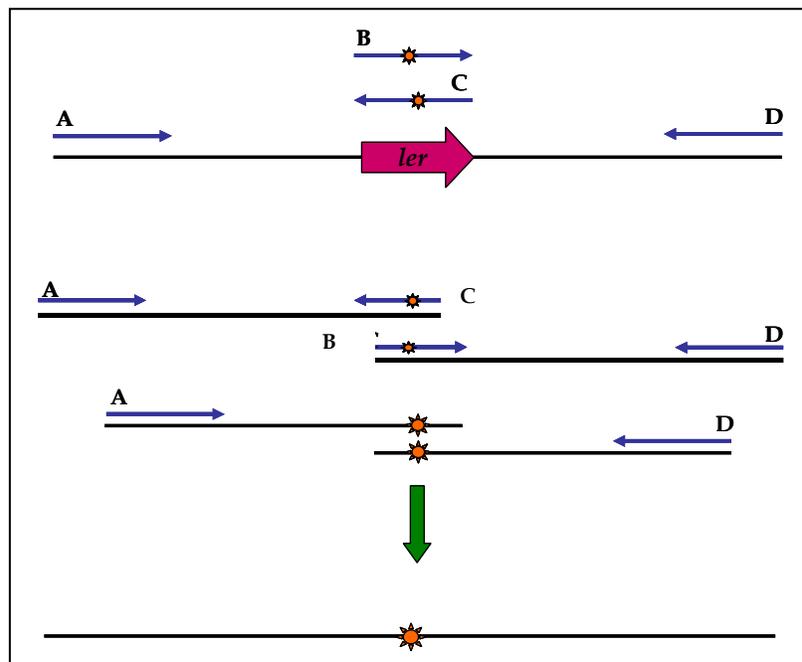
- **Mutagénesis sitio-dirigida**

Para introducir las mutaciones puntuales I57T, Y83A y W91A en *ler*, se siguió la estrategia de mutagénesis sitio-dirigida, usando oligonucleótidos sobrelapados<sup>47</sup>. Brevemente, esta técnica consiste en usar un par de oligonucleótidos sobrelapados que llevan la mutación de interés, además de un par de oligonucleótidos externos al gen. Los oligonucleótidos sobrelapados mutagénicos se construyeron de una longitud de 30 a 33 pares de bases, conteniendo en la parte central el cambio de interés. Cada uno de los oligonucleótidos sobrelapados mutagénicos se usó en una reacción de PCR con el oligonucleótido externo correspondiente, usando como templado el plásmido pTEP-Ler, que contiene el gen *ler* silvestre (Tabla 4).

**Tabla 4.** Pares de oligonucleótidos empleados para introducir las mutaciones puntuales en el gen *ler*.

Mutación	Pares de oligonucleótidos		
	PCR 1		PCR 2
I57T	LerI57T-F/ PMPM3-FW1	LerI57T-R/ PMPM3-RV1	PMPM3-FW1/PMPM3-RV
Y83A	Y83A-F/ PMPM3-FW1	Y83A-R/ PMPM3-RV1	PMPM3-FW1/PMPM3-RV
W91A	W91A-F/ PMPM3-FW1	W91A-R/ PMPM3-RV1	PMPM3-FW1/PMPM3-RV

Cada uno de los productos de PCR resultantes se verificó por tamaño en geles de agarosa y se purificó por el estuche comercial GeneClean. Los productos de PCR purificados se usaron como templados para una segunda PCR, junto con los oligonucleótidos externos a *ler* PMPM3-FW1 y PMPM3-RV1. De esta segunda PCR resultó un fragmento de DNA que presuntamente contiene la mutación de interés.



**Figura 14.** Estrategia para introducir mutaciones sitio-dirigidas en el gen *ler*. El gen se amplifica en dos reacciones separadas, donde cada miembro del par de oligonucleótidos mutagénicos se usa con el miembro correspondiente del par de oligonucleótidos del vector en dos reacciones diferentes de PCR, obteniendo dos productos. Los productos resultantes se usan como templados para la segunda PCR, donde se emplea el par de oligonucleótidos externos para obtener un producto final que se espera contenga la mutación de interés.

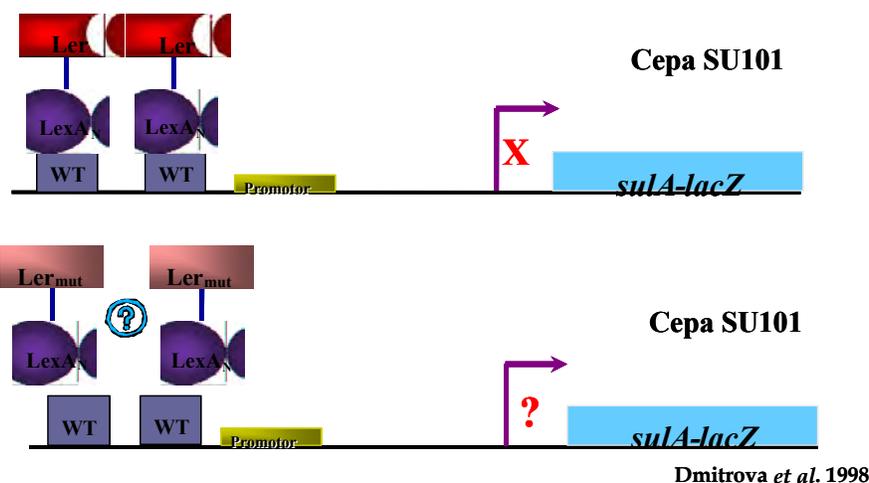
Los productos finales de las reacciones de PCR se verificaron por tamaño en geles de agarosa, se purificaron y se digirieron con las enzimas *Bam*HI y *Sac*I. Posteriormente se ligaron en el vector pMPM-T3, previamente digerido con las mismas enzimas. Se prepararon las reacciones de ligación, que después de precipitarse se emplearon para transformar a la cepa de *E. coli* DH5- $\alpha$ . Se seleccionaron colonias transformantes para extraer DNA plasmídico y una vez

determinando por PCR si llevaban el inserto, éste se mandó a secuenciar para verificar que contuviera la mutación deseada.

- **Ensayo de dimerización de Ler**

Para evaluar la dimerización de Ler se empleó el sistema de dos híbridos en bacterias basado en LexA<sup>12</sup>. La proteína LexA es un represor importante de los genes de la respuesta SOS. LexA consta de un dominio de dimerización ubicado en la región C-terminal y un dominio de unión al DNA ubicado en la región N-terminal; LexA requiere dimerizar para reprimir la expresión de sus genes blanco. El sistema consiste en fusionar la proteína de interés a un fragmento de DNA que codifica únicamente el extremo N-terminal de LexA. Como cepa reportera se emplea la *E. coli* SU101, la cual contiene en el cromosoma una fusión transcripcional *sulA-lacZ*. La versión trunca de LexA es incapaz de reprimir la expresión de *sulA*, ocasionando un incremento en la expresión de la fusión (Fig. 15). Si la proteína de interés fusionada al dominio de unión al DNA de LexA interactúa consigo misma, reestablece la capacidad de LexA de reprimir la expresión de la fusión transcripcional *sulA-lacZ* disminuyendo la expresión de la fusión.

Los insertos de *ler* con mutaciones puntuales contenidos en el vector pMPM-T3 se amplificaron con los oligonucleótidos LerKpnI y Ler15F. Los productos de PCR resultantes se digirieron con las enzimas *Bam*HI y *Kpn*I, después se purificaron y se clonaron en el vector pSR658A, previamente digerido con las enzimas *Bgl*II y *Kpn*I. Los plásmidos recombinantes obtenidos se transformaron en la cepa de *E. coli* SU101. Para evaluar la capacidad de dimerización de las proteínas Ler, se determinó la expresión de la fusión reportera *sulA-lacZ*.



**Figura 15.** Sistema de dos híbridos en bacterias basado en LexA para detectar interacciones proteína-proteína. La proteína de interés es fusionada a la región N-terminal de unión al DNA de LexA, que carece del dominio de dimerización necesario para su función. Sólo si la proteína de interés interactúa consigo misma, el dominio

de unión al DNA de LexA puede unirse a dos regiones operadoras y reprimir la expresión de la fusión reportera *sulA-lacZ* en la cepa *E. coli* SU101.

- **Actividad específica de  $\beta$ -galactosidasa**

Los cultivos bacterianos y las muestras para determinar  $\beta$ -galactosidasa se prepararon y procesaron como se describió para CAT.

Para cuantificar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa se cargaron 20  $\mu$ l de cada muestra por duplicado en microplacas de 96 pozos. Posteriormente se añadieron a cada pozo de la placa 100  $\mu$ l del regulador Z pH 7.0 (fosfato de sodio dibásico 0.06 M, fosfato de sodio monobásico 0.04 M, cloruro de potasio 0.01 M y sulfato de magnesio 0.001 M, para 500 ml). Se añadieron 100  $\mu$ l de una solución de ONPG (orto-nitrofenil- $\delta$ - $\beta$ -galactósido) 1 mg/ml y entonces se procedió a leer la absorbancia a 620 nm en el lector automatizado de microplacas tipo CERES 900C (Bio-Tek Instruments Inc.) con el programa KC3 posicionado en el modo de cinética, y con intervalos de 5 seg durante 5 min. La concentración de proteínas se determinó como para CAT.

La actividad específica de  $\beta$ -galactosidasa se determinó en U/mg de proteína, sustrayendo el valor del blanco del obtenido para la muestra y dividiendo entre la concentración de proteínas totales.

- **Purificación de Ler**

La purificación se llevó a cabo en condiciones desnaturalizantes empleando una columna de cromatografía de afinidad por níquel<sup>2, 47</sup>. Este procedimiento consiste en la unión reversible de la etiqueta de histidinas del C-terminal de la proteína a los iones níquel inmovilizados de una matriz de sefarosa. El procedimiento es como sigue:

Primero se puso un preinóculo en 5 ml de LB con el antibiótico correspondiente, de las cepas de *E. coli* BL21 transformadas con los plásmidos pT6-Ler. Al día siguiente se inocularon por duplicado 100 ml de LB con 1 ml del preinóculo de cada una de las cepas y se crecieron hasta una  $DO_{600\text{ nm}} = 0.6$ , punto en el cual se añadió L-(+)-arabinosa a una concentración final de 0.1%. Los cultivos se incubaron durante cuatro horas más a 37° C a 210 rpm. Terminado el tiempo de inducción se colectaron las pastillas centrifugando los cultivos a 4° C a 10000 rpm durante 5'. Las pastillas fueron resuspendidas en regulador de unión urea 8 M pH 8 y las muestras se sonicaron durante 45 seg 5 veces. Posteriormente se centrifugaron a 10000 rpm durante 20 min a 4°C. El sobrenadante recuperado se filtró por una membrana de 0.22  $\mu$ m (Millipore) y se aplicó a una columna quelante de níquel, cargada con  $NiSO_4$  100 mM y conectada a un sistema de minicromatografía ÄKTA (Amersham Pharmacia Biotech).

Las proteínas son eluidas con un gradiente de pH (pH 8 a 4.5) de regulador de urea. Las fracciones Ler-His<sub>6</sub> se seleccionaron con base a su análisis en geles de poliacrilamida-SDS (dodecil-sulfato de sodio) al 15% y se cargaron en casetes Slyde-A-Lyzer (Pierce) para ser dializadas a 4°C en un regulador que contiene Tris-HCl 50 mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, glicerol 20%, NaCl 0.5 M, Triton X-100 0.1% y cantidades variables de urea (4 M, 1 M, y 0.2 M). Se realizaron tres lavados en cada regulador durante una hora cada uno. La diálisis final se hizo en un buffer de almacenamiento que contiene Tris-HCl 30 mM (pH 7.5), MgCl<sub>2</sub> 10 mM, glicerol 20%, NaCl 240 mM, Triton X-100 0.1% y EDTA 3 mM. La concentración de las proteínas renaturalizadas se determinó mediante el método de Bradford, y posteriormente se alicuotaron y almacenaron a -70°C hasta su uso<sup>2, 47</sup>.

