



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
MUTANTES SITIO DIRIGIDAS DEL
REGULADOR POSITIVO Gr1A DE *Escherichia
coli* ENTEROPATÓGENA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O
P R E S E N T A:**

SARA BETANIA CRUZ MIGONI



**ASESOR:
M. en C. RAFAEL JIMÉNEZ MEJÍA**

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco enormemente a la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme proporcionado las herramientas académicas necesarias en mi proceso de formación como estudiante de Biología.

Mi más sincero agradecimiento al M. en C. Rafael Jiménez Mejía por todo el tiempo, conocimiento, paciencia y amistad que me brindó durante la realización de este trabajo.

Al Dr. José Luis Puente García por permitir integrarme en su grupo de trabajo y hacer posible este primer acercamiento a la investigación científica.

A mis sinodales, los doctores Victor Humberto Bustamente Santillán, Ricardo Oropeza Navarro, Bertha González Pedrajo y Luis Felipe Jiménez García, por su accesibilidad y disposición, pero sobre todo por sus críticas y comentarios para el mejoramiento de este escrito.

A mis compañeros del laboratorio por aligerar las sesiones de trabajo y por compartir su tiempo conmigo dentro y fuera del laboratorio.

Agradezco al Instituto de Biotecnología por las facilidades y el espacio brindados.

A mis padres, por su apoyo incondicional y su inmenso cariño. Este trabajo les pertenece.

A mis hermanos, por que no existe mejor ejemplo a seguir que el suyo.

A mi nena hermosa, Arantza Jolie, por tu profundo amor y tus constantes ansias por mi regreso a casa.

À mon petit trésor. Je n'ai pas de mots pour exprimer le bonheur d'être avec toi. Et surtout, n'oublie pas qu'on s'appartient l'un à l'autre.

A mi familia y amigos por compartir conmigo tantas experiencias, logros y fracasos.

1. Datos del alumno

Cruz
Migoni
Sara Betania
55862605
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biólogo
406013602

2. Datos del tutor

M en C
Rafael
Jiménez
Mejía

3. Datos del sinodal 1

Dr
Luis Felipe
Jiménez
García

4. Datos del sinodal 2

Dr
Ricardo
Oropeza
Navarro

5. Datos del sinodal 3

Dra
Bertha María Josefina
González
Pedrajo

6. Datos del sinodal 4

Dr
Victor Humberto
Bustamante
Santillán

7. Datos del trabajo escrito

Construcción y caracterización de mutantes sitio dirigidas del regulador positivo
GrIA de *Escherichia coli* enteropatógena.
88p.
2010.

ÍNDICE

1. Resumen.	7
2. Introducción.	8
2.1. <i>Escherichia coli</i> , de bacteria comensal a patógena.	8
2.1.1. EPEC	10
2.1.2. EHEC	10
2.1.3. ETEC	11
2.1.4. EAEC	11
2.1.5. EIEC	12
2.1.6. DAEC	12
2.1.7. UPEC	13
2.1.8. MNEC	14
2.2. Familia de patógenos A/E.	14
2.2.1. Características generales.	14
2.2.2. <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC): epidemiología y cuadro clínico.	15
2.3. Modelo de infección por EPEC.	16
2.3.1. Adherencia inicial.	16
2.3.2. Transducción de señales.	17
2.3.3. Adherencia íntima.	18
2.4. Sistema de secreción tipo 3 (SST3) de EPEC.	19
2.4.1. Composición y ensamblaje del SST3.	19
2.4.2. Proteínas efectoras secretadas por el SST3.	21
2.5. La isla de patogenicidad LEE (Locus of Enterocyte Effacement).	21
2.6. Mecanismos de regulación en los patógenos A/E.	23
2.6.1. Control de la formación de las lesiones A/E y la secreción de proteínas.	23
2.6.2. Regulación directa del LEE.	24
2.6.3. Regulación del LEE a través de la activación o represión de <i>ler</i> .	26
3. Antecedentes.	28
4. Objetivos.	33
5. Materiales y métodos.	34
5.1. Cepas bacterianas y plásmidos.	34
5.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.	36
5.3. Manipulaciones de ADN.	37
5.3.1. PCR (reacción en cadena de la polimerasa).	37

5.3.2. Digestión de ADN con enzimas de restricción.	38
5.3.3. Electroforesis por geles de agarosa.	39
5.3.4. Ligaciones.	39
5.3.5. Transformación bacteriana por electroporación.	39
5.4. Células electrocompetentes.	40
5.5. PCR de colonia.	40
5.6. Construcción de mutantes puntuales de GrIA.	41
5.6.1. Mutaciones puntuales en el motivo HTH de GrIA.	41
5.6.2. Eliminaciones y mutaciones puntuales en el extremo C-terminal de GrIA.	43
5.7. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).	45
5.8. Inmunodetección de proteínas (Western Blot).	46
5.9. Perfil de proteínas secretadas.	48
5.10. Cuantificación de la actividad de CAT (Cloranfenicol Acetil Transferasa).	48
5.11. Ensayo de interacción proteína-proteína mediante “Pull down”.	50
5.11.1. Preparación de extractos celulares.	50
5.11.2. Preparación de la resina de Glutación Sefarosa™.	50
5.11.3. Unión de las proteínas GST y GST-GrIR a la resina de GS.	51
5.11.4. Captura de la proteína blanco fusionada a MBP.	51
6. Resultados.	53
6.1. Diseño de mutantes puntuales en el motivo HTH de GrIA.	53
6.2. Los residuos Y61 y R65 de GrIA son importantes para activar la expresión de <i>ler</i> en <i>E. coli</i> MC4100.	56
6.3. Los residuos S29, C32, R41, Y61 y R65 de GrIA no participan en la interacción con el represor GrIR.	63
6.4. Caracterización del extremo C-terminal de GrIA: los últimos seis aminoácidos son requeridos para la activación de <i>ler</i> .	63
6.5. Los residuos R133 y K134 de GrIA son requeridos para activar la expresión de <i>ler</i> en <i>E. coli</i> MC4100.	69
6.6. El extremo carboxilo de GrIA no participa en la interacción con GrIR.	72
7. Discusión y conclusiones.	74
8. Perspectivas.	82
9. Referencias.	83

LISTA DE TABLAS y FIGURAS

Figura 1. <i>E. coli</i> patógenas asociadas a infecciones gastro-intestinales.	13
Figura 2. Modelo de tres etapas de la infección por EPEC.	19
Figura 3. Esquema del sistema de secreción tipo III de EPEC.	20
Figura 4. Representación esquemática de la isla de patogenicidad LEE de EPEC.	22
Figura 5. Proteínas involucradas en la regulación de los genes de LEE en EPEC.	27
Figura 6. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de GrIA de EPEC, SGH y CaiF.	29
Tabla 1. Mutaciones puntuales registradas para GrIA de EPEC.	31
Tabla 2. Cepas bacterianas.	34
Tabla 3. Plásmidos utilizados.	34
Tabla 4. Concentraciones de antibióticos utilizadas.	37
Tabla 5. Composición de las reacciones de PCR.	38
Figura 7. Representación esquemática de la técnica de mutagénesis por PCR sobrelapado.	43
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados.	44
Figura 8. Representación esquemática del ensayo de “pull-down”.	52
Figura 9. Distribución de los aminoácidos de las hélices del motivo HTH de GrIA	55
Figura 10. Análisis del efecto de las mutaciones puntuales del motivo HTH en la función de GrIA.	58
Figura 11. Perfil de secreción de EPEC Δ grIA complementada con las mutantes puntuales del HTH fusionadas a MBP.	60
Figura 12. Sobre-expresión de las mutantes puntuales del HTH de GrIA.	61
Figura 13. Los aminoácidos S29, C32, R41, Y61 y R65 de GrIA no participan en la interacción con GrIR.	63
Figura 14. Representación de las eliminaciones del extremo C-terminal de GrIA.	64
Figura 15. Los últimos 6 aminoácidos de GrIA son importantes para activar a <i>ler</i> .	66
Figura 16. Sobre-expresión de las mutantes truncas de GrIA.	67
Figura 17. Los residuos R133 y K134 de GrIA son importantes para activar a <i>ler</i> .	69
Figura 18. Perfil de secreción de EPEC Δ grIA complementada con los plásmidos pMAL-c2X, pMPB-GrIA, pMBP-GrIA/R132A, R133A, K134A, K135A, E136A y R133AK134.	70
Figura 19. Sobre-expresión de las mutantes puntuales del extremo C-terminal de GrIA.	71
Figura 20. Ensayo de “pull-down” de los recortes y mutaciones puntuales del extremo C-terminal de GrIA.	73

RESUMEN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es una bacteria Gram-negativa asociada a la aparición de diarrea en niños menores de seis meses de edad en países en vías de desarrollo. EPEC, junto con el agente causal del síndrome urémico hemolítico *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) y *Citrobacter rodentium* forman parte de la familia de patógenos A/E, los cuales inducen lesiones caracterizadas por la destrucción de las microvellosidades y la alteración de la red citoesquelética de actina del enterocito, seguido por la acumulación de actina debajo de la bacteria adherente. Las proteínas involucradas en la formación de estas lesiones están codificadas dentro de una isla de patogenicidad denominada LEE (Locus of Enterocyte Effacement). El LEE está organizado en cinco operones principales (*LEE1-LEE5*), los cuales codifican para un sistema de secreción tipo 3 (SST3), así como proteínas efectoras, chaperonas y los reguladores transcripcionales Ler, GrIA y GrIR.

GrIA es un regulador positivo capaz de activar a *ler* al unirse directamente sobre su región reguladora; Ler a su vez activa al resto de los operones del LEE, incluyendo a *grIRA*, al contrarrestar la represión ejercida por la proteína H-NS sobre sus promotores. GrIA y Ler forman un circuito de regulación positiva, en el que las dos proteínas se regulan recíprocamente al contrarrestar el efecto negativo de H-NS. GrIA es capaz de formar heterodímeros con el represor de la isla GrIR y además está involucrada en la regulación de otros blancos fuera del LEE.

El presente trabajo tuvo como objetivo la construcción y caracterización funcional de mutantes puntuales de GrIA de EPEC, con el fin de identificar residuos de aminoácidos importantes en la capacidad de la proteína de activar a *ler* y de interactuar con GrIR. Se construyeron 10 mutantes sitio dirigidas, 5 en el motivo HTH de unión a ADN y 5 en el extremo carboxilo terminal de la proteína, además de dos recortes en esta misma región de GrIA. Mediante ensayos de activación de una fusión transcripcional de *ler* al gen reportero *cat*, se encontró que los residuos Y61 y R65 son importantes en la capacidad de GrIA para activar a *ler*. También se demostró que los últimos 6 aminoácidos de GrIA son cruciales para su actividad, en particular los residuos R133 y K134. No obstante, ninguna de las mutantes aquí reportadas afectó la capacidad de GrIA de interactuar con GrIR, según lo obtenido a través de los ensayos de interacción tipo “pull-down”.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. *Escherichia coli*, de bacteria comensal a patógena.

La bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* forma parte de la flora del tracto intestinal humano, siendo uno de los primeros microorganismos en colonizarlo a las pocas horas después de nacer (Kaper *et al.*, 2004). Las *E. coli* encontradas en individuos sanos mantienen una relación comensalista con su huésped sin causarle cuadros clínicos importantes (Nataro y Kaper, 1998). Sin embargo existen variantes patógenas de *E. coli*, las cuales comparten con las bacterias comensales componentes genómicos esenciales tales como genes involucrados en el metabolismo, en la replicación, en la división celular, así como los necesarios para la supervivencia dentro del intestino (Dobrindt *et al.*, 2004). En las versiones patógenas no obstante, el bloque genómico común está modificado por la inserción de islas genómicas (genomic islands, GEIs) adquiridas horizontalmente a través de conjugación, transducción ó transformación, lo cual les permiten colonizar nuevos nichos y diseminarse dentro de nuevos huéspedes (Dobrindt *et al.*, 2004; Garmendia *et al.*, 2005). Estas modificaciones genéticas son muy importantes para la evolución de los patógenos bacterianos, dado que en lugar de que sus propias moléculas sufran adaptaciones lentas para ganar nuevas funciones, hay generación rápida de variantes por explotación del material genético adquirido “listo para usarse” proveniente de otros organismos (Morschhäuser *et al.*, 2000).

Las GEIs transportan genes que confieren ventaja selectiva para la bacteria huésped, y de acuerdo con su contenido genético pueden clasificarse como islas de patogenicidad (pathogenicity islands, PAIs), simbióticas, metabólicas, de adecuación o de resistencia (Morschhäuser *et al.*, 2000; Dobrindt *et al.*, 2004; Schmidt y Hensel, 2004; Juhas *et al.*, 2009). Las PAIs codifican factores de virulencia y están presentes en los

genomas de bacterias patógenas, pero ausentes en los genomas de bacterias comensales de la misma especie o de especies estrechamente relacionadas (Hacker y Kaper, 2000; Schmidt y Hensel, 2004). Estas islas ocupan regiones del genoma relativamente grandes (10 a 200 kb), además de que difieren del genoma central bacteriano por su composición de nucleótidos y el uso de codones (Hacker y Kaper, 2000; Schmidt y Hensel, 2004). En general, la composición de nucleótidos de las PAI, expresada como el porcentaje de los nucleótidos guanina (G) y citosina (C) (%GC), difiere del promedio del resto del genoma de bacterias patógenas, pues se considera que las islas conservan la composición de la especie de donde fueron adquiridas (Schmidt y Hensel, 2004). Si bien las PAIs juegan un papel fundamental en la virulencia de bacterias patógenas, existen otros elementos genéticos móviles como transposones, plásmidos y bacteriófagos que, aunados a eventos de pérdida de material genético, mutaciones puntuales y otros rearrreglos del ADN, han creado nuevas y exitosas combinaciones de factores de virulencia para dar origen a los diferentes patotipos de *E. coli* causantes de enfermedades (Kaper *et al.*, 2004).

La mayoría de las infecciones intestinales producidas por las variedades patógenas de *E. coli* se limitan a la colonización superficial de la mucosa intestinal, mientras que otras variantes pueden diseminarse a través del cuerpo, siendo implicadas en infecciones del tracto urinario (UTIs) así como en infecciones de meninges (sepsis/meningitis) (Nataro y Kaper, 1998). Entre los patógenos intestinales existen seis patotipos bien definidos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* difusoadherente (DAEC) (Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004) (**Fig. 1**). Las *E. coli* relacionadas a infecciones extraintestinales son *E. coli* uropatógena (UPEC) que causa UTIs y *E. coli* asociada a meningitis (MNEC) que provoca

sepsis y meningitis (Kaper *et al.*, 2004). Enseguida se resumen brevemente las características principales de cada uno de estos patotipos.

2.1.1. *E. coli* enteropatógena (EPEC). Se encuentra asociada a la causa de diarrea severa en niños menores de 6 meses de edad en países subdesarrollados (Nataro y Kaper, 1998). EPEC coloniza el epitelio del intestino delgado, donde es capaz de adherirse íntimamente a la superficie de los enterocitos y manipular la red del citoesqueleto de actina, provocando una lesión característica en forma de pedestal denominada lesión de adhesión y borrado o A/E (Attaching and Effacing) (Moon *et al.*, 1983). La capacidad de EPEC para formar las lesiones A/E está dada por la presencia de una isla de patogenicidad denominada LEE (Locus of Enterocyte Effacement) que codifica para un sistema de secreción tipo tres (SST3), así como diversos factores de virulencia asociados a la diarrea (**Fig. 1A**).

2.1.2. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Además de causar lesiones A/E similares a las de EPEC, EHEC se caracteriza por provocar diarrea con sangre (colitis hemorrágica) y el síndrome urémico hemolítico (HUS) (Karmali *et al.*, 1983), más comúnmente conocido como “enfermedad de las hamburguesas”. A diferencia de EPEC, EHEC coloniza el intestino grueso y es un patógeno zoonótico que es portado asintóticamente por varios rumiantes, especialmente ganado vacuno (Vallance *et al.*, 2002). Además de los factores de virulencia codificados en la isla de patogenicidad LEE, EHEC produce una toxina tipo Shiga (Stx) codificada dentro de un fago que daña los tejidos intestinales y en algunos casos desencadena la aparición del HUS (**Fig. 1B**) (Karch, 2001).

2.1.3. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC). Es una causa importante de diarrea acuosa en niños de países en vías de desarrollo (Kaper *et al.*, 2004; Johnson y Nolan, 2009) y constituye un problema importante para los viajeros y personal militar que visita países donde ETEC es endémica (Turner *et al.*, 2006). ETEC infecta la superficie de la mucosa del intestino delgado con ayuda de múltiples factores de colonización (CFs) codificados en plásmidos y una o más enterotoxinas (enterotoxina lábil al calor LT ó enterotoxina estable al calor ST), las cuales dan lugar a la secreción intestinal (**Fig. 1C**) (Kaper *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 2006). Los CFs son estructuras proteicas responsables de la adherencia de la bacteria al epitelio intestinal del huésped y hasta el momento se han identificado más de 20 CFs diferentes en cepas de ETEC que infectan humanos (Johnson y Nolan, 2009).

2.1.4. *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Este término describe a aquellas cepas de *E. coli* que se adhieren a las células Hep-2 en un patrón de adherencia conocido como de “ladrillos apilados” (Jiang y Butzler, 2007). La estrategia básica de EAEC es colonizar la mucosa del colon, seguido por la secreción de enterotoxinas como la toxina estable al calor 1 (EAST-1) (Weintraub, 2007). Este patotipo aumenta característicamente la secreción de moco a partir de la mucosa intestinal, atrapando a las bacterias en una biopelícula gruesa (**Fig. 1D**) (Nataro y Kaper, 1998). Algunas cepas poseen un plásmido de alto peso molecular asociado a la adherencia agregativa (plásmido pAA), en donde están codificados distintos factores de virulencia como la EAST-1 y las fimbrias AAF/I y AAF/II, las cuales se ha relacionado con su habilidad para provocar diarrea persistente (Weintraub, 2007).

2.1.5. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC). Los pacientes infectados con esta bacteria presentan diarrea acuosa, y algunas veces diarrea con sangre. EIEC está estrechamente relacionada con las especies de *Shigella* (Kaper *et al.*, 2004), ya que ambas causan disentería bacilar por procesos similares (Percival, 2004). Este patotipo se une a los enterocitos del intestino grueso en donde su capacidad invasiva es conferida por un plásmido de 213-kb (pINV) que codifica un SST3 y una proteína llamada IcsA, la cual promueve la nucleación de actina para formar filamentos que empujan a la bacteria a través de la célula. La bacteria se multiplica intracelularmente y se mueve lateralmente por la célula huésped para después penetrar células adyacentes (**Fig. 1E**) (Percival, 2004).

2.1.6. *E. coli* difusoadherente (DAEC). Este patotipo se define por la presencia de un característico patrón de adherencia difusa en monocapas de células HEp-2 (Kaper *et al.*, 2004). DAEC ha sido implicada como una causa de diarrea, especialmente en niños menores de 2 años en países desarrollados y subdesarrollados (Nataro y Kaper, 1998). Aproximadamente 75% de las cepas de DAEC producen adhesinas fimbriales llamadas F1845 (Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al.*, 2004) ó adhesinas relacionadas como AIDA-I, responsables del patrón de adherencia difusa. Algunas cepas de DAEC inducen proyecciones tipo dedo que encierran a las células bacterianas, embebiéndolas y protegiéndolas; sin embargo la bacteria no es invasiva (**Fig. 1F**) (Fratamico y Smith, 2006). Este patotipo está poco caracterizado y su relación con la diarrea queda a discusión.