- **Ensayos de Retardamiento de la Movilidad Electroforética (EMSA) de las proteínas Ler**

Una vez que se purificaron las proteínas Ler silvestre y mutantes, se analizaron en su capacidad de unirse al DNA mediante Ensayos de Retardamiento de la Movilidad Electroforética (EMSA). Las reacciones de interacción proteína-DNA se llevaron a cabo usando como sonda el fragmento de DNA denominado LEE2, que contiene la región reguladora de los operones *LEE2-LEE3*, incluyendo los sitios de pegado de Ler y H-NS. Dicho fragmento de DNA se amplificó a partir de un plásmido conteniendo la región intergénica *LEE2* y *LEE3*, abarcando desde el nucleótido +121 hasta el nucleótido -469 respecto al sitio de inicio de la transcripción del operón *LEE2*, usando los oligonucleótidos SepZ-95 y SepZ-48.

El producto de PCR resultante se purificó por GeneClean y se usó para los experimentos subsiguientes. También se amplificó por PCR usando los oligonucleótidos Ler-His y Ler-Xho, un fragmento de DNA correspondiente a la región codificante del gen *ler* para usarse como control negativo, pues se sabe que Ler no interactúa con dicho fragmento.

Se prepararon volúmenes de reacción de 30 µl, colocando 3 µl del regulador de unión 10 X (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetanesulfónico [HEPES] 400 mM, MgCl<sub>2</sub> 80 mM, KCl 500 mM, DTT 10 mM, octilfenolpoli(etilenglicoléter) [NP40] 0.5% y 1 mg de BSA), diferentes concentraciones de proteína, ~ 40 ng del fragmento de DNA LEE2 y del control negativo *ler*. Las reacciones se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente y posteriormente se cargaron en un gel de poliacrilamida al 5%, usando regulador de corrida Tris-Boratos-EDTA 0.5 X. Se aplicó una corriente de 97 V y el gel se tiñó con bromuro de etidio 0.5 µg/ml, se visualizó en un transiluminador con luz UV de onda corta (AlphaImager) y se fotografió.

## RESULTADOS

- **Clonación de *ler* y obtención de mutaciones puntuales en *Ler***

Como primer paso para abordar las estrategias de mutagénesis, se clonó la región codificante del gen *ler* de EPEC en el vector pMPM-T3 (ver Materiales y Métodos). Dicho vector cuenta con un sitio de multiclonación y un casete de resistencia al antibiótico tetraciclina. El gen *ler* se amplificó por PCR usando como templado DNA cromosomal de la cepa prototipo de EPEC E2348/69 y los oligonucleótidos plerEPBH-F (lleva el sitio *Bam*HI en el extremo 5' del gen) y plerEPSI-R (lleva el sitio *Sac*I en el extremo 3' del gen). El fragmento de DNA amplificado, abarcando 59 pb antes del ATG y hasta 39 pb después del codón de paro, se clonó con los sitios *Bam*HI y *Sac*I en la región de multiclonación del vector pMPM-T3. Así, la expresión de *ler* queda bajo el control del promotor *lac* del vector, el cual es inducible por IPTG.

Las reacciones de ligación purificadas se introdujeron por electroporación en la cepa de *E. coli* DH5- $\alpha$  y las células transformadas se platearon en cajas de LB con tetraciclina, así como con IPTG y X-Gal. Para facilitar la selección de plásmidos que llevaran clonado el gen *ler*, nos basamos en el principio de que al introducirse el fragmento de DNA correspondiente a *ler* en el sitio de multiclonación del vector, se interrumpe el gen *lacZ* que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa. Esta enzima degrada el sustrato cromogénico X-Gal, produciendo colonias de color azul. Al interrumpirse el gen *lacZ* no hay producción de enzima y, por lo tanto, las colonias son blancas. De este modo, se seleccionaron algunas colonias blancas para extraer DNA plasmídico. Después de verificar por PCR la presencia del inserto, se seleccionaron dos plásmidos recombinantes para la determinación de la secuencia de nucleótidos de los insertos. Sorpresivamente, en ambos plásmidos se encontró una mutación puntual que generaría un cambio de aminoácido en *Ler*, el cual fue diferente entre los dos plásmidos. Se seleccionaron cinco plásmidos más para secuenciar los insertos, encontrándose nuevas mutaciones puntuales y dobles en *ler*. Estos resultados nos indicaron que en las condiciones empleadas para clonar *ler*, se seleccionaron mutaciones en este gen. Sin embargo, el hecho de que se introdujeran mutaciones puntuales en *ler* nos favoreció, puesto que nuestro objetivo era generar este tipo de mutaciones para analizar su efecto en la función de *Ler* y así, caracterizar los dominios de esta proteína. Entonces, se continuó determinando la secuencia de nucleótidos de los insertos de diferentes plásmidos recombinantes obtenidos en las condiciones en las que se seleccionaron mutaciones en *ler*, hasta que se observó repetición de las mutaciones generadas. De esta forma se obtuvo un banco de 15 plásmidos que contendían al gen con diferentes mutaciones puntuales.

Dados los resultados anteriores decidimos cambiar las condiciones de reacción de la PCR, enzimas y condiciones de selección de los plásmidos recombinantes para clonar el gen *ler* silvestre. Básicamente, cambiamos de la enzima Taq polimerasa Expand High Fidelity (ROCHE) a una mezcla de Taq polimerasa MP y Pfu polimerasa (Altaenzymes). Así mismo, ya no se usó IPTG para la selección de los plásmidos que llevaban clonado el gen. Empleando las nuevas condiciones se logró la clonación del gen *ler* silvestre.

De un total de 15 mutaciones puntuales obtenidas en Ler de forma espontánea, 10 ocurrieron en la región N-terminal (N8S, T11A, L29P, Q30P, K34R, L36P, I48T, T53P, E61G y L62P) y cinco en la región C-terminal (K102E, A104T, K111E, L115H y L115P). De las ocurridas en el extremo N-terminal, dos fueron al inicio de la región (N8S y T11A), cuatro dentro del dominio “coiled coil” predicho (L29P, Q30P, K34R y L36P) y cuatro dentro de la región conectora (I48T, T53P, E61G y L62P). Las mutaciones restantes ocurrieron en el extremo C-terminal, una dentro del dominio de unión al DNA equivalente al descrito para H-NS y predicho de Ler (K102E, Tabla 4) y el resto (A104T, K111E, L115H y L115P) ocurrieron fuera de éste.

Las mutaciones ocurrieron tanto en aminoácidos conservados con respecto a H-NS (L29, L36, L62 y K102, Fig. 16), como en aminoácidos conservados entre las proteínas Ler de diferentes cepas causantes de la lesión A/E de *E. coli* y de *C. rodentium* (L29, K34, L36, I48, T53, E61, L62, K102, A104 y L115, Fig. 16).

Por otro lado, también se introdujeron mutaciones puntuales en otros aminoácidos de Ler que consideramos de interés (I57T, Y83A y W91A) utilizando la estrategia de mutagénesis sitio-dirigida por PCR con oligonucleótidos sobrelapados (ver Materiales y Métodos). La mutación I57T se localiza en la región conectora de Ler y se escogió debido a que ocurre de forma natural en la proteína Ler de la cepa de EHEC 95SF2. Dicha cepa es incapaz de producir las lesiones A/E (Ogierman *et al.*, 2000), por lo tanto, es avirulenta, indicando que Ler no es funcional con esta mutación, pues la complementación con Ler silvestre restaura la virulencia de dicha cepa. Las mutaciones Y83A y W91A se localizan en el extremo C-terminal de Ler, dentro del probable dominio de unión al DNA y se eligieron por tratarse de aminoácidos conservados entre H-NS y las diferentes proteínas Ler. Además, se ha demostrado que en H-NS mutaciones en esos residuos afectan la interacción con el DNA. Los aminoácidos Y83 y W91 se cambiaron a alanina para minimizar el efecto que pudieran tener dichos cambios en la estructura local o global de la proteína. Se obtuvieron los plásmidos recombinantes y se determinó la secuencia nucleotídica de los insertos para corroborar que se introdujo la mutación deseada.



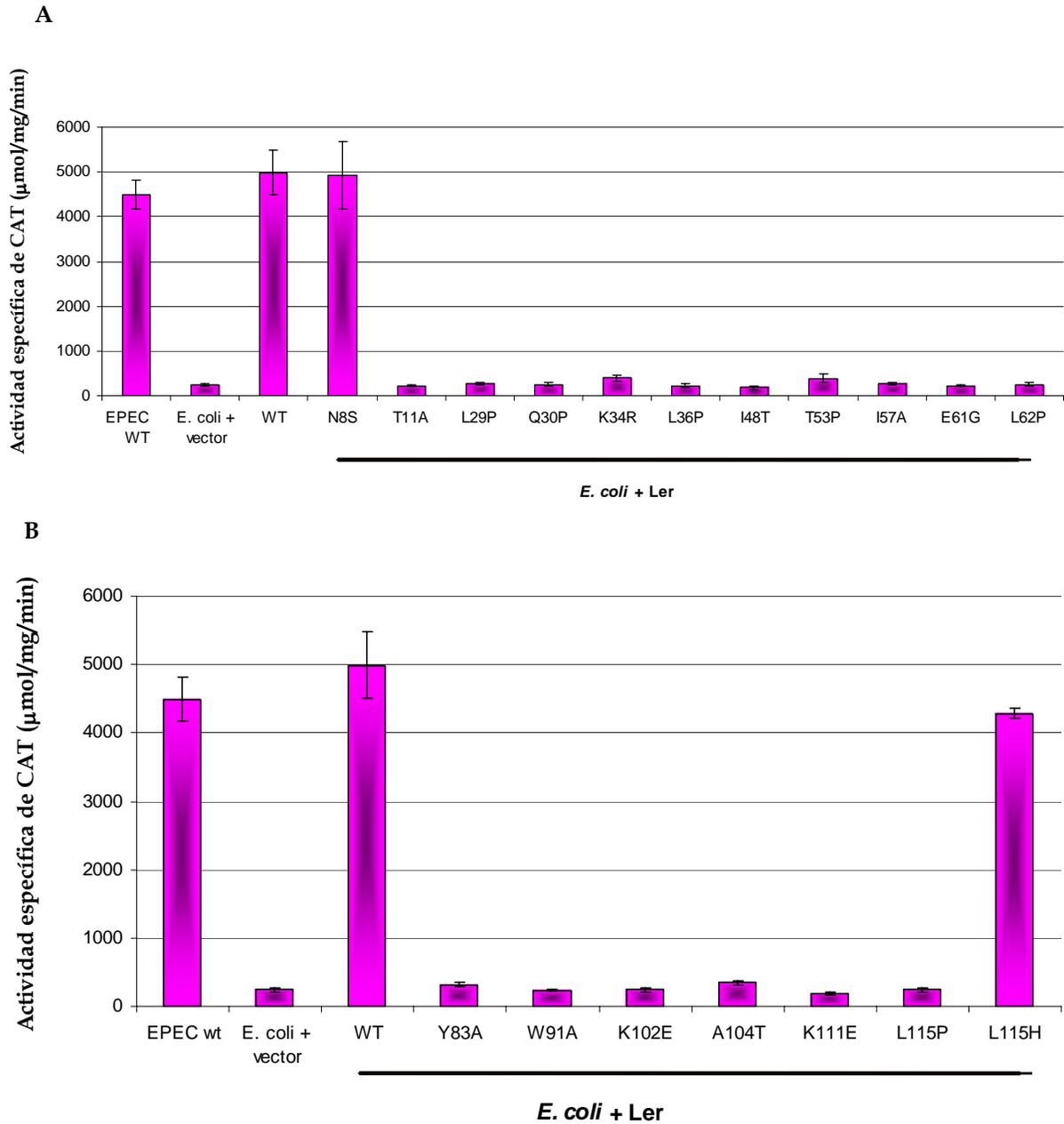
**Tabla 5.** Residuos modificados en las proteínas Ler mutantes, obtenidas tanto al azar como por mutagénesis sitio-dirigida. Se indica la mutación introducida, su localización y su conservación respecto a H-NS o Ler de diferentes cepas causantes de la lesión A/E. Se indica también el efecto de los cambios en la predicción del dominio “coiled coil”.