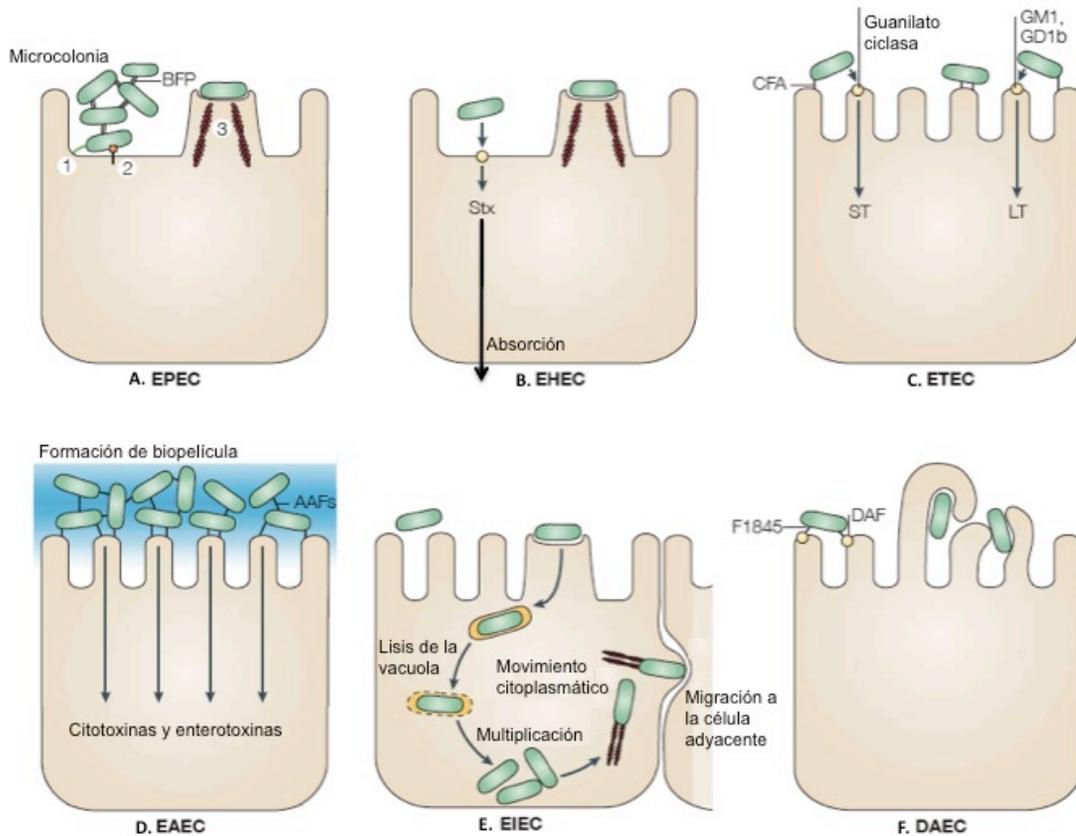


Figura 1. *E. coli* patógenas asociadas a infecciones gastro-intestinales. **A.** *E. coli* enteropatógena, EPEC. **B.** *E. coli* enterohemorrágica, EHEC. **C.** *E. coli* enterotoxigénica, ETEC. **D.** *E. coli* enteroagregativa, EAEC. **E.** *E. coli* enteroinvasiva, EIEC. **F.** *E. coli* disufoadherente, DAEC. Modificado de Kaper, 2004.

2.1.7. *E. coli* uropatógena (UPEC). La infección por esta bacteria se da por ingestión de comida contaminada, siendo el tracto intestinal su reservorio primario. No obstante, también puede ser adquirida por contacto sexual con individuos infectados (Wiles *et al.*, 2008). UPEC puede colonizar la vejiga y causar cistitis, o ascender a través de los uréteres hacia los riñones y desarrollar pielonefritis (Wiles *et al.*, 2008). UPEC produce adhesinas específicas como los pili tipo I y P que la ayudan en la colonización. Además, produce sideróforos y varias toxinas (Kaper *et al.*, 2004) que le permiten dañar los tejidos, modificar las rutas de señalización del huésped y facilitar su diseminación dentro del mismo.

2.1.8. *E. coli* asociada a meningitis (MNEC). Causa común de meningitis neonatal por bacterias Gram-negativas (Kaper *et al.*, 2004, Stenutz *et al.*, 2006). Algunas cepas de MNEC poseen 500 kb de genes adicionales con respecto a *E. coli* K-12 y un plásmido de 100 kb que codifica diferentes factores de virulencia (Bonacorsi *et al.*, 2000). La bacteria se transloca a partir del torrente sanguíneo hacia el sistema nervioso central por un proceso de transcitosis (Kaper *et al.*, 2004). Un determinante clave para la invasión de las meninges por MNEC es la habilidad de escapar de las defensas del huésped, permitiéndole alcanzar un grado de bacteremia lo suficientemente alto para la invasión (Kim, 2001). MNEC utiliza la fimbria S para unirse a la superficie luminal del endotelio cerebral, así como proteínas de membrana externa para invadir. El 80% de las cepas poseen un polisacárido capsular K1, el cual le confiere resistencia al plasma sanguíneo y propiedades antifagocíticas necesarias durante la invasión (Kaper *et al.*, 2004).

2.2. Familia de patógenos A/E

2.2.1. Características generales.

El término adhesión y borrado (Attaching and Effacing, A/E) fue introducido en 1983 por Moon y colaboradores para describir a las lesiones provocadas por el serotipo 055:H7 de EPEC en cerdos, identificadas previamente por Stanley en 1970. Estas lesiones muestran colonización bacteriana donde las bacterias están adheridas íntimamente a las células epiteliales (Moon *et al.*, 1983). Las bacterias unidas a la membrana del enterocito inducen profundas alteraciones celulares modificando el citoesqueleto de las microvellosidades del enterocito, y promoviendo la proliferación de actina filamentosa debajo de la bacteria adherente (Chen y Frankel, 2004). Consecuentemente se observa la destrucción de las

microvellosidades y la unión estrecha de las bacterias a la célula huésped sobre una estructura parecida a un pedestal (Kaper *et al.*, 1998).

Además de EPEC, la familia de patógenos A/E está conformada por el agente causal del síndrome urémico hemolítico EHEC, por el patógeno de ratones *Citrobacter rodentium*, así como variantes patógenas de *E. coli* aisladas de conejos, becerros, cerdos y perros (Moon *et al.*, 1983; Nataro y Kaper, 1998; Wales *et al.*, 2005). Adicionalmente se ha introducido el término de “*E. coli* de adhesión y borrado” (attaching and effacing *E. coli*, AEEC) para designar a aquellas cepas de *E. coli* con los genes requeridos para formar las lesiones A/E, pero para las cuales no hay evidencia experimental de las mismas (Wales *et al.*, 2005).

EPEC fue el primer patotipo descrito de *E. coli* y probablemente sea el más caracterizado. Esta bacteria es una de las causas más comunes de diarrea en niños en países en vías de desarrollo, como en el caso de México (Vidal *et al.*, 2007). Dada su importancia como agente patógeno en nuestro país y en razón del avanzado conocimiento de su mecanismo de infección, en nuestro laboratorio y en este trabajo en particular hemos utilizado como modelo de estudio a EPEC. A continuación se describe con más detalle las características de la bacteria así como su maquinaria de infección.

2.2.2 *E. coli* enteropatógena (EPEC): epidemiología y cuadro clínico.

Las infecciones por EPEC son fundamentalmente enfermedades que afectan a infantes menores de dos años de edad, aunque existe una marcada correlación entre los aislados de esta bacteria y niños con diarrea menores de seis meses de edad (Nataro y Kaper, 1998). EPEC fue la primera cepa de *E. coli* implicada en brotes de diarrea infantil durante las décadas de 1940 y 1950 en países desarrollados como Estados Unidos y Reino Unido. Sin embargo, las cepas de EPEC ya no se consideran agentes causantes de diarrea en dichos países, pero sí en países en vías de desarrollo (Nataro y Kaper, 1998).

El contagio por EPEC se da por vía fecal-oral, ya sea por contaminación en las manos, alimentos, fórmulas para bebés contaminadas, o fómites que sirvan como vehículos (Levine *et al.*, 1984), así como por contaminación fecal de suministros de agua (Vallance, 2002). Además, los brotes de EPEC ocurren con frecuencia en lugares en donde los niños se aglomeran y están en contacto directo, como en guarderías y centros de cuidado infantil (Spears *et al.*, 2006).

EPEC provoca fundamentalmente diarrea severa, aunque también puede causar diarreas prolongadas, incidiendo con un 30% de mortalidad infantil en países subdesarrollados (Senerwa *et al.*, 1989). Además de la diarrea acuosa, otros síntomas comunes de la infección son vómito y fiebre ligera (Stenutz *et al.*, 2006).

2.3. Modelo de infección de EPEC.

2.3.1. Adherencia inicial.

Se ha sugerido que la interacción de EPEC con las células epiteliales del intestino se lleva a cabo en distintas etapas, estableciéndose tres diferentes estadios durante la infección (**Fig. 2**) (Donnenberg y Kaper, 1992). De acuerdo a este modelo, la primera etapa involucra la adherencia inicial de la bacteria al epitelio intestinal del huésped (Knutton *et al.*, 1987; Donnenberg y Kaper, 1992; Chen y Frankel, 2004).

La adherencia inicial en células epiteliales en cultivo ocurre siguiendo un patrón denominado “Adherencia Localizada” (**Fig. 2A**) (Scaletsky *et al.*, 1984), la cual es mediada por un pili tipo IV denominado BFP (Bundle-Forming Pilus) (Girón *et al.*, 1991) codificado dentro del plásmido del factor de adherencia de EPEC, EAF (EPEC adherence factor) (Donnenberg *et al.*, 1989). El pili BFP es el responsable de la formación de microcolonias tridimensionales en la superficie del enterocito vía interconexiones bacteria-bacteria (Hicks *et al.*, 1998). Así mismo, la fimbria BFP es considerada un factor de

virulencia muy importante que permite a las bacterias una vez aglomeradas desprenderse, pudiendo colonizar y diseminarse a lo largo del intestino (Frankel *et al.*, 1998). La adherencia inicial de la bacteria a los enterocitos no se da de manera íntima, y se ha observado que cepas de EPEC curadas del plásmido EAF pueden producir la infección, pero la presencia de dicho plásmido incrementa significativamente la habilidad de EPEC para colonizar la mucosa intestinal (Knutton *et al.*, 1987). Además de la expresión de BFP, en esta etapa se comienza a expresar la adhesina intimina, así como filamentos cortos de la proteína EspA asociados a la superficie (Clarke *et al.*, 2003).

2.3.2. Transducción de señales.

Posterior a la formación de las microcolonias, comienza la segunda etapa de infección caracterizada por la transducción de señales dentro del enterocito (**Fig. 2B**) (Chen y Frankel, 2004). En esta etapa se propone que las bacterias inyectan varias proteínas efectoras al interior de la célula huésped a través de un sistema de secreción tipo tres (SST3) codificado dentro de la isla de patogenicidad LEE (Locus of Enterocyte Effacement) (Jarvis *et al.*, 1995; Donnenberg *et al.*, 1997).

El SST3 constituye una vía de secreción independiente del sistema de secreción general Sec que es una ruta esencial de exportación bacteriana (Cornelis, 2006). El SST3 es utilizado por varios patógenos entéricos y actúa como una jeringa molecular que inyecta proteínas efectoras directamente en el citoplasma de la célula huésped (Chen & Frankel, 2004). Las moléculas efectoras modifican las vías de señalización bacteriana y provocan alteraciones en el citoesqueleto del enterocito dando como resultado la despolimerización de actina y la pérdida de las microvellosidades (Clarke *et al.*, 2003; Garmendia *et al.*, 2005).