Mutación	Localización	Observaciones
N8S	En el N-terminal	N está conservado en todas las Ler
T11A	En el N-terminal	T está conservado en todas las Ler; no afecta el “coiled coil”
L29P	Posición d en el “coiled coil” 2	En Ler esta mutación afecta su capacidad de activar una fusión <i>LEE2-lacZ</i> <sup>55</sup>
Q30P	Posición e en el “coiled coil” 2	Q está conservado en todas las Ler; abate el “coiled coil”
K34R	Posición b en el “coiled coil” 3	K está conservado en todas las Ler; abate el “coiled coil”
L36P	Posición d en el “coiled coil” 3	L está conservado en todas las Ler; abate el “coiled coil”
I48T	Región conectora	I está conservado en todas las Ler; abate el “coiled coil”
T53P	Región conectora	T está conservado en todas las Ler; no afecta el “coiled coil”
I57T	Región conectora	I está conservado en todas las Ler; no afecta el “coiled coil”
E61G	Región conectora	E está conservado en todas las Ler; no afecta el “coiled coil”
L62P	Región conectora	L está conservado en todas las Ler y H-NS; no afecta el “coiled coil”
Y83A	Dominio de unión al DNA	Y está conservado en todas las Ler y H-NS
W91A	Dominio de unión al DNA	W está conservado en todas las Ler y H-NS
K102E	Dominio de unión al DNA	K está conservado en todas las Ler y H-NS
A104T	En el C-terminal	A está conservado en todas las Ler y H-NS
K111E	En el C-terminal	K está conservado en todas las Ler
L115H/P	En el C-terminal	L está conservado en todas las Ler y H-NS

Como se observa en la Fig. 17A y B, en la cepa de *E. coli* MC4100 la presencia de Ler silvestre indujo la expresión de la fusión transcripcional *LEE2-cat* a un nivel similar al que se observó en la cepa de EPEC silvestre. En contraste, en presencia del vector, sólo se detectó un nivel basal de expresión de la fusión. Excepto por las mutaciones N8S y L115H, todas afectaron drásticamente la capacidad de Ler de inducir la expresión de la fusión reportera *LEE2-cat*, indicando que los residuos cambiados pueden formar parte de dominios funcionales ubicados en las regiones N-terminal y C-terminal, que son importantes para inducir la expresión de la fusión transcripcional *LEE2-cat*.

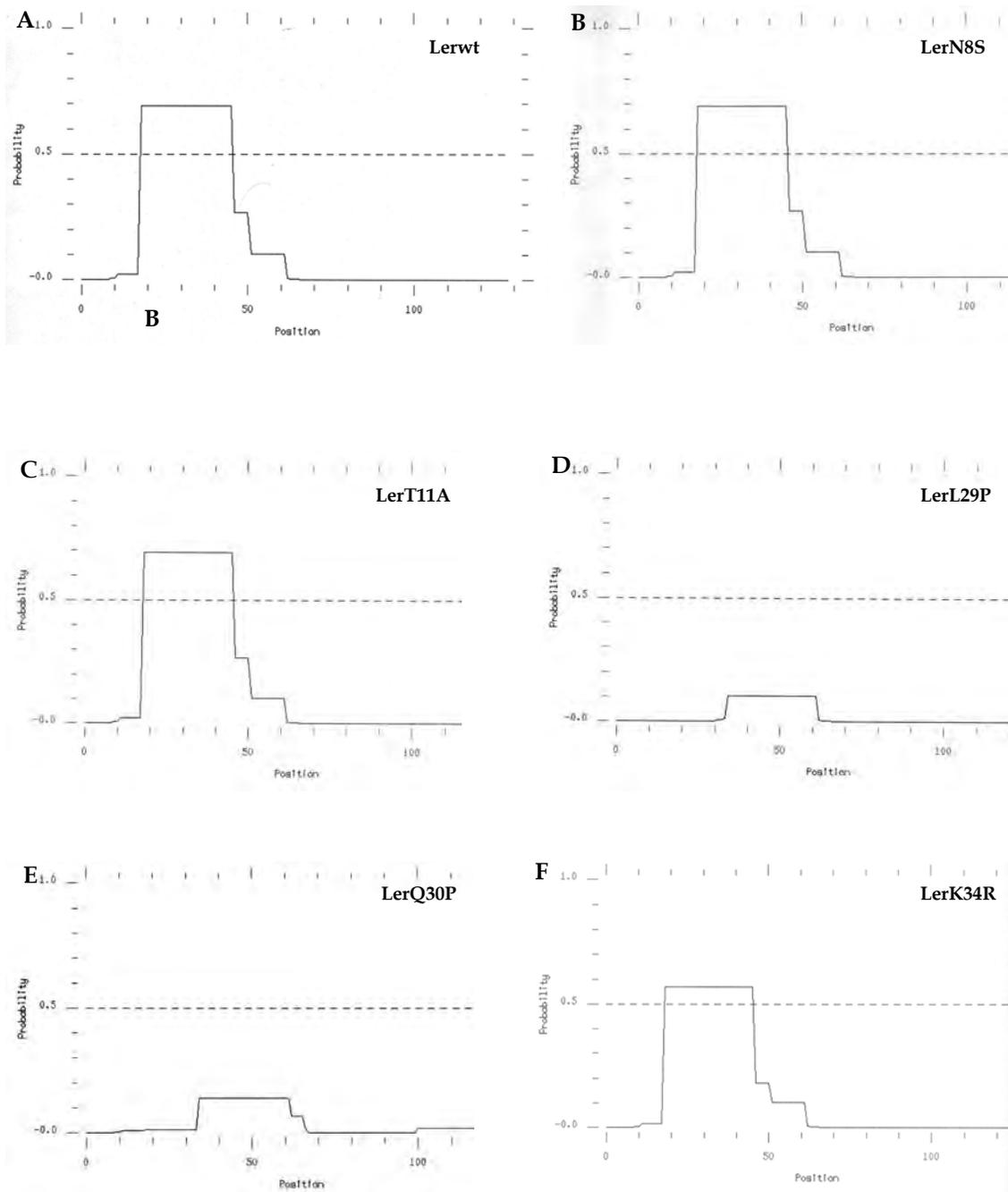
- **Predicción de estructura secundaria tipo “coiled coil” en las proteínas Ler silvestre y mutantes**

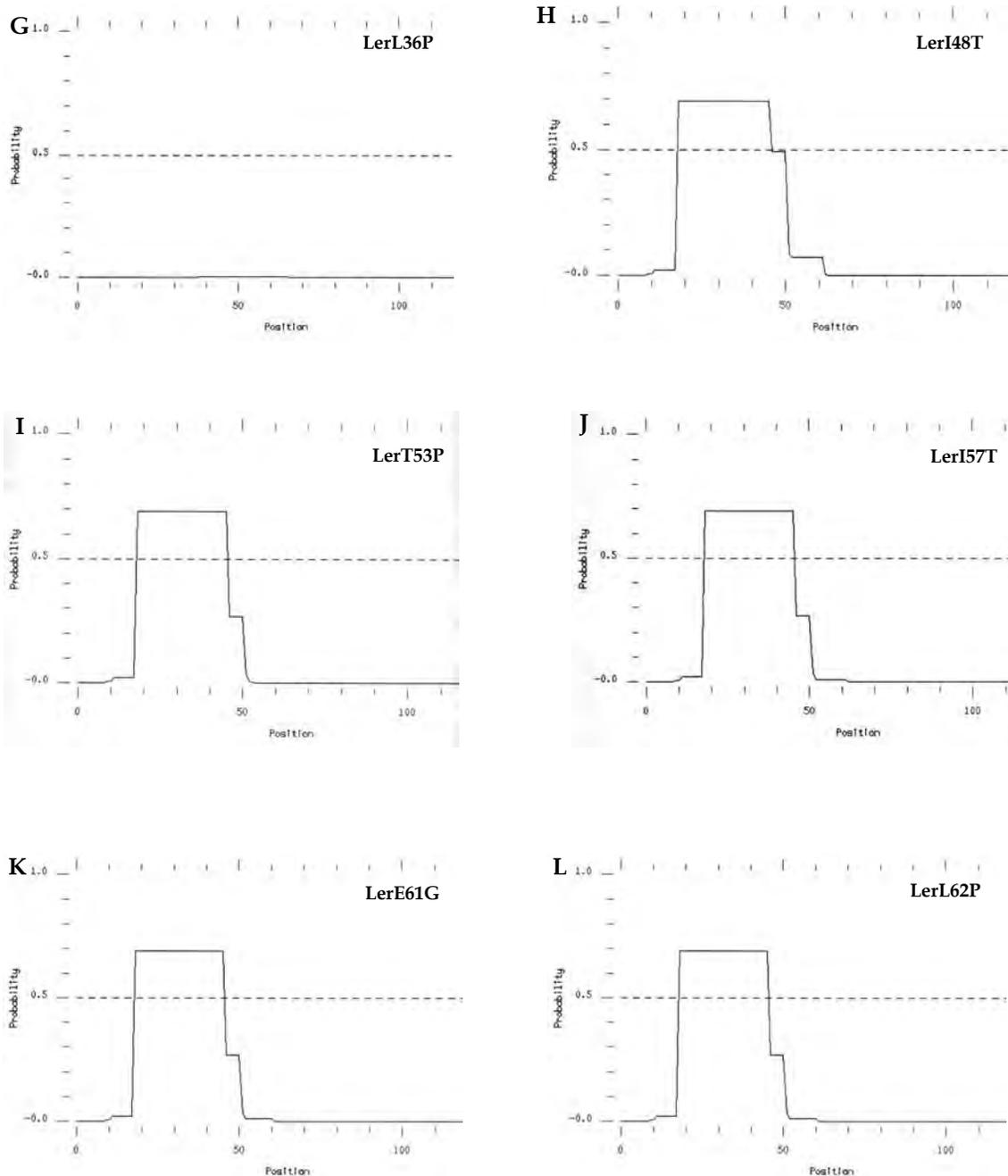
Previamente se reportó la presencia de un dominio “coiled coil” en la región N-terminal de Ler, el cual al mutarse afecta la capacidad de este regulador de inducir la expresión de una fusión transcripcional *LEE2-lacZ*<sup>55</sup>. H-NS contiene un dominio “coiled coil” en su extremo N-terminal, necesario para su dimerización<sup>6, 15, 44, 45, 58</sup>. En otros casos la presencia de este dominio permite las interacciones proteína-proteína<sup>9, 40</sup>. Sin embargo, para Ler no se había demostrado directamente que el dominio “coiled coil” sea responsable de la dimerización.



**Figura 17.** Cambios puntuales a lo largo de la secuencia de aminoácidos de Ler afectan su capacidad de inducir la expresión de la fusión transcripcional *LEE2-cat*. A) Mutaciones en la región N-terminal de Ler. B) Mutaciones en la región C-terminal de Ler. La cepa de *E. coli* K-12 MC4100 conteniendo el plásmido *pLEE2-cat* se transformó con los diferentes plásmidos que codifican para Ler con mutaciones puntuales. Las cepas se crecieron en el medio de cultivo DMEM hasta una  $DO_{600nm} = 1.0$ , se tomaron muestras y se determinó la actividad específica de CAT. Como control positivo, se evaluó la actividad específica de CAT en la cepa silvestre de EPEC E2348/69 transformada con el plásmido *pLEE2-cat*, así como en la cepa de *E. coli* K-12 MC4100 transformada con el plásmido que expresa Ler silvestre y como control negativo en la cepa de *E. coli* K-12 MC4100 transformada con el vector pMPPM-T3. Los datos en las gráficas corresponden al promedio de al menos tres experimentos independientes.

Para determinar si las mutaciones en Ler, sobre todo las localizadas en su extremo N-terminal, afectaban la predicción del dominio “coiled coil” y, por lo tanto, pudieran afectar su dimerización, se realizó un análisis del efecto de cada mutación en la predicción de estructuras secundarias tipo “coiled coil”. Para esto usamos el programa CoilScan (SeqWeb, Wisconsin Package).





**Figura 18.** Predicción de estructura secundaria tipo “coiled coil” en la región N-terminal de Ler. Se realizó un análisis de predicción de estructura secundaria tipo “coiled coil” con el programa CoilScan (SeqWeb, Wisconsin Package) usando la secuencia de aminoácidos de la proteína Ler silvestre de EPEC (A), así como, de las proteínas mutantes LerN8S (B), LerT11A (C), LerL29P (D), LerQ30P (E), LerK34R (F), LerL36P (G), LerI48T (H), LerT53P (I), LerI57T (J), LerE61G (K) y LerL62P (L). Excepto por la mutación K34R, todas las mutaciones ocurridas dentro del “coiled coil” predicho de Ler, afectaron la predicción de dicha estructura secundaria. Por otro lado, mutaciones fuera del dominio “coiled coil” no tuvieron efecto en su predicción.

Este análisis indicó que en la secuencia silvestre de Ler se puede predecir un dominio “coiled coil” que abarca los residuos 19 a 46 (Fig. 18A). La probabilidad

de formación de este dominio permanece intacta al introducir las mutaciones N8S y T11A, ambas ubicadas al inicio de la región N-terminal (Fig. 18B y C), sugiriendo que estos aminoácidos no forman parte de la estructura “coiled coil”. Al analizar las mutaciones L29P, Q30P y L36P, todas ubicadas dentro del dominio “coiled coil” que se predijo, se abate la predicción de dicha estructura (Fig. 18D, E y G). Sin embargo, la mutación K34R también ubicada dentro del dominio “coiled coil”, no tuvo efecto, probablemente debido a que el aminoácido introducido es químicamente similar al original (Fig. 18F). El resto de las mutaciones localizadas dentro de la región N-terminal, específicamente dentro de la región conectora (I48T, T53P, I57T, E61G y L62P), no tuvieron ningún efecto en la predicción de la estructura “coiled coil” (Fig. 18H, I, J, K y L). Tampoco las mutaciones localizadas en la región C-terminal (Y83A, W91A, K102E, A104T, K111E, L115H y L115P) tuvieron efecto en la predicción del dominio “coiled coil”, sugiriendo que la formación de éste, es independiente de la región C-terminal.

Estos resultados sugieren que las mutaciones L29P, Q30P y L36P afectaron la función de Ler debido a que alteran la formación del dominio “coiled coil” y, por lo tanto, podrían afectar la dimerización. Por otro lado, nuestros resultados revelan que residuos en la región N-terminal de Ler pero localizados fuera del dominio “coiled coil” predicho, también son importantes para la función de este regulador.

- **Selección de mutantes en Ler para la caracterización de su capacidad de dimerización y unión al DNA**

Como un primer análisis para determinar el efecto de las mutaciones obtenidas en la capacidad de dimerización y unión al DNA de Ler, seleccionamos un grupo representativo de mutantes para su posterior caracterización en torno a estas funciones.

Del extremo N-terminal se eligió la mutante LerN8S, la cual mantuvo la capacidad de inducir la expresión de la fusión *LEE2-cat*, por lo que esperábamos que se comportara como la proteína Ler silvestre, sirviendo como un control positivo para el análisis de las demás funciones.

En el dominio “coiled coil” se seleccionó la mutante LerQ30P debido a que dicho cambio abatió la predicción del dominio y podría afectar la dimerización, pero probablemente no la capacidad de unión al DNA.

De la región conectora se eligieron las mutantes LerE61G y LerL62P, ambas posiciones ocupadas por residuos conservados entre las proteínas Ler. Analizar la capacidad de dimerización de las proteínas con mutaciones en la región conectora nos ayudaría a determinar si dicha región también juega un papel en dicha función, aunque no forme parte del dominio “coiled coil” predicho, así como su importancia para la unión al DNA.

Por otro lado, en el extremo C-terminal se escogió la mutante LerY83A, debido a que el aminoácido de la posición correspondiente en H-NS es crucial para la

unión al DNA. De este modo, es probable que la mutante Y83A esté afectada en la capacidad de unirse al DNA, pero no en su capacidad de dimerización.

Otras mutantes únicamente se evaluaron en su capacidad de dimerizar. La mutante LerI57T, con un cambio en la región conectora que no afectó la predicción del dominio “coiled coil”, sí estuvo afectada en la capacidad de inducir la expresión de la fusión transcripcional *LEE2-cat*. Así mismo, las mutantes LerW91A, LerL115H y LerL115P, correspondientes al extremo C-terminal, se esperaba que no estuvieran afectadas en su capacidad de dimerización, aunque en Ler dicha función pudiera depender de un dominio diferente al que requiere H-NS. De estas últimas mutantes, LerW91A y LerL115P no indujeron la expresión de la fusión *LEE2-cat*, pero LerL115H sí (Fig. 17B).

- **Ensayo de dimerización de las proteínas Ler mutantes**

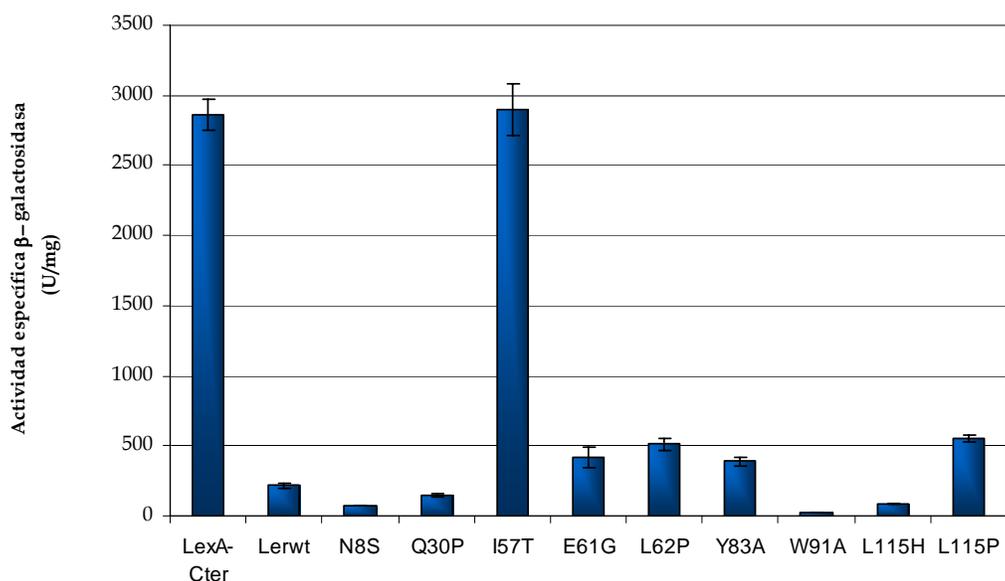
La capacidad de dimerización de las proteínas mutantes seleccionadas se determinó mediante el sistema de dos híbridos bacteriano basado en el regulador transcripcional LexA<sup>12</sup>. Resultados previos de nuestro laboratorio habían mostrado que la capacidad de dimerización de Ler puede ser monitoreada mediante este sistema (Bustamante *et al.*, datos no publicados).

Para la realización de este experimento se clonaron los insertos que contienen el gen silvestre y mutantes de *ler* en el vector pSR658A, el cual codifica para la región N-terminal de LexA, de manera que se expresara la proteína Ler fusionada al dominio de unión al DNA de LexA. Como cepa reportera se empleó la cepa de *E. coli* SU101, la cual contiene una fusión cromosomal *sulA-lacZ*. El gen *sulA* es reprimido fuertemente por la proteína LexA silvestre, pero no por la proteína que carece del dominio de dimerización. Si la proteína que se fusiona al dominio de unión al DNA de LexA es capaz de dimerizar, permite que esta proteína de fusión reprima la expresión de la fusión *sulA-lacZ*.

Se transformó la cepa de *E. coli* SU101 con los plásmidos que codifican las proteínas Ler silvestre y las mutantes LerN8S, LerQ30P, LerI57T, LerE61G, LerL62P, LerY83A, LerW91A, LerL115H y LerL115P fusionadas al dominio de unión al DNA de LexA. Las células transformantes se cultivaron en LB y la expresión de las proteínas se indujo con IPTG 1 mM y a una  $DO_{600\text{ nm}} = 1.0$  se tomaron muestras, se procesaron y se determinó la actividad específica de  $\beta$ -galactosidasa.

Como control se evaluó la expresión de la fusión *sulA-lacZ* en presencia del vector pSR658A. Como se observa en la Fig. 19 en la cepa transformada con el vector pSR658A hubo un alto nivel de expresión de la fusión *sulA-lacZ*. En contraste, la proteína Ler silvestre fusionada al dominio de unión al DNA de LexA fue capaz de reprimir la expresión de la fusión *sulA-lacZ* más de 10 veces.

En presencia de la proteína de fusión que contiene la mutación I57T, se obtuvo un nivel de expresión de la fusión reportera *sulA-lacZ* similar al que se obtuvo en presencia del vector pSR658A, indicando que esta mutación afectó drásticamente la capacidad de dimerización de Ler (Fig. 19). En contraste, en presencia de las proteínas de fusión que contienen las mutaciones N8S, Q30P, E61G, L62P, Y83A, W91A, L115H y L115P, la expresión de la fusión *sulA-lacZ* se redujo a un nivel similar al que se observó con la proteína de fusión conteniendo Ler silvestre (10 a 12 veces), indicando que estas mutaciones no afectan, o afectan ligeramente, la capacidad de dimerización de Ler (Fig. 19).



**Figura 19.** Efecto de las mutaciones en las regiones N-terminal y C-terminal de Ler en la dimerización. Se evaluó la expresión de la fusión reportera *sulA-lacZ* en la cepa SU101 en presencia de los plásmidos que codifican las proteínas Ler silvestre y mutantes, fusionadas al extremo N-terminal de LexA. Las cepas se crecieron en medio de cultivo LB, se tomaron muestras a una  $DO_{600nm} = 1.0$ , y se determinó la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Los datos en la gráfica corresponden al promedio de al menos tres experimentos independientes.

Sorprendentemente, la mutación Q30P no tuvo efecto en la dimerización, en contraste con la predicción de estructura secundaria “coiled coil”, donde se abate, así como con el resultado de la Fig. 17A. Este resultado es más sorprendente aún si se compara con lo que se demostró en H-NS, donde cambios a prolina dentro del dominio “coiled coil” abaten la dimerización, pues la prolina es un aminoácido destructor de hélices. Por otro lado, la mutación I57T localizada en la región conectora abatió la dimerización de Ler, a diferencia de lo que sucedió con las mutaciones E61G y L62P, localizadas también dentro del conector, que no afectaron dicha función ni la predicción del dominio “coiled coil”, aunque sí

afectaron la actividad de Ler (Fig. 17A). Estos resultados sugieren que Ler posee estructuras secundarias alternativas que le permiten la dimerización, o que la mutante LerQ30P adquiere una característica que se lo permite. Así mismo, el conector parece importante para la dimerización, aunque no todos los residuos localizados en esa zona. Sin embargo, las mutaciones L29P, K34R y L36P, que afectaron la predicción del dominio “coiled coil”, afectaron la función de Ler, aunque queda por determinar si afectaron la dimerización.

Por otro lado, mutaciones en la región C-terminal (LerY83A, LerW91A, LerL115H y LerL115P) no afectaron la dimerización, indicando que el dominio de dimerización funciona de manera independiente al dominio de unión al DNA. Por otro lado, la observación de que la mayoría de las proteínas Ler mutantes fueran capaces de dimerizar, indica que la expresión y estabilidad de Ler no se ve afectada por las mutaciones evaluadas.

- **Purificación de las proteínas Ler silvestre y mutantes y ensayos de unión al DNA (“EMSA’s)**

La capacidad de unión al DNA de la proteína Ler silvestre y sus derivadas mutantes se determinó mediante ensayos de retardamiento en gel utilizando proteínas Ler purificadas y la región reguladora del operón *LEE2*.

Para la purificación de las proteínas, se amplificaron por PCR los fragmentos de DNA que contienen los genes *ler* silvestre y mutantes y se clonaron en el vector pMPM-T6Ω. Se introdujeron seis codones que codifican para histidina en el extremo 3' del gen *ler* durante la PCR. Así, los plásmidos obtenidos permitieron la expresión de las proteínas Ler silvestre y mutantes con una fusión de seis histidinas en su extremo C-terminal bajo el control del promotor *ara* del vector. Las proteínas Ler se expresaron en la cepa de *E. coli* BL21 y se purificaron mediante una columna de afinidad a níquel (ver Materiales y Métodos). Las proteínas mutantes de las cuales se evaluó su capacidad de unión al DNA fueron: LerN8S, LerQ30P, LerE61G, LerL62P y LerY83A.

En los experimentos tipo (EMSA’s) se empleó un fragmento de DNA que contiene la región reguladora del operón *LEE2* (fragmento *LEE2*), con el cual se ha demostrado previamente que Ler interactúa. Como control negativo se empleó un fragmento de DNA correspondiente al gen estructural *ler* (fragmento *ler*), con el cual se sabe que Ler no interactúa. Ambos fragmentos de DNA fueron obtenidos por PCR, se purificaron y posteriormente se usaron para los ensayos.