2.3.3. Adherencia íntima.

La tercera etapa de la infección por EPEC se caracteriza por la adherencia íntima entre la bacteria y la célula huésped (**Fig. 2C**) (Donnenberg *et al.*, 1992).

Tir (Translocated intimin receptor) es una de las proteínas efectoras relacionadas con la adherencia íntima y es esencial para la formación de pedestales. Esta proteína es translocada a la célula huésped vía el SST3 y posteriormente insertada en la membrana plasmática (Kenny *et al.*, 1997). Después de que se ha integrado a la membrana, Tir adopta una topología parecida a la de una horquilla, con sus extremos amino y carboxilo en dirección al citoplasma eucarionte y su dominio central expuesto sobre la superficie celular. Este dominio se une a la proteína bacteriana de membrana externa denominada intimina (Hayward *et al.*, 2006); en el citoplasma del enterocito Tir es fosforilada en su residuo Y474 por cinasas del huésped generando un sitio de unión para la proteína Nck (Kenny *et al.*, 1999). Nck a su vez tiene tres dominios que pueden activar a la proteína N-WASP, la cual se une y activa al complejo Arp2/3, induciendo la polimerización de monómeros de G-actina en filamentos (Hayward *et al.*, 2006). Esto da como resultado la acumulación de actina debajo de la bacteria adherente y la formación de los pedestales característicos de la lesión A/E.

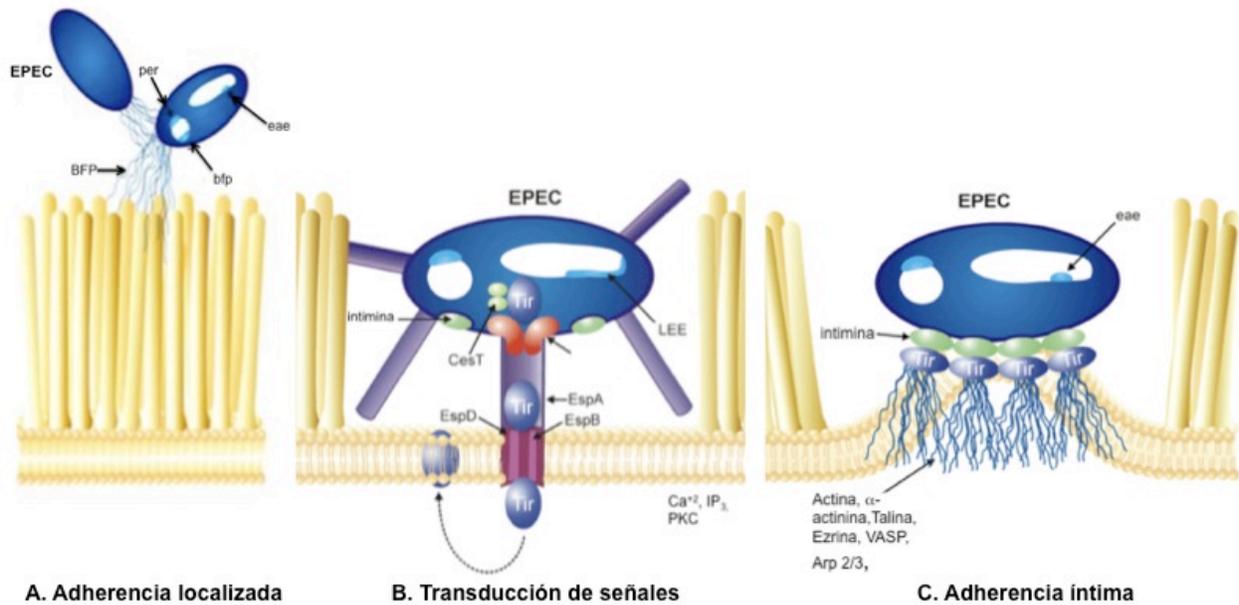


Figura 2. Modelo de tres etapas de la infección por EPEC. **A.** La adherencia localizada está mediada por la fimbria BFP para formar microcolonias. **B.** La transducción de señales da como resultado la destrucción de las microvellosidades mediada por los efectores liberados por el SST3. **C.** La adherencia íntima se caracteriza por la formación de los pedestales de actina en donde la bacteria se une estrechamente a la célula huésped. Tomado y modificado de la página de Natalie Strynadka (<http://fernness.com/science-08.html>).

2.4. Sistema de secreción tipo tres (SST3) de EPEC.

2.4.1. Composición y ensamblaje del SST3.

El SST3 está compuesto por aproximadamente 20 proteínas, muchas de las cuales son homólogas a los componentes del aparato de biosíntesis flagelar (Hueck, 1998). Las proteínas secretadas a través del SST3 pueden dividirse en dos clases: proteínas efectoras, las cuales son translocadas al interior de la célula huésped, y los componentes del aparato translocador, las cuales forman un poro y un filamento en la membrana del enterocito y son requeridas para la liberación de las proteínas efectoras dentro de la célula (Donnenberg y Wittam, 2001).

El SST3 está constituido en su base por proteínas de membrana interna que forman parte del aparato de secreción: EscR, EscT, EscS, EscU y EscV (**Fig. 3**). Aquí se encuentra también la proteína EscN, una ATPasa que proporciona energía para el

funcionamiento del sistema. Enseguida, se encuentra un anillo intermedio localizado en la membrana interna bacteriana y que posee un dominio hacia el espacio periplásmico. Este anillo está compuesto por la oligomerización de la proteína EscJ (Spears *et al.*, 2006). Después se ubica el poro de la membrana externa, formado por la proteína EscC; luego la proteína EscF que es el componente de la aguja molecular. La parte extracelular del SST3 contiene una extensión proteica denominada filamento constituido por la polimerización de la proteína EspA, la cual parece conformar una estructura cilíndrica hueca que forma un canal a través del cual las proteínas son inyectadas en la célula huésped (Frankel *et al.*, 1998). Finalmente se encuentran las proteínas EspB y EspD que forman el poro de translocación en la membrana de la célula huésped y permiten la liberación de las proteínas efectoras (Chen y Fankel, 2004).

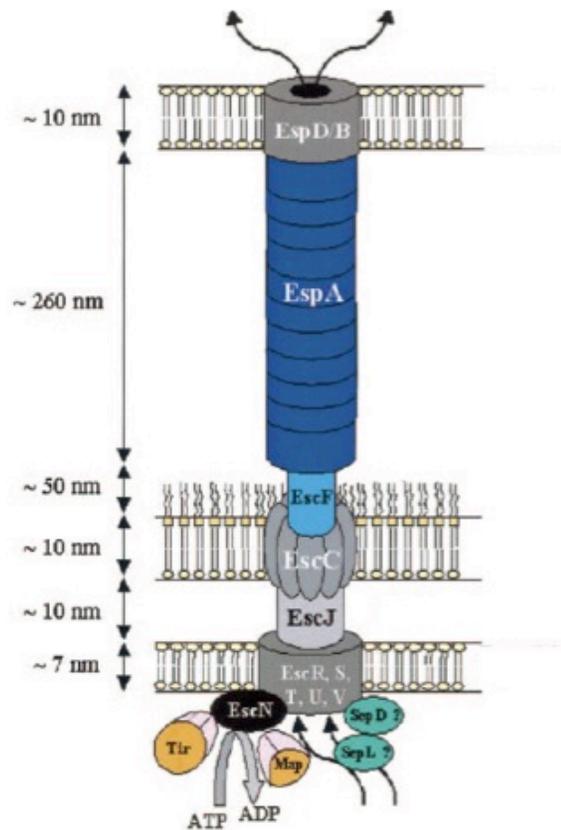


Figura 3. Esquema del sistema de secreción tipo III de EPEC. Modificado de Garmendia *et al.*, 2005.

2.4.2. Proteínas efectoras secretadas por el SST3.

Hasta ahora se conocen siete efectores codificados dentro del LEE de EPEC, los cuales son translocados al interior del enterocito: EspF, EspG, EspZ, EspH, EspB, Tir y Map (Dean *et al.*, 2009). Estas proteínas pueden presentar funciones superpuestas, aunque su independencia y cooperatividad son importantes para modificar las actividades celulares del huésped. Entre dichas funciones se encuentran la destrucción de las uniones estrechas y las microvellosidades, la formación de filopodios, la disfunción mitocondrial y apoptosis, la antifagocitosis, el remodelamiento membranal, y la maduración de los pedestales de actina (Dean *et al.*, 2009). Así mismo se ha reportado que EPEC posee varios efectores codificados fuera del LEE denominados Nle (non-LEE effectors); estos efectores también son translocados por el SST3. Entre éstos se encuentran NleA, NleB, NleE, NleH, NleG, EspJ, EspL2 y EspG2 (Orf3) y Cif (Deng *et al.*, 2004; Dean *et al.*, 2009, Mellies *et al.*, 2007).

2.5. La isla de patogenicidad LEE (Locus of Enterocyte Effacement).

Como se mencionó antes, los genes requeridos para el ensamblaje del SST3 y para inducir la lesión A/E se encuentran codificados dentro de una de una isla de patogenicidad de aproximadamente 35.6 Kb denominada LEE (McDaniel *et al.*, 1995). El LEE está compuesto de 41 marcos de lectura abiertos organizados en cinco operones principales (*LEE1* a *LEE5*), así como dos operones bicistrónicos y cuatro unidades monocistrónicas (Elliott *et al.*, 1998; Clarke *et al.*, 2003) (**Fig. 4**).

Adicionalmente a los genes que codifican el SST3 (*LEE1-LEE3*), los genes de LEE codifican las proteínas formadoras del translocón (*LEE4*), las proteínas involucradas en la adherencia íntima: intimina y su receptor Tir (*LEE5*) (Donnenberg y Wittam, 2001), así como diversas proteínas efectoras. El LEE también codifica tres reguladores transcripcionales, un probable interruptor jerárquico de la secreción tipo tres y chaperonas

moleculares (Deng *et al.*, 2004; Deng *et al.*, 2005). Dos de los reguladores transcripcionales de la isla están codificados en el operón *grlRA*, situado entre el gen *rorf3* y el operón *LEE2*; estos se han denominado GrIR por “global regulator of LEE represor” y GrIA por “global regulator of LEE activator” (Deng *et al.*, 2004; Barba *et al.*, 2005).