Por experiencia en el laboratorio, sabemos que hay ligeras variaciones de experimento a experimento en el comportamiento de la unión de Ler silvestre al DNA, ya sea por condiciones de incubación o incluso la edad de la proteína purificada, por lo que para cada mutante se comparó en paralelo la interacción de Ler silvestre con el mismo fragmento de DNA. El carril uno corresponde en todos

los experimentos a la reacción control, en la cual se incubó el DNA en ausencia de proteína. Además, de acuerdo a los resultados que obteníamos, para algunas mutantes se suprimieron las primeras concentraciones de proteína y se aumentaron otras.

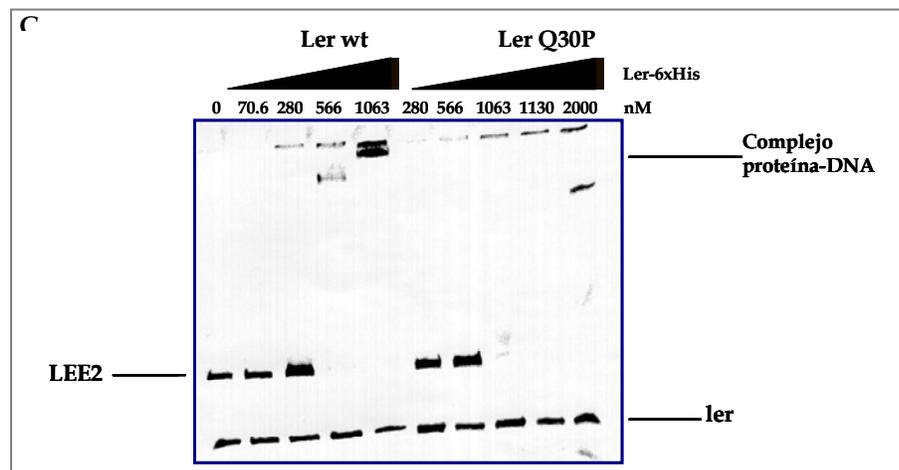
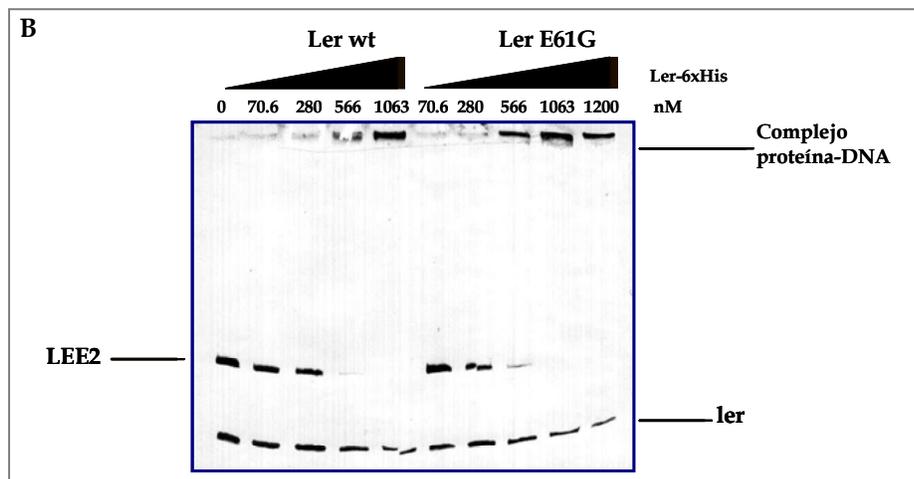
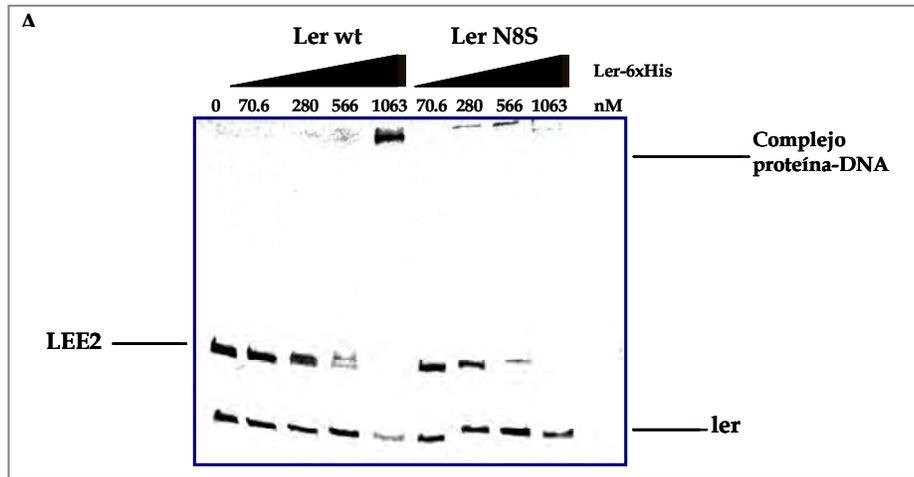
En la Fig. 20A, se muestra la comparación de la unión al DNA de la proteína Ler silvestre y la mutante LerN8S. A una concentración de 566 nM ambas proteínas retardaron casi todo el fragmento LEE2 (Fig. 20A). En contraste, a la misma concentración ninguna de las proteínas retardó el fragmento ler. Esto indica que ambas proteínas interactúan específicamente con la región reguladora del operón *LEE2* y con afinidades similares. El complejo proteína-DNA formado por la proteína silvestre se detecta en la parte superior del gel; sin embargo, este complejo no se detectó para la mutante LerN8S. Es importante mencionar que debido a que Ler tiende a formar complejos grandes proteína-DNA, en ocasiones éstos no logran entrar al gel y, por lo tanto, no se detectan. Por otro lado, a una concentración de 1063 nM ambas proteínas retardaron por completo el fragmento LEE2. Sin embargo, a esta concentración, la proteína Ler silvestre también comenzó a retardar el fragmento ler.

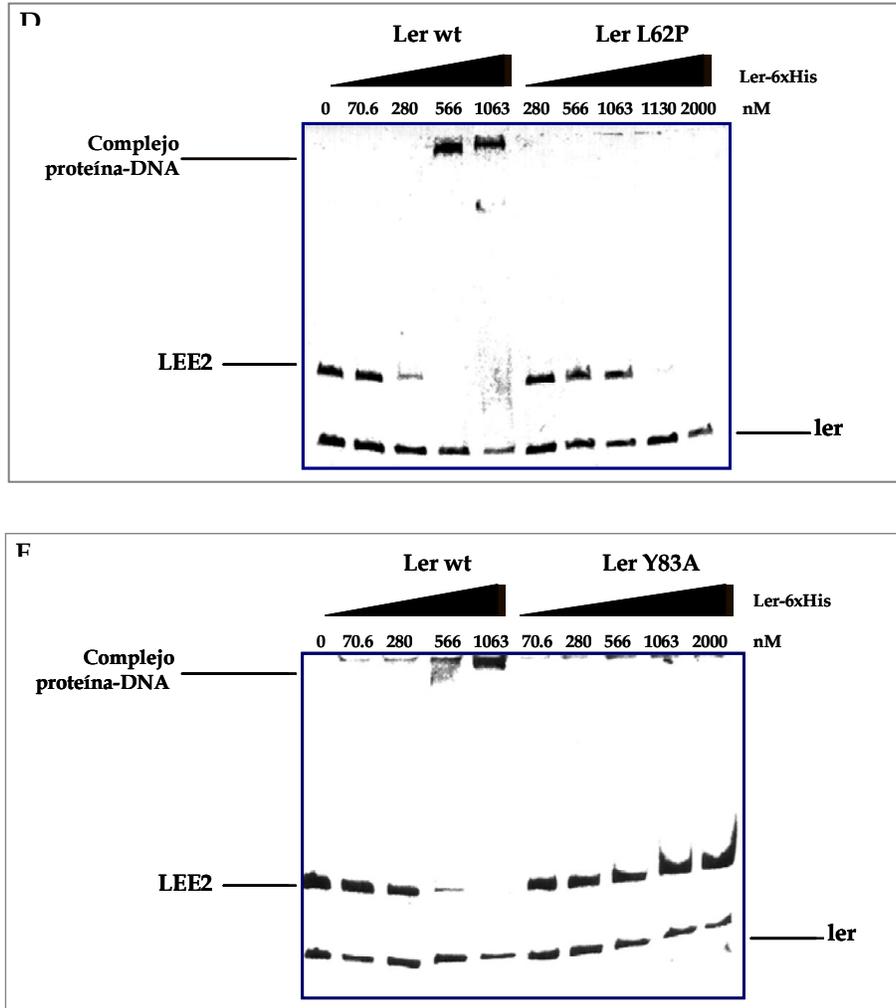
Como esperábamos, estos resultados indican que la mutación N8S no afecta la capacidad de unión al DNA de Ler, como se observó anteriormente al evaluar la dimerización (Fig. 19A) y la capacidad de inducir la expresión de la fusión *LEE2-cat* (Fig. 17). Como ya se mencionó, el objetivo de comparar la capacidad de unión al DNA de la proteína mutante LerN8S con la silvestre fue contar con un control positivo de la reproducibilidad de estos ensayos.

Del mismo modo, se comparó la habilidad de las proteínas Ler silvestre y mutante LerE61G de interactuar con el DNA. Como se observa en la Fig. 20B ambas proteínas se unieron de manera similar al fragmento LEE2, retardándolo a partir de la concentración 566 nM. Así mismo, ninguna de las dos proteínas retardó el fragmento ler. Estos resultados indican que la mutación LerE61G no afectó la afinidad o la forma de interacción de Ler con la región reguladora del operón *LEE2*.

En la Fig. 20C se comparó la habilidad de la proteína Ler silvestre y de la mutante LerQ30P de interactuar con el DNA. A una concentración de 566 nM, la proteína Ler silvestre fue capaz de retardar todo el fragmento LEE2, en este caso, observándose un complejo proteína-DNA en la parte superior del gel. En contraste, a la misma concentración de proteína, la mutante LerQ30P retardó dicho fragmento pero no se observaron complejos proteína-DNA, sugiriendo que la mutación afectó su afinidad por el DNA (Fig. 20C). Puesto que a una concentración de 1063 nM la proteína Ler silvestre formó un complejo proteína-DNA más grande al formado a la concentración anterior, se propone que existe más de un sitio de unión de Ler en el fragmento LEE2 y/o que, una vez unido al DNA, Ler puede

multimerizar a través de interacciones proteína-proteína, formando los complejos mayores proteína-DNA observados en este experimento.





**Figura 20.** Interacción *in vitro* de las proteínas Ler silvestre y mutantes LerN8S (A), LerE61G (B), LerQ30P (C), LerL62P (D) y LerY83A (E) con la región reguladora del operón *LEE2*. Se usó como sonda el fragmento de DNA correspondiente a la región reguladora del operón *LEE2*. Como control negativo se usó un fragmento de DNA correspondiente al gen estructural *ler*. En cada experimento el DNA se mezcló con concentraciones crecientes de Ler silvestre y la correspondiente mutante. Los números arriba de cada carril indican la concentración en nM de proteína usada.

Debido a que la proteína LerQ30P no formó complejos proteína-DNA a las mismas concentraciones que lo hizo la silvestre, se eliminaron algunas y se usaron otras mayores (1130 nM y 2000 nM) para determinar qué tanto afectó la mutación la capacidad de la proteína de unirse al DNA con respecto a la silvestre. A las concentraciones más altas evaluadas, la mutante LerQ30P retardó todo el fragmento LEE2, pero sorprendentemente los complejos proteína-DNA formados fueron más pequeños respecto a los que se formaron con la proteína silvestre (Fig. 20C). Estos resultados sugieren que la mutación Q30P reduce en aproximadamente dos veces la afinidad de Ler por la región reguladora del operón *LEE2*. A todas las concentraciones de proteína utilizadas en este experimento, ni la proteína Ler silvestre ni la mutante LerQ30P retardaron el fragmento *ler*, indicando que sus

interacciones fueron específicamente con el fragmento LEE2. Estos resultados, en conjunto con el análisis de dimerización y predicción del dominio “coiled coil”, sugieren que la mutante LerQ30P podría estar afectada en la oligomerización. Por esta razón los complejos proteína-DNA que formó fueron más pequeños respecto a los formados por la proteína Ler silvestre.