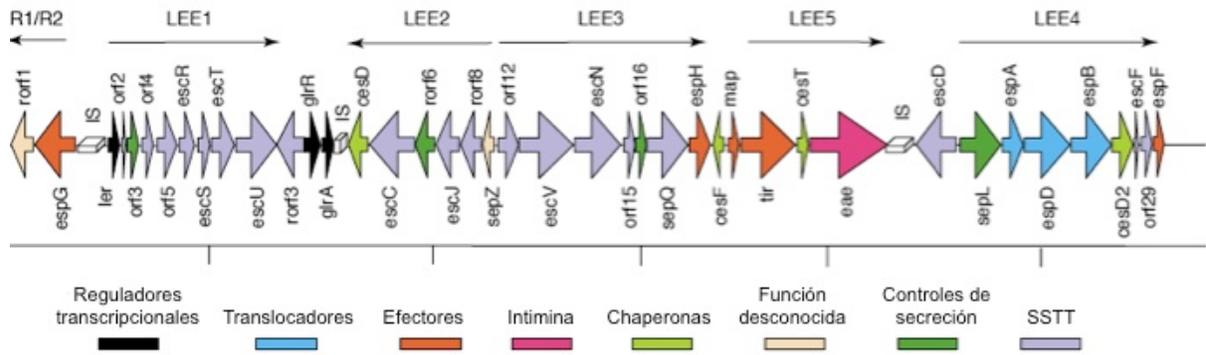


Figura 4. Representación esquemática de la isla de patogenicidad LEE de EPEC. LEE está organizada en cinco operones principales (LEE1-LEE5) y otras unidades transcripcionales más pequeñas. Modificado de Dean *et al.*, 2005.

El LEE está localizado dentro del cromosoma bacteriano en una región considerada un “hot spot” para la inserción de genes de virulencia (Nataro y Kaper, 1998); esta zona se localiza en el locus *seIC*, el cual codifica para el tRNA de selenocisteína (McDaniel *et al.*, 1995; Hacker y Kaper, 2000; Schmidt y Hensel, 2004). Además, el LEE cuenta con un bajo contenido de GC (38%) respecto al promedio del resto del genoma de *E. coli* (50%), discrepancia que sugiere que la isla fue adquirida de una fuente externa por transferencia horizontal e insertada en el cromosoma de una *E. coli* comensal (Elliot *et al.*, 1998; Castillo *et al.*, 2005).

Los patógenos que conforman a la familia A/E, conservan entre sí la organización de los 41 genes que conforman a LEE (Petty *et al.*, 2010). Para muchas de las proteínas del LEE, la similitud entre EPEC y EHEC es mucho mayor que la que puede haber con *C. rodentium* (Deng *et al.*, 2001). De hecho el grado promedio de identidad de las proteínas del SST3 entre EHEC y EPEC es de 98%, mientras que la identidad entre *C. rodentium* y

EHEC ó EPEC pocas veces sobrepasa el 95% (Deng *et al.*, 2001). A pesar de esto, se ha observado que algunas proteínas de EHEC y EPEC pueden complementar mutantes de *C. rodentium*, resaltando su funcionalidad y relevancia en el proceso de infección. Además, la mayoría de los factores de virulencia y reguladores específicos de la isla están funcionalmente conservados en las tres bacterias, evidenciando la importancia del control de expresión de los genes del LEE durante la patogénesis (Deng *et al.*, 2001).

2.6. Regulación de los genes de virulencia en los patógenos A/E.

Una característica muy importante de las bacterias patógenas es su capacidad de responder adecuadamente al medio ambiente al que están expuestas para coordinar la correcta expresión de los genes de virulencia y poder sobrevivir en un nicho específico (Mekalanos, 1992). En el caso de los patógenos A/E, el proceso de infección está orquestado por más de 30 proteínas codificadas en los distintos operones del LEE, los cuales están específicamente regulados para ser expresados en el momento y lugar precisos durante la infección (Mellies *et al.*, 2007; Tree *et al.*, 2009). Además, dada la dependencia que existe entre la formación de las lesiones A/E y la expresión del SST3 es de vital importancia conocer y entender los diferentes mecanismos de regulación de los genes localizados dentro del LEE.

2.6.1. Control de la formación de lesiones A/E y de la secreción.

La patogenicidad de muchas bacterias está asociada con la expresión de proteínas efectoras específicas, las cuales se pueden secretar al medio (Kenny *et al.*, 1997). La expresión de los genes que codifican estos factores de virulencia está finamente regulada y responde a los estímulos ambientales como temperatura, pH y disponibilidad de nutrimentos (Mekalanos, 1992).

La regulación de los genes de la isla de patogenicidad LEE se lleva a cabo por distintos mecanismos, uno de los cuales involucra condiciones físico-químicas. Se ha demostrado que la expresión del LEE y por ende la formación de las lesiones A/E ocurre principalmente cuando las bacterias se crecen en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) a 37°C, en fase exponencial temprana (Kenny *et al.*, 1997). Por otro lado, la secreción máxima de proteínas de virulencia a través del SST3 ocurre a temperatura del cuerpo humano (37°C), en medio DMEM, a pH 7 y a osmolaridad fisiológica (Kenny *et al.*, 1997; Mellies *et al.*, 2007). De manera interesante, se sugirió que algunos de los componentes del medio DMEM estimulan la secreción de las proteínas EspA, EspB y EspC, como es el caso del calcio (Kenny *et al.*, 1997). También se demostró que en el caso de EHEC, el efecto estimulador del NaHCO₃ sobre la adherencia es el resultado de un incremento en la expresión del primer gene del operon *LEE1* (Kenny *et al.*, 1997; Abe *et al.*, 2002). Además, la secreción de las proteínas EspA, EspB, EspC y Tir puede estimularse en presencia de hierro, mientras que se inhibe por la presencia de cloruro de amonio (Kenny *et al.*, 1997). De manera interesante, la secreción de EspA, EspB y EspD se estimula en presencia de calcio, mientras que la secreción de Tir se inhibe en presencia de éste (Ide *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2005).

2.6.2. Regulación directa del LEE.

Varias proteínas reguladoras han mostrado controlar directamente la expresión de los genes del LEE (Mellies *et al.*, 2007; Tree *et al.*, 2009). Entre ellas destaca el regulador maestro de la isla, Ler (LEE-encoded regulator), producto del primer gen del operón *LEE1* (**Fig. 5**). Se ha reportado que esta proteína de 15 KDa regula positivamente la transcripción de los operones *LEE2*, *LEE3*, *LEE4*, *LEE5*, *espG*, *map* y *grlRA* (Sperandio *et al.*, 2000; Bustamante *et al.*, 2001; Sánchez-San Martín *et al.*, 2001; Berdichevsk *et al.*, 2005; Barba *et al.*, 2005), uniéndose directamente sobre sus regiones reguladoras

(Mellies *et al.*, 1999; Sperandio *et al.*, 2001; Bustamante *et al.*, 2001; Haack *et al.*, 2003; Jiménez *et al.*, en preparación). Además se reportó que Ler regula negativamente a *LEE1*, interactuando directamente con su propio promotor (Berdichevsk *et al.*, 2005). Este mecanismo de autorregulación parece limitar la concentración de Ler a niveles suficientes para activar a los otros operones de LEE.

Por otro lado, la expresión de los genes de LEE es reprimida por la proteína H-NS (Histone-like Nucleoid-Structuring protein) (**Fig. 5**). H-NS es una proteína distribuida entre las proteobacterias y es muy abundante (20 000 copias por genoma). H-NS está involucrada en la organización del nucleóide bacteriano y en la expresión de genes en respuesta a cambios ambientales (Tendeng y Bertin, 2003; Dorman, 2004). Además, también se ha visto que juega un papel importante en el silenciamiento de genes adquiridos por transferencia horizontal, en especial aquellos involucrados en la virulencia (Lucchini *et al.*, 2006; Navarre *et al.*, 2006; Oshima *et al.*, 2006).

H-NS se une a las regiones reguladoras de *LEE1-LEE5*, y a las del operón *grlRA* (Bustamante *et al.*, 2001; Umanski *et al.*, 2002; Barba *et al.*, 2005; Mellies *et al.*, 2007). Interesantemente, la secuencia de aminoácidos de Ler guarda 24% de identidad y 44% de similitud con la de H-NS (Mellies *et al.*, 1999; Elliott *et al.*, 1998), sobre todo en el dominio de unión a DNA, ubicado en el extremo carboxilo terminal. De acuerdo a las evidencias experimentales se ha sugerido que el mecanismo por el que Ler activa la expresión del LEE es quitando la represión ejercida por H-NS sobre los promotores de la isla (Bustamante *et al.*, 2001; Sperandio *et al.*, 2000). Se demostró que Ler se une en una misma región que H-NS a los promotores superpuestos de *LEE2* y *LEE3*, desestabilizando el complejo represor y desplazándolo, permitiendo que los genes se expresen (Bustamante *et al.*, en preparación).

2.6.3. Regulación del LEE a través de la activación o represión de *ler*.

Por otra parte, existen reguladores que si bien no activan directamente la transcripción de los operones *LEE2-LEE5*, controlan la expresión de la isla al regular a *LEE1*. Entre ellos PerC (Plasmid-encoded regulator), un regulador codificado dentro del plásmido EAF de EPEC, y el regulador global IHF afectan directa y positivamente la expresión de *Ler* (Mellies *et al.*, 1999, Friedberg *et al.*, 1999). De la misma manera, los homólogos de *perC* en EHEC, *pchABC*, regulan positivamente la expresión de LEE al incrementar la transcripción de *ler* (Iyoda *et al.*, 2004). Además se ha reportado que la expresión de *ler* es dependiente de Fis, una proteína asociada al nucleoide (Goldberg *et al.*, 2001), de BipA, un miembro de la superfamilia de las GTPasas (Grant *et al.*, 2003), así como del regulador QseA (Quorum-sensing *E. coli* regulator A) (Sperandio *et al.*, 2002) (**Fig. 5**).

La expresión de *ler* también está regulada de manera negativa por la proteína Hha, la cual reduce su expresión (Sharma *et al.*, 2004). Aunado a esto, LEE es regulado de manera negativa indirectamente por GadX, ya que esta proteína reprime la expresión de *perABC* y por lo tanto a PerC, evitando que éste active a *ler* (Shin *et al.*, 2001) (**Fig. 5**). Además, recientemente se demostró que en EHEC la proteína Hfq, una chaperona de ARN con efectos a nivel post-transcripcional, regula negativamente la expresión del LEE al modular la expresión de los reguladores *ler* y *griA* (Shakhnovich *et al.*, 2009; Hansen y Kaper, 2009).

Adicionalmente, *ler* está regulado por las dos proteínas codificadas dentro del operón *grIRA* del LEE. GrIR es un regulador negativo que reduce la expresión de los operones del LEE, notablemente la de *LEE1* (Deng *et al.*, 2004; Lara *et al.*, en preparación), mientras que GrIA es un regulador positivo que induce la expresión de *ler* (Barba *et al.*, 2005). Cabe destacar que GrIA es la única proteína de LEE aparte de *Ler*, capaz de activar a *ler* y por tanto la expresión de las proteínas secretadas por el SST3.

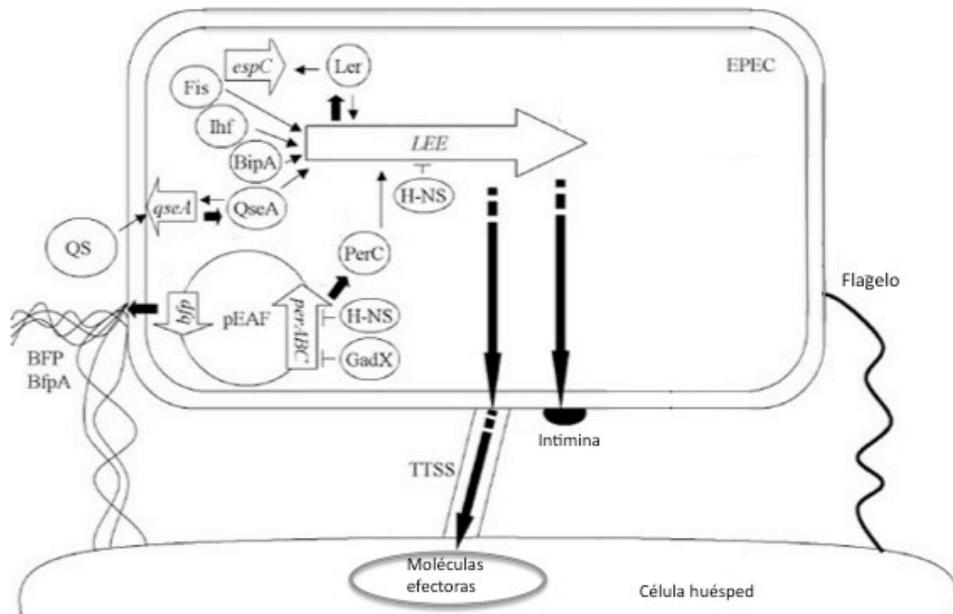


Figura 5. Proteínas involucradas en la regulación de los genes de LEE en EPEC. Modificado de <http://www.ecosal.org>

3. ANTECEDENTES

El primer reporte sobre la función del regulador positivo GrIA se publicó en el 2004 por Deng y colaboradores; en ese trabajo, a través de una mutagénesis sistemática de los 41 genes que componen al LEE de *C. rodentium*, se encontró que el hasta entonces conocido como Orf11 era una proteína esencial para la expresión de Tir y EspB, así como para la de los operones *LEE2* y *LEE5* (Deng *et al.*, 2004). Se observó que una mutante en el gen *grIA* era incapaz de expresar los genes de LEE y por consiguiente no secretaba proteínas asociadas a la virulencia a través del SST3. Además, *in vitro* esta mutante era incapaz de formar pedestales en células HeLa, así como *in vivo* de causar la enfermedad en ratones (Deng *et al.*, 2004).

GrIA destaca por ser una proteína importante en la expresión de los genes del LEE, ya que regula positivamente la expresión del regulador maestro de la isla Ler (Deng *et al.*, 2004). A la par del descubrimiento de GrIA, en ese trabajo también se identificó al Orf10 como un regulador negativo de LEE y se denominó GrIR (Deng *et al.*, 2004). Más recientemente se ha demostrado que GrIR es capaz de reprimir a LEE cuando es expresado en plásmido multicopia (Deng *et al.*, 2004; Lio *et al.*, 2004; Lara *et al.*, en preparación). A la fecha no se han descrito homólogos de GrIR, pero de manera interesante, se encontró que esta proteína es capaz de interactuar con GrIA y consigo misma (Creasey *et al.*, 2003; Jobichen *et al.*, 2007).

GrIA es una proteína básica de 137 aminoácidos, altamente conservada en los patógenos A/E (95-100% de identidad). Posee un 37% de identidad con una proteína hipotética de *Salmonella* denominada SGH (*Salmonella* GrIA Homologue) y 23% con la proteína CaiF (Deng *et al.*, 2004). CaiF es el único homólogo de GrIA parcialmente caracterizado, para el que se sabe es un activador transcripcional de los operones *cai* y *fix*

que están involucrados en la vía degradativa de carnitina en enterobacterias (Eichler *et al.*, 1996; Buchet *et al.*, 1999). GrIA, SGH y CaiF contienen un motivo putativo de unión a ADN del tipo hélice-giro-hélice (Helix-turn-Helix, HTH) presente en muchos factores de transcripción (**Fig. 6A**) (Deng *et al.*, 2004). La predicción de la estructura secundaria ha mostrado que GrIA posee 5 alfa hélices (I-V), siendo las hélices II, III y IV las que componen el HTH (**Fig. 6B**).

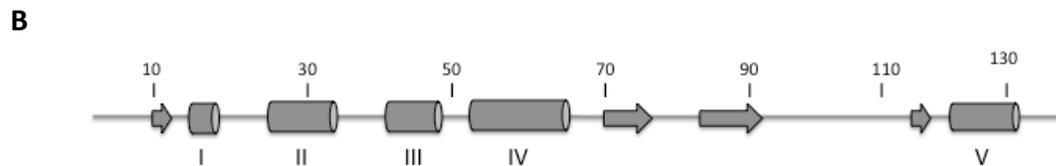
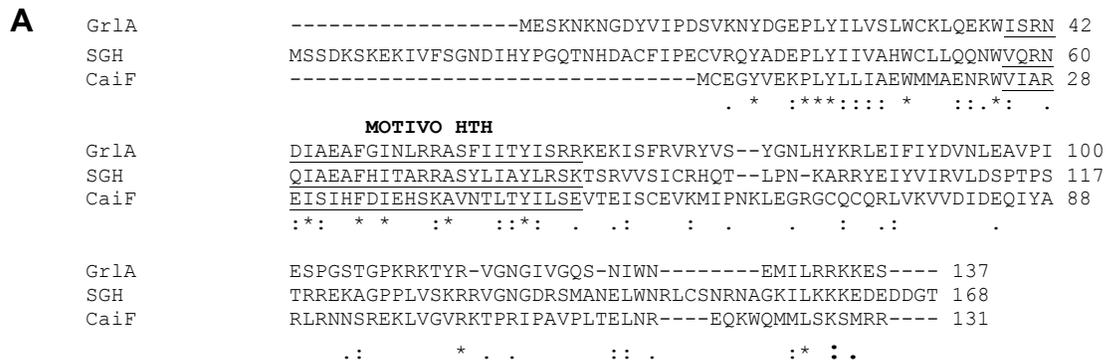


Figura 6. A. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de GrIA de EPEC, SGH Y CaiF. El análisis de las secuencias indica que GrIA tiene un 29% de identidad con el activador transcripcional CaiF, así como un 39% de identidad con una proteína no caracterizada de *Salmonella enterica*, SGH. El motivo HTH presente en las tres proteínas se muestra subrayado y los residuos conservados se señalan con un asterisco. Con un punto se señalan los aminoácidos conservados de acuerdo a su polaridad y con dos puntos aquellos conservados por tener la misma carga. **B.** Esquema representativo de la predicción de la estructura secundaria de GrIA, en donde se señalan las hélices α (I-V) y las láminas β que la componen. Dicha predicción se obtuvo utilizando el programa computacional PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

En el 2005, Barba y colaboradores realizaron un análisis para investigar el papel de GrIA de *C. rodentium* en la regulación de LEE. Se observó que una fusión de *ler* al gen reportero *cat* (*ler-cat*) era inactiva en una mutante en *grIA*, sugiriendo la intervención directa de GrIA en la activación de *ler* (Barba *et al.*, 2005). Además se demostró que la expresión de una fusión *grIRA-cat* se abatía en una cepa mutante en *ler*, indicando que se

necesita la presencia de Ler para la expresión de dicho operón (Barba *et al.*, 2005). Dado que Ler es requerido para la expresión de *grlRA* y que a su vez GrlA regula positivamente a *ler*, se propuso la existencia de un circuito de regulación positiva, en donde GrlA y Ler se regulan uno a otro recíprocamente para modular la expresión de los genes de LEE (Barba *et al.*, 2005). Aunado a esto, se determinó que *grlR* y *grlA* forman un operón que, de la misma manera que el resto de los operones de LEE, es regulado negativamente por la proteína H-NS. Además se reportó que la presencia de Ler induce la expresión de dicho operón al contrarrestar la represión mediada por H-NS (Barba *et al.*, 2005).

Recientemente, se analizó el papel de GrlA y PerC en la regulación de *ler* en EPEC. Se observó que ambas proteínas son requeridas para la expresión de *ler* en medio DMEM a 37°C, pero que PerC favorece dicha expresión bajo condiciones de crecimiento estático, mientras que GrlA lo hace en agitación. De manera interesante las dos proteínas se expresan en las dos condiciones, por lo que se sugirió que éstas funcionan diferencialmente dependiendo de la condición de crecimiento (Villalba, 2006). El análisis del mecanismo por el que GrlA de EPEC activa la expresión de *ler* indica que GrlA contrarresta el efecto negativo que ejerce H-NS sobre *ler* (Jiménez *et al.*, en preparación), así como se ha propuesto que PerC contrarresta a H-NS en el promotor de *ler* (Bustamante *et al.*, en preparación; Porter *et al.*, 2005). Ensayos de retardamiento en la movilidad electroforética de la región reguladora de *ler* mostraron que GST-GrlA de EHEC se une a la región promotora de *LEE1* (Huang *et al.*, 2008), aunque esta interacción no fue totalmente concluyente pues se observó formación de complejos con el ADN en el control negativo. No obstante, se ha determinado que MBP-GrlA de EPEC es capaz de unirse específicamente a la región reguladora de *ler* de esa misma bacteria, en la secuencia comprendida entre las posiciones -50 a +217 respecto al inicio de la transcripción (Jiménez *et al.*, en preparación).

Uno de los aspectos más relevantes dentro del proyecto para comprender los mecanismos de la regulación transcripcional de GrIA de EPEC ha sido la caracterización molecular de la proteína. Por ello, en nuestro laboratorio se ha emprendido el diseño y construcción de varias mutantes puntuales con el fin de obtener información de la relevancia de aminoácidos y regiones discretas en la función de la proteína. Los cambios se han diseñado tanto en los residuos de aminoácidos conservados entre GrIA y sus homólogos SGH y CaiF (**Fig. 6**), así como en otros no conservados (Jiménez *et al.*, en preparación). Cabe mencionar que dichos residuos se encuentran ubicados mayoritariamente dentro o alrededor de la secuencia correspondiente al motivo HTH. En la **tabla 1** se resumen las mutaciones realizadas hasta el momento, así como su fenotipo caracterizado.