En la Fig. 20D se comparó la habilidad de unión al DNA de la proteína mutante LerL62P con la de la proteína silvestre. En este experimento, se observó retardó del fragmento LEE2 a partir una concentración de 280 nM, observándose los los complejos proteína-DNA en la parte superior del gel, tanto a 566 nM como a 1063 nM. Como para la mutante LerQ30P, se eliminaron algunas concentraciones bajas de proteína y se evaluaron otras. La mutante LerL62P retardó el fragmento LEE2 sólo hasta que se usaron las concentraciones más altas (1130 y 2000 nM), aunque en este caso no se detectaron los complejos proteína-DNA (Fig. 20D). Ninguna de las dos proteínas retardó el fragmento ler, indicando que su interacción fue específicamente con el fragmento LEE2. Estos resultados indican que la mutación L62P reduce en aproximadamente tres veces la afinidad de Ler por la región reguladora del operón *LEE2*.

Finalmente, se comparó la habilidad de unión al DNA de la proteína Ler silvestre y la mutante LerY83A. La proteína Ler silvestre retardó de manera específica el fragmento LEE2 a las concentraciones de 566 nM y 1063 nM, observándose los complejos proteína-DNA en la parte superior del gel (Fig. 20E). En contraste, la proteína LerY83A no retardó el fragmento LEE2 aún a la concentración más alta empleada (2000 nM). De hecho, a esta concentración y a concentraciones mayores, se observó también retardamiento del fragmento ler, indicando que la proteína LerY83A perdió por completo la capacidad de reconocer específicamente su secuencia blanco (Fig. 20E y datos no mostrados). Así, la mutación Y83A abate por completo la capacidad de Ler de unirse a la región reguladora del operón *LEE2*, como era de esperarse debido a que tal mutación se localizó en el dominio predicho de unión al DNA.

La Tabla 6 contiene el resumen de los resultados obtenidos en este trabajo.

**Tabla 6.** Resumen del efecto de los cambios de residuos en las funciones de inducción de la fusión *LEE2-cat*, dimerización y unión al DNA, así como en la predicción de la estructura secundaria "coiled coil" y la localización de cada uno de los cambios.

MUTANTE	UBICACIÓN	INDUCE LA FUSIÓN <i>LEE2-cat</i>	PREDICCIÓN DEL DOMINIO "COILED COIL"	DIMERIZACIÓN	UNIÓN AL DNA
N8S	N-terminal	Sí	No afecta la predicción	Sí	Sí
T11A	N-terminal	No	No afecta la predicción	ND	ND
L29P	"Coiled coil"	No	Abate la predicción	ND	ND
Q30P	"Coiled coil"	No	Abate la predicción	Sí	Sí*
K34R	"Coiled coil"	No	Abate la predicción	ND	ND
L36P	"Coiled coil"	No	Abate la predicción	ND	ND
I48T	Conector	No	No afecta la predicción	ND	ND
T53P	Conector	No	No afecta la predicción	ND	ND
I57T	Conector	No	No afecta la predicción	No	ND
E61G	Conector	No	No afecta la predicción	Sí	Sí
L62P	Conector	No	No afecta la predicción	Sí	Sí
Y83A	Unión al DNA	No	No afecta la predicción	Sí	No
W91A	Unión al DNA	No	No afecta la predicción	Sí	ND
K102E	Unión al DNA	No	No afecta la predicción	ND	ND
A104T	C-terminal	No	No afecta la predicción	ND	ND
K111E	C-terminal	No	No afecta la predicción	ND	ND
L115H	C-terminal	Sí	No afecta la predicción	Sí	ND
L115P	C-terminal	No	No afecta la predicción	Sí	ND

- Esta mutante puede estar afectada en la oligomerización, pues se unió al DNA pero no formó los mismos complejos proteína-DNA que forma la proteína Ler silvestre.
- ND: no determinado.

## DISCUSIÓN

Ler es el regulador positivo central de los genes de virulencia del grupo de patógenos A/E, el cual incluye a EPEC, EHEC y *C. rodentium*. Ler no actúa como un activador clásico, en el sentido de que no activa la expresión de los genes de virulencia, sino que actúa contrarrestando la represión ejercida por H-NS sobre los mismos<sup>7, 23, 55</sup>. Así, más que un activador, Ler es considerado un des-represor<sup>7</sup>. De manera interesante, se ha clasificado a Ler como miembro de la familia de proteínas H-NS/StpA, la cual se compone de proteínas de unión al DNA con parecido a histonas<sup>1, 13, 40, 45</sup>. Particularmente, la región C-terminal de Ler tiene mayor similitud con la región C-terminal de las proteínas de la familia H-NS/StpA; dicha región contiene el dominio de unión al DNA<sup>49, 51, 52, 58</sup>.

En estudios previos se demostró que Ler se une a las regiones reguladoras de sus genes blanco<sup>4, 7, 23, 55</sup>. Además, utilizando un sistema de dos híbridos en bacterias basado en el regulador LexA se demostró que Ler dimeriza (Bustamante *et al.*, datos no publicados). Estos datos sugieren que Ler contiene al menos dos dominios funcionales: el dominio de unión al DNA y el dominio de dimerización. Sin embargo, éstos no se han caracterizado mediante mutagénesis, por lo que en este estudio nos planteamos como objetivo central comenzar la caracterización de los dominios de unión al DNA y dimerización de Ler, así como la identificación de otros posibles dominios funcionales en este regulador. Con este fin, se obtuvieron mediante PCR mutaciones puntuales a lo largo de la secuencia de aminoácidos de la proteína Ler. Así mismo, se determinó el efecto de las mutaciones en las capacidades de Ler de inducir la expresión de una fusión transcripcional reportera (*LEE2-cat*), dimerizar y unirse al DNA.

Durante la clonación de *ler* en el vector pMPM-T3 se generaron y seleccionaron diversas mutaciones puntuales en este gen. Aunque las causas precisas por las cuales se obtuvieron estas mutaciones espontáneas, la mayoría de las cuales generaron proteínas inactivas, no se determinaron, creemos que se debió a que la sobre-expresión de Ler es desfavorable para la bacteria. Dado que la selección de los plásmidos que llevaran clonado a *ler* se hizo en presencia de IPTG, el cual induce la expresión de dicho gen a partir del promotor *lac* del vector, nuestra hipótesis es que Ler a altas concentraciones pudiera tener un efecto global negativo en la expresión genética y que esto afecte el crecimiento de *E. coli*. Debido a esto se recuperaron principalmente plásmidos que en la replicación introdujeron mutaciones en *ler* que generarían una proteína Ler no funcional. Cuando se eliminó el IPTG para la selección de los plásmidos que llevaran clonado *ler*, la obtención de plásmidos conteniendo el gen con mutaciones, se redujo drásticamente.

La generación de las mutaciones espontáneas fue útil para nuestro estudio, ya que precisamente nuestro primer objetivo era la obtención de mutaciones puntuales a lo largo del gen *ler*. Además de las mutaciones obtenidas de forma espontánea, se generaron otras de manera sitio-dirigida. En total se obtuvieron 18 mutaciones puntuales en *Ler*, 11 en la región N-terminal (N8S, T11A, L29P, Q30P, K34R, L36P, I48T, T53P, I57T, E61G y L62P), y siete en la región C-terminal (Y83A, W91A, K102E, A104T, K111E, L115H y L115P).

Para determinar el efecto de estas mutaciones en la actividad de *Ler*, se analizó la capacidad de las proteínas *Ler* silvestre y mutantes de inducir la expresión de una fusión transcripcional *LEE2-cat* en *E. coli* MC4100. La expresión de *Ler* a partir del vector pMPM-T3 (en *E. coli* MC4100) y la expresión de *Ler* a partir del gen cromosomal (en EPEC) inducen la expresión de la fusión *LEE2-cat* a niveles similares (Fig. 17). Esto indica que la transcripción de escape de *ler* a partir del plásmido, esto es, sin inducir la expresión del promotor *lac* con IPTG, genera la expresión de *Ler* a un nivel que permite la expresión óptima de los genes del LEE. Con excepción de las mutaciones N8S y L115H, todas afectaron la función de *Ler* (Fig. 17), sugiriendo la presencia de regiones funcionales tanto en el extremo N-terminal, como en el extremo C-terminal de la proteína.

En el caso de las mutaciones que provocaron un cambio hacia prolina (L29P, Q30P, L36P, T53P, L62P y L115P), es probable que éstas hayan afectado el plegamiento de la región de la proteína donde se localizan<sup>32</sup>. Los cambios de aminoácidos a prolina alteran la estructura secundaria de las proteínas, debido no sólo a su incapacidad de establecer enlaces de hidrógeno, sino también al impedimento estérico en las regiones que rodean a este tipo de mutaciones. Esto se corrobora a partir del efecto diferente que tuvieron las mutaciones en la posición 115 por histidina o prolina. Debido a la naturaleza alifática de la cadena lateral del aminoácido histidina, este aminoácido seguramente no afectó el plegamiento local de la proteína ni las interacciones que tienen lugar dentro de la región donde se localizó esta mutación. Sin embargo, el cambio a prolina en la misma posición afectó drásticamente la capacidad de *Ler* de inducir la expresión de la fusión *LEE2-cat* (Fig. 17), sugiriendo un efecto en la estructura local de la proteína.

H-NS contiene un dominio “coiled coil” en su región N-terminal, el cual se requiere para la dimerización de esta proteína y, por lo tanto, para su función como represor de la expresión genética<sup>13, 45, 56, 58</sup>. En *Ler* se puede predecir un dominio “coiled coil” en su región N-terminal abarcando de la posición 19 a la 46 (Fig. 18A). En un estudio previo se reportó que las mutaciones I26R y L29R afectan la predicción del dominio “coiled coil” de *Ler*<sup>55</sup>. Además estas mutaciones afectan la capacidad de este regulador de inducir la expresión de una fusión transcripcional *LEE2-lacZ*, así como de unirse al DNA<sup>55</sup>.

Para determinar si las mutaciones que afectaron la función de Ler, sobre todo aquellas localizadas en su región N-terminal, lo hicieron debido a que afectaron la formación del dominio “coiled coil”, se hizo un análisis del efecto de estas mutaciones en la predicción de formación de dicho dominio. Para las mutaciones localizadas dentro del dominio “coiled coil” (L29P, Q30P, K34R y L36P), se observó que excepto por la mutación K34R, todas abatieron la probabilidad de formación del dominio “coiled coil” (Fig. 17D, E y G). Era de esperar que la presencia de una prolina afectara la formación del dominio “coiled coil” debido a su incapacidad de formar enlaces de hidrógeno, así como por impedimento estérico, llevando a alteraciones en las interacciones entre los miembros de la héptada repetida y afectando la distribución de los aminoácidos del centro hidrofóbico del dominio “coiled coil” (Ueguchi *et al.*, 1997)<sup>4, 15, 29, 32, 58</sup>.

Por otro lado, la mutación K34R no afectó la predicción del dominio “coiled coil”, siendo congruente con el hecho de que el aminoácido arginina introducido, es un aminoácido con características químicas similares al original lisina. Aun así, la mutante conteniendo dicho cambio estuvo afectada en la capacidad de inducir la expresión de la fusión transcripcional *LEE2-cat*. Se sabe que las posiciones b y c de la héptada repetida del dominio “coiled coil” (una de las cuales es ocupada por el residuo arginina 34), son importantes para las interacciones iónicas y polares sostenidas entre las hebras que componen el dominio “coiled coil”, manteniendo una orientación adecuada de éstas. La mutación K34R podría desestabilizar las interacciones mencionadas y así, la orientación de las hebras y esto a su vez, tener un efecto en la función que lleva a cabo el dominio “coiled coil” de Ler.

Las mutaciones localizadas al inicio de la secuencia de aminoácidos de Ler, pero fuera del dominio “coiled coil” (N8S y T11A), las localizadas en la región conectora (I48T, T53P, I57T, E61G y L62P) y aquellas localizadas en la región C-terminal (Y83A, W91A, K102E, A104, K111E, L115H y L115P), no afectaron la predicción del dominio “coiled coil” (Fig. 18B, C, H, I, J, K, L y datos no mostrados), indicando, como era de esperarse, que los aminoácidos localizados fuera del dominio “coiled coil” son dispensables para su formación. Sin embargo, cabe mencionar que los algoritmos para predecir dominios “coiled coil” comparan la secuencia de aminoácidos de la proteína blanco con una base de datos de proteínas que se sabe contienen “coiled coils”, para determinar la probabilidad con la cual la secuencia blanco puede formar dichos dominios. Debido a esto, las predicciones “coiled coil” no toman en cuenta el plegamiento global de la proteína, de modo que se puede alterar éste y no observar efecto en la predicción del dominio. Por otro lado, para evaluar la importancia de los dominios “coiled coil” para alguna función, se introduce una mutación que destruya todo el dominio. En este trabajo el aminoácido introducido fue una prolina, pues es el único que tiene un efecto drástico en las estructuras secundarias si se localiza en una posición inadecuada.

Debido a que el dominio “coiled coil” permite la dimerización en H-NS, se analizó esta capacidad en algunas de las proteínas Ler con mutaciones en la región N-terminal (LerN8S, LerQ30P, LerI57T, LerE61G y LerL62P), así como de algunas mutantes en el extremo C-terminal (LerY83A, LerW91A, LerL115H y LerL115P). La dimerización se determinó usando el sistema de dos híbridos en bacterias basado en el regulador LexA. En un estudio previo en nuestro laboratorio se había demostrado que este sistema revela claramente que Ler dimeriza.

Las mutaciones N8S, Q30P, W91A y L115H, no afectaron la capacidad de dimerización de Ler (Fig. 19), mientras que las mutaciones E61G, L62P, Y83A y L115P, lo hicieron sólo ligeramente (Fig. 19). El hecho de que la mayoría de las proteínas mutantes dimerizaran, indica que las mutaciones que contienen no afectan la expresión o estabilidad de Ler *in vivo*.

Para el caso de la mutante LerQ30P, la observación de que fuera capaz de dimerizar fue sorprendente, pues esta mutación abatió la predicción del dominio “coiled coil”. En torno a esto, se sabe que para diferentes proteínas de la familia H-NS, mutaciones dentro del dominio “coiled coil” afectan su capacidad de dimerizar<sup>15, 58</sup>. Por otro lado, H-NS de *V. cholerae* contiene un dominio “coiled coil” extenso que abarca casi toda la región N-terminal<sup>40</sup>. En esta proteína, mutaciones que afectan la predicción de estructura secundaria “coiled coil” no afectan su capacidad de dimerización.

Así, al igual que para H-NS de *V. cholerae*, Ler parece requerir de una región diferente al dominio “coiled coil” para la dimerización. A este respecto, la mutación I57T abatió la capacidad de dimerización de Ler *in vivo* (Fig. 19), aunque no afectó la predicción del dominio “coiled coil”. Este resultado es coherente con la hipótesis de que el “coiled coil” no se requiere para la dimerización, de acuerdo a lo observado para la mutante LerQ30P e indica la importancia de la región conectora para sostener dicha función.

Aunque *in vitro* no se había observado que el conector fuera crucial para la dimerización en H-NS, sí se sabe que mejora su capacidad de oligomerización<sup>6, 15, 58</sup>. Por otro lado, recientemente se demostró que proteínas H-NS conteniendo el dominio de dimerización, pero no la región conectora, son incapaces de dimerizar y tetramerizar *in vivo*<sup>56</sup>. También se ha demostrado que mutaciones en el conector de H-NS generan cambios en la composición de estructura secundaria de la región N-terminal, debido a lo cual H-NS es incapaz de oligomerizar<sup>49</sup>. Con base en estos antecedentes, es probable que la mutación I57T pudiera estar alterando la estructura helicoidal del extremo N-terminal de Ler, debido a que el aminoácido treonina introducido es químicamente diferente al original isoleucina. Para definir mejor el papel que juega el residuo I57 en la dimerización de Ler, sería necesario mutarlo por otro aminoácido que no tenga un efecto drástico sobre las estructuras secundarias (p. e. alanina).

A diferencia de la mutación I57T, las mutaciones E61G y L62P, también localizadas en la región conectora, no afectaron la capacidad de dimerización de Ler (Fig. 19). Esto sugiere que no todos los residuos del conector son críticos para sostener función.

En cuanto a las proteínas con mutaciones en la región C-terminal evaluadas en dimerización (LerY83A, LerW91A, LerL115H y L115P), todas fueron capaces de dimerizar como la proteína Ler silvestre. Esto sugiere, como se ha demostrado para H-NS, que la capacidad de dimerización de Ler es independiente de la región C-terminal y que Ler es una proteína modular, pudiendo separar los dominios y observar que son funcionales.

Con respecto a la unión al DNA, se caracterizó esta habilidad en las proteínas mutantes LerN8S, LerQ30P, LerE61G, LerL62P y LerY83A. La proteína mutante LerN8S fue capaz de unirse al DNA con una afinidad similar a la silvestre. Esto era de esperarse debido a que el aminoácido introducido en esta mutante fue químicamente similar al original (Fig. 20A); además, fue capaz de inducir la expresión de la fusión transcripcional *LEE2-cat* a un nivel similar al que lo hace la proteína silvestre (Fig. 17A), así como de dimerizar (Fig. 19). Se decidió evaluar las capacidades, tanto de dimerización como de unión al DNA de la mutante LerN8S, con el fin de corroborar que dichas funciones se llevaban a cabo en forma similar a las de Ler silvestre. De este modo, la mutante LerN8S nos sirvió como un control de la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

Al caracterizar la capacidad de unión al DNA de la mutante LerE61G, se observó que fue capaz de unirse al DNA con la misma afinidad que la proteína silvestre (Fig. 20B). Así mismo, esta proteína mutante dimerizó como la silvestre. Sin embargo, la mutación E61G afectó la capacidad de Ler de inducir la expresión de la fusión transcripcional *LEE2-cat* (Fig. 18). Estos resultados sugieren que se requiere de una estructura particular para que Ler sea funcional, probablemente para posicionar u orientar adecuadamente los dominios de dimerización y de unión al DNA, necesarios para inducir la expresión de los genes *LEE*.

Por otro lado, la mutante LerQ30P fue capaz de unirse al DNA (Fig. 20C), aunque con una afinidad aproximadamente 2 veces menor que Ler silvestre; además, fue capaz de dimerizar como la proteína silvestre. Sin embargo, no pudo inducir la expresión de la fusión transcripcional *LEE2-cat*. Ya que los dominios "coiled coil" están involucrados en interacciones proteína-proteína, es probable que esta estructura se requiera en Ler para oligomerizar. Esto podría explicar porqué la mutante LerQ30P formó complejos proteína-DNA más pequeños respecto a los que formó la proteína silvestre (Fig. 20C). Entonces, se requeriría de la oligomerización para que Ler sea capaz de desplazar a H-NS de la región reguladora del operón *LEE2* y así permitir la transcripción.

La proteína mutante LerL62P fue capaz de unirse al DNA, aunque con una afinidad aproximadamente tres veces menor (Fig. 20D). Esta mutante dimerizó de manera similar que la proteína silvestre, pero fue incapaz de inducir la expresión de la fusión transcripcional *LEE2-cat*. En este caso, es probable que la introducción de una prolina en esa posición modifique la orientación del dominio de unión al DNA de Ler, afectando la habilidad de este regulador de unirse e interactuar correctamente con la región reguladora del operón *LEE2*.

Para caracterizar el dominio de unión al DNA de Ler, se caracterizó la mutante LerY83A. El aminoácido mutado se encuentra dentro del posible dominio de unión al DNA de Ler y además está conservado con respecto a H-NS y entre las diversas proteínas Ler. La mutación Y83A abatió completamente la capacidad de Ler de unirse al DNA blanco (Fig. 20E); sin embargo, esta mutación no afectó su dimerización. El aminoácido Y83 de Ler es equivalente al Y97 en H-NS, el cual se ha determinado por RMN que forma parte de una estructura secundaria tipo hoja  $\beta$  plegada antiparalela. Esta estructura se encuentra cercana a dos asas expuestas en la superficie de H-NS, involucradas en la interacción directa con el DNA<sup>51, 52</sup>. Así mismo, las interacciones hidrofóbicas que involucran a las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos de H-NS Y97, W109, V118, I119 y F133 proveen un elemento estabilizador de la estructura plegada de la región C-terminal<sup>51, 52</sup>. De este modo, la mutación en el residuo Y83 de Ler podría estar afectando las asas de interacción con el DNA.

## CONCLUSIONES

En este estudio confirmamos que el regulador transcripcional Ler contiene dominios funcionales tanto en su región N-terminal, como en su región C-terminal. En la región N-terminal se localiza el dominio de dimerización, del cual parece formar parte la región conectora. Mientras que la región C-terminal, contiene el dominio de unión al DNA. Observamos que se puede mutar el dominio de unión al DNA sin afectar la dimerización; sin embargo, mutaciones en el conector o en regiones probablemente involucradas en la oligomerización, sí pueden afectar la unión al DNA.

Un dato interesante que obtuvimos en este trabajo fue que, a diferencia de lo que ocurre en H-NS, Ler no requirió del dominio "coiled coil" para llevar a cabo la dimerización. En cambio, parte de la región conectora fue importante para dicha función.

Además de sus dominios de dimerización y unión al DNA Ler podría requerir de otros dominios funcionales para su actividad, pues mutaciones que no afectaron ni la dimerización ni la unión al DNA, afectaron la capacidad de Ler de inducir la expresión del operón *LEE2*. Uno de estos dominios podría mediar la oligomerización en Ler y podría depender de la formación de la estructura secundaria "coiled coil" en el extremo N-terminal de Ler.

Este estudio reveló información importante acerca de los dominios funcionales de Ler, lo cual ayudará a entender mejor el mecanismo que sigue este regulador para inducir la expresión de los genes de virulencia *LEE*. En particular, las diferencias funcionales entre Ler y H-NS que se determinaron en este estudio, ayudarán a esclarecer el porqué estos reguladores, que pertenecen a la misma familia, tienen funciones opuestas en la expresión de los genes *LEE*.

## PERSPECTIVAS

1. Se requiere finalizar la caracterización del resto de las proteínas Ler mutantes, en sus capacidades de dimerización y de unión al DNA. Esto nos ayudará a definir mejor los dominios funcionales que identificamos en este trabajo. En particular, será interesante conocer si las mutaciones W91A, K102E, A104T y K111E, afectan la unión al DNA, o si las mutaciones T11A, L29P, K34R, I48T y T53P, afectan la dimerización.

2. Se necesita determinar si la proteína Ler silvestre oligomeriza, y en su caso, si las mutaciones que afectaron la función de Ler, son capaces o no, de llevar a cabo esta función. En particular, estamos interesados en determinar si mutaciones tales como la Q30P, que afectan la formación de la estructura secundaria "coiled coil", pero no la dimerización de Ler, están afectando su capacidad de oligomerización. Esto confirmaría que el dominio "coiled coil" en Ler se requiere para la oligomerización, y que la región conectora (o parte de ella) se requiere para la dimerización, lo que sería una importante diferencia funcional entre las proteínas Ler y H-NS. Otras de las mutaciones que será interesante evaluar en la oligomerización, son la E61G y la L62P, pues éstas no afectaron la capacidad de dimerización de Ler. La oligomerización puede evaluarse mediante entrecruzamiento químico o electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes. Otra estrategia implementada para evaluar oligomerización, es un ensayo de dos híbridos en bacterias basado en el fago lambda, el cual se ha usado para determinar la dimerización y tetramerización *in vivo* de H-NS. Otro medio para evaluar oligomerización es mediante columnas de exclusión molecular.

3. En el caso de que obtengamos proteínas Ler mutantes que ya no oligomerizan, pero aún puedan unirse al DNA, como parece ser el caso de la mutante LerQ30P, se pueden emplear estas proteínas para realizar ensayos de protección a DNasa, para determinar específicamente los sitios de pegado de Ler. Con la proteína Ler silvestre ha sido complicado realizar este tipo de ensayos, debido a la tendencia de Ler de polimerizar a todo lo largo del DNA, impidiendo la determinación de sus sitios específicos de unión.