Tabla 1. Mutaciones puntuales registradas para GrIA de EPEC.

Residuo mutado	Activación de la fusión LEE1-cat	Complementación de EPEC Δ grIA	Interacción con GrIR
P23A	✓	✓	✓
L24A	✓	✓	✗
Y25A	✗	✗	✓
W31A	✗	✗	✗
N42A	✓	✓	✓
I44A	✗	✗	✗
E46A	✓	✓	✓
F48A	✗	✗	✗
I50A	✗	✗	✗
L52A	✓	✓	✓
R54A	✗	✗	✓
S56A	✓	✓	✓

De manera interesante, el sistema GrIA/GrIR no sólo está involucrado en la regulación de la expresión de LEE, sino también en el control de la expresión del sistema flagelar y de una enterohemolisina en EHEC.

Inicialmente se reportó que la proteasa dependiente de ATP, ClpXP, regulaba positivamente la expresión de los genes de LEE en EHEC al controlar los niveles intracelulares de GrIR y RpoS (Iyoda *et al.*, 2005). Se observó entonces que una mutante

de EHEC $\Delta clpXP$ hipersecretaba proteínas en el medio, entre las que destacó la flagelina (FliC), componente principal del flagelo. Interesantemente, al eliminar a *grlR*, la cantidad de FliC en los sobrenadantes disminuía, de la misma manera que al sobreexpresar a *grlA* en plásmido multicopia. Adicionalmente se comprobó que la represión ejercida por GrlA afectó la función flagelar de EHEC, disminuyendo de manera significativa la movilidad de las bacterias. El efecto negativo de GrlA es el resultado de la modulación de la expresión de los genes *flhD* y *flhC*, que codifican los reguladores maestros necesarios para la expresión de los genes flagelares (Iyoda *et al.*, 2006). Estos resultados sugieren que GrlA reprime el regulón flagelar posiblemente para asegurar la adherencia de EHEC a las células huéspedes, ya que la expresión constitutiva del flagelo inhibe la adherencia de la bacteria a células HeLa.

Por otro lado, GrlA se involucró en la regulación positiva del operón *ehxCABD* que codifica a la enterohemolisina Ehx localizada en el plásmido pO157 de EHEC (Saitoh *et al.*, 2008). En ese reporte los autores encontraron que una cepa de EHEC $\Delta grlR$ mostró un fenotipo hiperhemolítico provocado por la expresión constitutiva de *grlA* que a su vez activa la expresión de la enterohemolisina. Además se observó que una cepa de EHEC Δler conteniendo una versión multicopia de *grlA* conservaba dicho fenotipo e inducía la expresión de *ehxC* y *ehxA* (Saitoh *et al.*, 2008). Aunque se sugirió que la actividad hemolítica podría servirle a la bacteria para adquirir hierro de la hemoglobina liberada de los eritrocitos del huésped, la relevancia de dicho fenotipo y el papel específico de GrlA en la de activación del operón *ehxCABD* no han sido determinados (Saitoh *et al.*, 2008).

4. OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar los mecanismos moleculares que controlan la expresión de los genes de virulencia localizados en la isla de patogenicidad LEE de EPEC.

Objetivo particular

- Identificar aminoácidos de GrIA importantes tanto en su capacidad de activar a *ler* como en su interacción con GrIR.

Objetivos específicos

- Construir y caracterizar mutantes puntuales en residuos de aminoácidos localizados en el motivo HTH de GrIA.
- Caracterizar el extremo carboxilo terminal de GrIA mediante la construcción y caracterización de proteínas truncadas y proteínas mutantes sitio dirigidas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Tabla 2. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Descripción	Fuente
Cepas de <i>Escherichia coli</i>		
MC4100	F ⁻ , araD139Δ (argF-lac)U169 rpsL150 relA1 flb5301 deoC1 ptsF25 rbsR,	Casadaban, 1976
DH5α	F ⁻ endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r _K ⁻ m _K ⁺), λ ⁻ . Nal ^r .	New England Biolabs
BL21	F ⁻ dcm ompT hsdS(r _B ⁻ m _B ⁻) gal [malB ⁺] _{K-12} (λ ^S)	New England Biolabs
W3110	F ⁻ , λ ⁻ , thyA36 deoC2 IN(rrnD-rrnE)1	Jensen, 1993.
Cepas de EPEC		
EPEC ΔgrlA	<i>Escherichia coli</i> O127:H6 cepa E2348/69 llevando una eliminación en el marco de lectura del gen grlA. Sm ^r .	Villalba, 2006

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Fuente
pler260	Derivado de pKK232-8 conteniendo la región reguladora del gen <i>ler</i> de EPEC del -265 al +216 fusionada al gen reportero <i>cat</i> (cloranfenicol acetiltransferasa).	Villalba, 2006
pMPMT3	Vector de clonación de bajo número de copias. Posee el promotor Plac, inducible por IPTG. Tc ^r .	Mayer, 1995
pMAL-c2X	Vector de clonación diseñado para producir fusiones a la proteína de unión a maltosa (MBP). Promotor Ptac inducible por IPTG. Ap ^r .	Biolabs®
pGST-GrIR	Derivado de pGEX-T41 que expresa a GST-GrIR bajo el control del promotor Ptac inducible por IPTG.	Lara <i>et al.</i> , en preparación.
pTEPGrIA1	Derivado de pMPMT3, contiene la región codificante de <i>grlA</i> de EPEC.	Villalba, 2006.
pTEPGrIA1/S29A	Derivado de pTEPGrIA1, al cual se le cambió la S de la posición 29 por una A.	Este estudio
pTEPGrIA1/C32A	Derivado de pTEPGrIA1, al cual se le cambió	Este estudio

	la C de la posición 32 por una A.	
pTEPGriA1/R41A	Derivado de pTEPGriA1, al cual se le cambió la R de la posición 41 por una A.	Este estudio
pTEPGriA1/Y61A	Derivado de pTEPGriA1, al cual se le cambió la Y de la posición 61 por una A.	Este estudio
pTEPGriA1/R65A	Derivado de pTEPGriA1, al cual se le cambió la R de la posición 65 por una A.	Este estudio
pTEPGriA1Δ125-137	Derivado de pTEPGriA1, al cual se le eliminaron los aminoácidos 125-137 del extremo carboxilo terminal	Este estudio
pTEPGriA1Δ131-137	Derivado de pTEPGriA1, al cual se le eliminaron los aminoácidos 131-137 del extremo carboxilo terminal.	Este estudio
pTEPGriA1/R132A	Derivado de pTEPGriA1, al cual se le cambió la R de la posición 132 por una A.	Este estudio
pTEPGriA1/R133A	Derivado de pTEPGriA1, al cual se le cambió la R de la posición 133 por una A.	Este estudio
pTEPGriA1/K134A	Derivado de pTEPGriA1, al cual se le cambió la K de la posición 134 por una A.	Este estudio
pTEPGriA1/K135AR132K	Derivado de pTEPGriA1, al cual se le cambiaron la R de la posición 132 por una K y la K de la posición 135 por una A.	Este estudio
pTEPGriA1/E136A	Derivado de pTEPGriA1, al cual se le cambió la E de la posición 136 por una A.	Este estudio
pTEPGriA1/R133AK134A	Derivado de pTEPGriA1/R133, al cual se le cambiaron la K de la posición 134 por una A.	Este estudio
pMBP-grIA	Derivado de pMAL-c2X que expresa a MBP-GriA bajo el control del promoto Ptac inducible por IPTG.	Jiménez <i>et al</i> , en preparación.
pMBP-GriA/S29A	Derivado de pMBP-GriA, al cual se le cambió la S de la posición 29 por una A.	Este estudio
pMBP-GriA/C32A	Derivado de pMBP-GriA, al cual se le cambió la C de la posición 32 por una A	Este estudio
pMBP-GriA/R41A	Derivado de pMBP-GriA, al cual se le cambió la R de la posición 41 por una A.	Este estudio
pMBP-grIA/I44A	Derivado de pMBP-GriA, al cual se le cambió la I de la posición 44 por una A.	Jiménez <i>et al</i> , en preparación.
pMBP-GriA/Y61A	Derivado de pMBP-GriA, al cual se le cambió la Y de la posición 61 por una A.	Este estudio
pMBP-GriA/R65A	Derivado de pMBP-GriA, al cual se le cambió la R de la posición 65 por una A.	Este estudio
pMBP-GriAΔ125-137	Derivado de pMBP-GriA, al cual se le eliminaron los aminoácidos 125-137 del extremo carboxilo terminal.	Este estudio
pMBP-GriAΔ131-137	Derivado de pMBP-GriA, al cual se le eliminaron los aminoácidos 131-137 del extremo carboxilo terminal.	Este estudio
pMBP-GriA/R132A	Derivado de pMBP-GriA, al cual se le cambió	Este estudio

	la R de la posición 132 por una A.	
pMBP-GrIA/R133A	Derivado de pMBP-GrIA, al cual se le cambió la R de la posición 133 por una A.	Este estudio
pMBP-GrIA/K134A	Derivado de pMBP-GrIA, al cual se le cambió la K de la posición 134 por una A.	Este estudio
pMBP-GrIA/K135AR132K	Derivado de pMBP-GrIA, al cual se le cambiaron la R de la posición 132 por una K y la K de la posición 135 por una A.	Este estudio
pMBP-GrIA/E136A	Derivado de pMBP-GrIA, al cual se le cambió la E de la posición 136 por una A.	Este estudio
pMBP-GrIA/R133AK134A	Derivado de pMBP-GrIA/R133A, al cual se le cambiaron la K de la posición 134 por una A.	Este estudio

5.2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

- *Luria-Bertani (LB)*: triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 10 g/l.
- *Agar LB*: triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 10 g/l y 15 g de agar.
- *Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)*: medio distribuido por Gibco™ Invitrogen® adicionado con 3.7 g/l de NaHCO₃ y 160 µl/l de piridoxal (25 µg/µl).
- *Medio SOC*: triptona 20 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 0.5 g/l, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₂ 10 mM y glucosa 20 mM.