4. Se pueden realizar ensayos de dominancia negativa con las proteínas Ler mutantes. Este experimento consistiría en transformar la cepa de EPEC silvestre, con los plásmidos que expresan Ler con mutaciones puntuales. La dominancia negativa se observa cuando la proteína mutante es capaz de inhibir la función de la proteína silvestre producida por la bacteria. Este tipo de ensayo revela información acerca de si una mutación afecta algún tipo de interacción de la proteína en estudio. Por ejemplo, una proteína que dimerice pero no se una al DNA, será capaz

de dimerizar con la proteína silvestre, pero la población de dímeros mezclados será incapaz de unirse al DNA y, por lo tanto, de llevar a cabo la función correcta. Este resultado indicaría que el dominio de unión al DNA se requiere para la función de la proteína caracterizada.

4. Para extender este estudio, así como para descartar que los efectos de las mutaciones evaluadas se deben a defectos en el plegamiento de Ler, como pudieran ser los casos donde hubo mutaciones a prolina, se pueden generar otras mutaciones de manera sitio-dirigida. Por ejemplo, se podrían mutar los residuos donde hubo un cambio por prolina, pero ahora a alanina, un aminoácido empleado comúnmente en estrategias de mutagénesis para analizar el papel de determinados residuos en funciones específicas. De este modo, nos aseguraríamos que los fenotipos observados se debieron a que la mutación afectó la función, no el plegamiento de la proteína. Otros aminoácidos blanco para mutagenizar, serían aquéllos diferentes entre Ler y H-NS, sobre todo los localizados en el dominio de unión al DNA, que podrían ser importantes para la especificidad y la función antagonica de estos reguladores en la regulación de los genes *LEE*.

5. Identificar las regiones mínimas que contienen los dominios funcionales de Ler. Para esto se requerirá construir plásmidos que expresen diferentes segmentos de Ler para la caracterización de sus capacidades de dimerización y de unión al DNA. Esto permitirá localizar cada dominio funcional, y saber si son funcionalmente independientes unos de otros.

6. Puesto que no ha sido posible generar un modelo teórico de la estructura tridimensional de Ler, es necesario determinar dicha estructura para analizar el efecto de mutaciones puntuales sobre la misma. Para esto se requiere obtener la estructura cristalográfica de Ler, la cual se podrá usar como molde para evaluar qué tipo de mutaciones y en qué regiones, afectan el plegamiento de la proteína, y/o interacciones entre aminoácidos, originando una proteína no funcional.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Atlung, T., and H. Ingmer. 1997. **H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression.** *Mol. Microbiol.* **24**: 7-17.
2. Ausubel, F., *et al.* 2001. **Current Protocols in Molecular Biology.** John Wiley and Sons, **1 y 2.**
3. Barba, J., V. Bustamante, M. A. Flores, W. Deng, B. B. Finlay, and J. L. Puente. 2005. **A Positive Regulatory Loop Controls Expression of the Locus of Enterocyte Effacement Regulators Ler and GrlA.** *J. Bacteriol.* **187**: 7918-7930.
4. Berdichevsky, T., D. Friedberg, C. Nadler, A. Rokney, A. Oppenheim, and I. Rosenshine. 2005. **Ler Is a Negative Autoregulator of the LEE1 Operon in Enteropathogenic *Escherichia coli*.** *J. Bacteriol.* **187**: 349-357.
5. Bieber, D., S.W. Ramer, C.Y. Wu, W.J. Murray, T. Tobe, R. Fernandez, and G.K. Schoolnik. 1998. **Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*.** *Science.* **280**: 2114-8.
6. Bloch, V., Y. Yang, E. Margeat, A. Chavanieu, M.T. Auge, B. Robert, S. Arold, S. Rimsky, and M. Kochoyan. 2003. **The H-NS dimerization domain defines a new fold contributing to DNA recognition.** *Nat. Struct. Biol.* **10**: 212-8.
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. Campellone, K., and J. Leong. 2003. **Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7.** *Curr. Opin. Microbiol.* **6**: 82-90.
9. Cerdan, R., V. Bloch, Y. Yang, P. Bertin, C. Dumas, S. Rimsky, M. Kochoyan, and S.T. Arold. 2003. **Crystal structure of the N-terminal dimerisation domain of VicH, the H-NS-like protein of *Vibrio cholerae*.** *J. Mol Biol.* **334**: 179-85.
10. 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.
11. 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.
12. Dmitrova, M., G. Younès-Cauet, P. Oertel-Buchheit, D. Porte, M. Schnarr, and M. Granger- Schnarr. 1998. **A New LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*.** *Mol. Gen. Genet.* **257**: 205-212.
13. Dorman, C. 2004. **H-NS: A Universal Regulator for a Dynamic Genome.** *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 391-400.

14. 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.
15. Esposito, D., A. Petrovic, R. Harris, S. Ono, J.F. Eccleston, A. Mbabaali, I. Haq, C.F. Higgins, J.C. Hinton, P.C. Driscoll, and J.E. Ladbury. 2002. **H-NS oligomerization domain structure reveals the mechanism for high order self-association of the intact protein**. *J. Mol. Biol.* **324**: 841-850.
16. Finlay, B.B., and Falkow, S. 1997. **Common Themes in Microbial Pathogenicity Revisited**. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 136-169.
17. 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.
18. Freundlich, M., N. Ramani, E. Mathew, A. Sirko, and P. Tsui. 2000. **The role of integration host factor in gene expression in *Escherichia coli***. *Mol. Microbiol.* **6**: 2557-2563.
19. Garmendia, J, G. Frankel, and V.F. Crepin. 2005. **Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation**. *Infect. Immun.* **73**: 2573-85.
20. Friedberg, D., T. Umanski, Y. Fang, and I. Rosenshine. 1999. **Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli***. *Mol. Microbiol.* **34**: 941-952.
21. Goldberg, M.D., M. Johnson, J.C.D. Hinton, and P.H. Williams. 2001. **Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli***. *Mol. Microbiol.* **41**: 549-559.
22. 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.
23. 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.
24. Heroven, A., G. Negen, H. Tran, S. Parr, and P. Dersch. 2004. **RovA is autoregulated and antagonizes H-NS-mediated silencing of invasin and rovA expression in *Yersinia pseudotuberculosis***. *Mol. Microbiol.* **53**: 871-888.
25. Kaper, J.B., J. Nataro, and L. Mobley. 2004. **Pathogenic *Escherichia coli***. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**: 123-138.
26. Kenny, B., S. Ellis, A. Leard, J. Warawa, H. Mellor, and M. Jepson. 2002. **Co-ordinate regulation of distinct host cell signaling pathways by**

- multifunctional Enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules.** Mol. Microbiol. **44**: 1095-1107.
27. 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.
  28. Kenny, B., and M. Jepson. 2000. **Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria.** Cell. Microbiol. **2**: 579-590.
  29. Kwok, S., and R. Hodges. 2004. **Stabilizing and Destabilizing Clusters in the Hydrophobic Core of Long Two-stranded A-Helical Coiled-coils.** J. Biol. Chem. **279**: 21576-21588.
  30. Laaberki, M. H., N. Janabi, E. Oswald, and F. Repoila. 2006. **Concert of regulators to switch on LEE expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: Interplay between Ler, GrlA, HNS and RpoS.** Int. J. Med. Microbiol.
  31. Lupas, A. 1996. **Coiled coils: new structures and new functions.** TIBS. **21**: 375-382.
  32. MacArthur, M., and J. Thornton. 1991. **Influence of Proline Residues on Protein Conformation.** J. Mol. Biol. **218**: 397-412.
  33. Marchès, O, T.N. Ledger, M. Boury, M. Ohara, X. Tu, F. Goffaux, J. Mainil, I. Rosenshine, M. Sugai, J. De Rycke, and E. Oswald. 2003. **Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G<sub>2</sub>/M transition.** Mol. Microbiol. **50**: 1553-67.
  34. Martínez-Laguna, Y., E. Calva, and J.L. Puente. 1999. **Autoactivation and environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*.** Mol. Microbiol. **33**: 153-166.
  35. Matsuzawa, T., A. Kuwae, S. Yoshida, C. Sasakawa, and A. Abe. 2004. **Enteropathogenic *Escherichia coli* activates the RhoA signaling pathway via the stimulation of GEF-H1.** EMBO J. **23**: 3570-3582.
  36. Mekalanos, J. 1992. **Environmental Signals Controlling Expression of Virulence Determinants in Bacteria.** J. Bacteriol. **174**: 1-7.
  37. 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.
  38. Nataro, J., and Kaper, J. 1998. **Diarrheagenic *Escherichia coli*.** Clin. Microbiol. Rev. **11**: 142-201.
  39. Neidhardt, F. 1996. ***Escherichia coli* and *Salmonella*.** Cellular and Molecular Biology. 2a ed. American Society for Microbiology Press, USA, **1**: 1-3.
  40. Nye, M.B., Taylor R.K. 2003. ***Vibrio cholerae* H-NS domain structure and function with respect to transcriptional repression of ToxR regulon genes**

- reveals differences among H-NS family members. *Mol. Microbiol.* **50**: 427-44.
41. 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.
  42. Porter, M.E., P. Mitchell, A.J. Roe, A. Free, D.G. Smith, and D.L. Gally. 2004. **Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, PerA from enteropathogenic *Escherichia coli*.** *Mol. Microbiol.* **54**: 1117-33.
  43. Puente, J.L., and Finlay, B.B. 2001. **Pathogenic *Escherichia coli*.** En: Principles of bacterial pathogenesis (Groisman E., ed.). Academic Press, pp: 388-456.
  44. Renzoni, D., D. Esposito, M. Pfuhl, J.C. Hinton, C.F. Higgins, P.C. Driscoll, and J.E. Ladbury. 2001. **Structural characterization of the N-terminal oligomerization domain of the bacterial chromatin-structuring protein, H-NS.** *J. Mol. Biol.* **306**: 1127-37.
  45. Rimsky, S. 2004. **Structure of the histone-like protein H-NS and its role in regulation and genome superstructure.** *Curr. Opin. Microbiol.* **7**: 109-14.
  46. 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.
  47. Sambrook, J., and W.D Russell. 2001. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA, Vol. 1 y 2.
  48. 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.
  49. Schröder, O., D. Tippner, and R. Wagner. 2001. **Toward the Three-Dimensional Structure of the *Escherichia coli* DNA-Binding Protein H-NS: a CD and Fluorescence Study.** *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **282**: 219-227.
  50. Sharma, V.K., and R.L. Zuerner. 2004. **Role of *hha* and *ler* in transcriptional regulation of the *esp* operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.** *J. Bacteriol.* **186**: 7290-301.
  51. Shindo, H., T. Iwaki, R. Ieda, H. Kurumizaka, Ch. Ueguchi, T. Mizuno, S. Morikawa, H. Nakamura, and H. Kuboniwa. 1995. **Solution structure of the DNA binding domain of a nucleoid-associated protein, H-NS, from *Escherichia coli*.** *FEBS Letters.* **360**: 125-131.
  52. Shindo, H., A. Ohnuki, H. Ginba, E. Katoh, Ch. Ueguchi, T. Mizuno, and T. Yamazaki. 1999. **Identification of the DNA binding surface of H-NS protein from *Escherichia coli* by heteronuclear NMR spectroscopy.** *FEBS Letters.* **455**: 63-69.

53. Sohel, I., J.L. Puente, S. Ramer, D. Bieber, C.Y., W, and G. Schoolnik. 1996. **Enteropathogenic *Escherichia coli*: Identification of a Gene Cluster Coding for Bundle-Forming Pilus Morphogenesis.** J. Bacteriol. **178**: 2613-2628.
54. Sperandio, V., C.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**: 3085-93.
55. 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.
56. Stella, S., R. Spurio, M. Falconi, C. L. Pon, and C. Gualerzi. 2005. **Nature and mechanism of the *in vivo* oligomerization of nucleoid protein H-NS.** EMBO J. **24**: 2896-2905.
57. 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.
58. Ueguchi, C., T. Suzuki, T. Yoshida, K.I. Tanaka, and T. Mizuno. 1996. **Systematic Mutational Analysis Revealing the Functional Domain Organization of *Escherichia coli* Nucleoid Protein H-NS.** J. Mol. Biol. **263**: 149-162.
59. Vallance, B.A., and Finlay, B.B. 2000. **Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**: 8799-8806.
60. Winstanley, C., and Hart, A. 2001. **Type III secretion systems and pathogenicity islands.** J. Med. Microbiol. **50**: 116-126.
61. 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.