Las bacterias se cultivaron en medio LB y DMEM adicionados del antibiótico correspondiente y se crecieron en agitación a 37°C (**Tabla 4**). Los diferentes ensayos reportados en este trabajo se realizaron sin agregar IPTG (Isopropil-β-D-tiogalacto piranosido) a menos de que se especifique lo contrario. Cuando se usó IPTG, éste se agregó al inicio del ensayo.

Tabla 4. Concentraciones de antibióticos utilizadas en este trabajo

Antibiótico	Concentración final en medio LB	Concentración final en medio DMEM
Tetraciclina (Tc) 12.5 mg/ml	12.5µg/µl	4.16µg/µl
Ampicilina (Ap) 200mg/ml	200µg/µl	100µg/µl
Estreptomina (St) 100mg/ml	100µg/µl	50µg/µl
Kanamicina (Km) 30mg/ml	30µg/µl	
Ácido nalidíxico (Nal) 25mg/ml	25µg/µl	

5.3. Manipulaciones de ADN

5.3.1. PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

Se realizaron reacciones de PCR para amplificar fragmentos de las secuencias de ADN deseadas. Cada reacción se realizó en un volumen total de 100 µl. La mezcla de reacción contenía ADN molde, desoxirribonucleotidos trifosfato (dNTP's): desoxiadenosina 5'-trifosfato (dATP), desoxicitidina 5'-trifosfato (dCTP), desoxiguanosina 5'-trifosfato (dGTP) y desoxitimidina 5'-trifosfato (dTTP), oligonucleótidos reverso y directo específicos del ADN molde, MgCl₂ (Invitrogen®), amortiguador Taq DNA polimerasa 10X (Invitrogen®) y enzima Taq DNA polimerasa Platinum (Invitrogen®) (**Tabla 4**).

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador GeneAmp® PCR Systems 9700 (Applied Biosystems) en las siguientes condiciones: un ciclo inicial de desnaturalización y activación de la enzima a 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos a las siguientes temperaturas: desnaturalización a 94°C/30 seg., alineamiento entre 53 y 55°C/30 seg. dependiendo de los oligonucleótidos utilizados y extensión a 72°C/30 seg. Por último se aplicó un ciclo final de extensión por 10 minutos a 72°C.

Tabla 5. Composición de las reacciones de PCR

Compuesto	Volumen por 100 μ l de reacción	Concentración final
H ₂ O MQ	77 μ l	-
Amortiguador de PCR 10X	10 μ l	1X
MgCl ₂ 50 mM	5 μ l	2.5 mM
Mezcla de dNTPs 10 mM	2 μ l	0.2 mM
Primer directo 25 μ M	2 μ l	0.5 μ M
Primer reverso 25 μ M	2 μ l	0.5 μ M
ADN molde	2 μ l	100 ng
Taq DNA polimerasa Platinum	0.5 μ l	2.5 U

El tamaño de los productos de las reacciones de PCR se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en comparación con un marcador de peso molecular conocido.

5.3.2. Digestiones de ADN con enzimas de restricción.

Cada digestión se realizó conforme a las condiciones recomendadas por los proveedores de las enzimas. El volumen total utilizado para cada reacción fue variable, dependiendo de la cantidad de enzima y ADN empleado. Aquí se muestra un ejemplo de digestión, con un volumen de reacción final de 20 μ l:

H ₂ O MQ estéril	7 μ l
Amortiguador 10X (Invitrogen®)	2 μ l
Enzima (Invitrogen®)	1 μ l (10U)
ADN	10 μ l

Las digestiones se incubaron a 37°C por aproximadamente 3 horas. Posteriormente, las reacciones se calentaron durante 10 minutos a 65°C para inactivar a las enzimas en caso de que fuera necesario.

5.3.3. Electroforesis por geles de agarosa.

Se preparó una solución de agarosa al 1% (peso/volumen) en amortiguador TAE 1X (Tris Base 40 mM, acetato de sodio 33 mM, EDTA 2 mM). La mezcla se calentó y posteriormente se dejó enfriar hasta una temperatura de aproximadamente 50°C.

Se ensambló el soporte para geles de agarosa y se vertió la solución de agarosa, dejando polimerizar durante 10 minutos. Una vez que el gel solidificó se colocó el soporte en la cámara de electroforesis, la cual se llenó con amortiguador TAE 0.5X y se cargaron las muestras de ADN a analizar. El gel se corrió a 90 V durante 40-60 minutos, dependiendo del tamaño del ADN. Finalmente el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio para posteriormente visualizarse en el transiluminador Alpha-Imager de luz UV.

5.3.4. Ligaciones.

Cada ligación se realizó conforme a las condiciones recomendadas por los proveedores de las enzimas. A continuación se muestran las cantidades de una ligación en un volumen final de reacción de 20 µl :

H ₂ O MQ estéril	6.5 µl
Amortiguador de ligación de DNA 10X (Invitrogen®).....	2 µl
Enzima T4 DNA ligasa (Invitrogen®)	0.5µl (2.5 U)
ADN vector	5 µl
ADN inserto	5 µl

Las mezclas se incubaron a 4°C toda la noche.

5.3.5. Transformación bacteriana por electroporación.

Se colocaron en hielo celdas de electroporación (Gene Pulser® Cuvette) y células electrocompetentes necesarias para la transformación. Se tomaron 4 µl del ADN deseado

y se mezclaron con 100 μ l de células electrocompetentes. La mezcla se transfirió a la celda de electroporación dando un pulso con el electroporador (MicroPulser Bio-Rad®) a 2.5 kV. Se agregó 1 ml de medio SOC a la celda y se mezcló con ayuda de una pipeta. El contenido se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se incubó a 37°C durante 90 min en agitación. Las transformaciones se plaquearon en cajas Petri con medio agar LB adicionado con el antibiótico correspondiente y se incubaron a 37°C toda la noche.

5.4. Células electrocompetentes.

Se inocularon 5 ml de medio LB y sus respectivos antibióticos con la cepa deseada (DH5 α , BL21, MC4100) y se incubó toda la noche a 37°C en agitación.

Al día siguiente a 100 ml de medio LB fresco se le adicionó antibiótico y 1 ml del cultivo de toda la noche. Se incubó a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una D.O_{600nm} de 0.6. El cultivo se distribuyó en dos tubos de 50 ml y se centrifugó a 8000 rpm/5 min/4°C para coleccionar las células. Se descartó el sobrenadante y las pastillas celulares se lavaron dos veces con H₂O MQ estéril fría, y una vez con glicerol estéril al 10%. Finalmente cada pastilla se resuspendió en 1 ml de glicerol al 10% y se hicieron alícuotas de 100 μ l. En este punto las células están listas para transformarse ó bien pueden congelarse a -70°C.

5.5. PCR de colonia.

Se picaron colonias crecidas en cajas con medio sólido y se resuspendieron en 30 μ l de H₂O MQ estéril. Cada colonia se resembró en cajas nuevas a partir de dicha mezcla. Posteriormente, las mezclas se calentaron a 92°C durante 5 minutos y después se centrifugaron durante 2 minutos. Se tomaron 5 μ l del sobrenadante para ser usado como ADN molde. Las reacciones de PCR se realizaron como se describió anteriormente, usando volúmenes finales de 50 μ l. Los productos de PCR se separaron por electroforesis

en gel de agarosa al 1%, agregando 5 μ l de colorante de carga y se tiñieron con una solución de bromuro de etidio.

Composición de las reacciones de PCR para 50 μ l

H ₂ O MQ	34.5 μ l
Amortiguador de PCR 10X	5 μ l
MgCl ₂ 50 mM	2.5 μ l
dNTPs 10 mM	1 μ l
Primer directo 25 μ M	1 μ l
Primer reverso 25 μ M	1 μ l
ADN molde	5 μ l
Taq DNA Altaenzima	2.5 U

5.6. Construcción de mutantes puntuales de GrlA.

5.6.1. Mutantes puntuales en el motivo HTH de GrlA.

Las mutantes puntuales por Alanina se construyeron por PCR sobrelapado (Heckman & Pease, 2007). Se utilizó como ADN templado al gen *grlA* silvestre clonado en el plásmido pMPM-T3 (pTEPGrlA1) (**Fig. 7**). Para introducir las mutaciones deseadas se diseñó un par de oligonucleótidos complementarios con los cambios en el codón correspondiente (**Tabla 5**).

Se realizaron dos reacciones de PCR para cada mutante y una PCR final utilizando una mezcla de los productos de PCR previos como templado, tal como lo ilustra la **figura 7**. En la primera ronda de PCR se utilizó el oligo externo pMPM3RV1 (oligo a) y el oligo mutagénico reverso (oligo b) dando como resultado un fragmento de ADN denominado PCR reverso. En paralelo se hizo otra reacción de PCR con el oligonucleótido externo pMPM3FW1 (oligo c) y el oligonucleótido mutagénico directo (oligo d) que produjo el PCR directo. Los fragmentos de ADN (PCR reverso y PCR directo)

fueron purificados a partir de un gel de agarosa con el estuche comercial Axygen® siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción de PCR final se realizó con los oligos externos e y f (EPCiOrf11H3R y EPGA-XI), usando como ADN molde una mezcla con concentraciones iguales del PCR reverso y directo (**figura 7**). El producto obtenido se purificó por extracción de gel de agarosa, se digirió con las enzimas XhoI y HindIII y ligado en el plásmido pMPMT3, previamente digerido con las mismas enzimas. Las mezclas de ligaciones se introdujeron en células de DH5α por electroporación. Una vez crecidas las colonias, se verificó la presencia del inserto haciendo PCR de colonia. Las colonias seleccionadas se crecieron en medio LB adicionado con Tc para posteriormente aislar el plásmido con el estuche de extracción Roche®. Finalmente la presencia de cada una de las mutaciones se verificó por secuenciación.

Para la generación de los plásmidos con las versiones mutantes de GrlA fusionadas a MBP, cada mutante se reamplificó por PCR a partir de los plásmidos pTEPGrlA1 mutantes con los oligos EPCiOrf11H3R y MBPCrgrlAF. Los productos de PCR se purificaron con el estuche Axygen®, digeridos con las enzimas XbaI y HindIII y ligados en el plásmido pMAL-c2X previamente digerido con las mismas enzimas. Las mezclas de ligaciones se transformaron en células electrocompetentes de DH5 por electroporación. Una vez crecidas las colonias, se verificó la presencia del inserto haciendo PCR de colonia. Las colonias seleccionadas se crecieron en medio LB adicionado con Ap para posteriormente aislar el plásmido con el estuche de extracción Roche®. La conservación del marco de lectura entre *malE* y *grlA*, así como las mutaciones se verificaron por secuenciación.

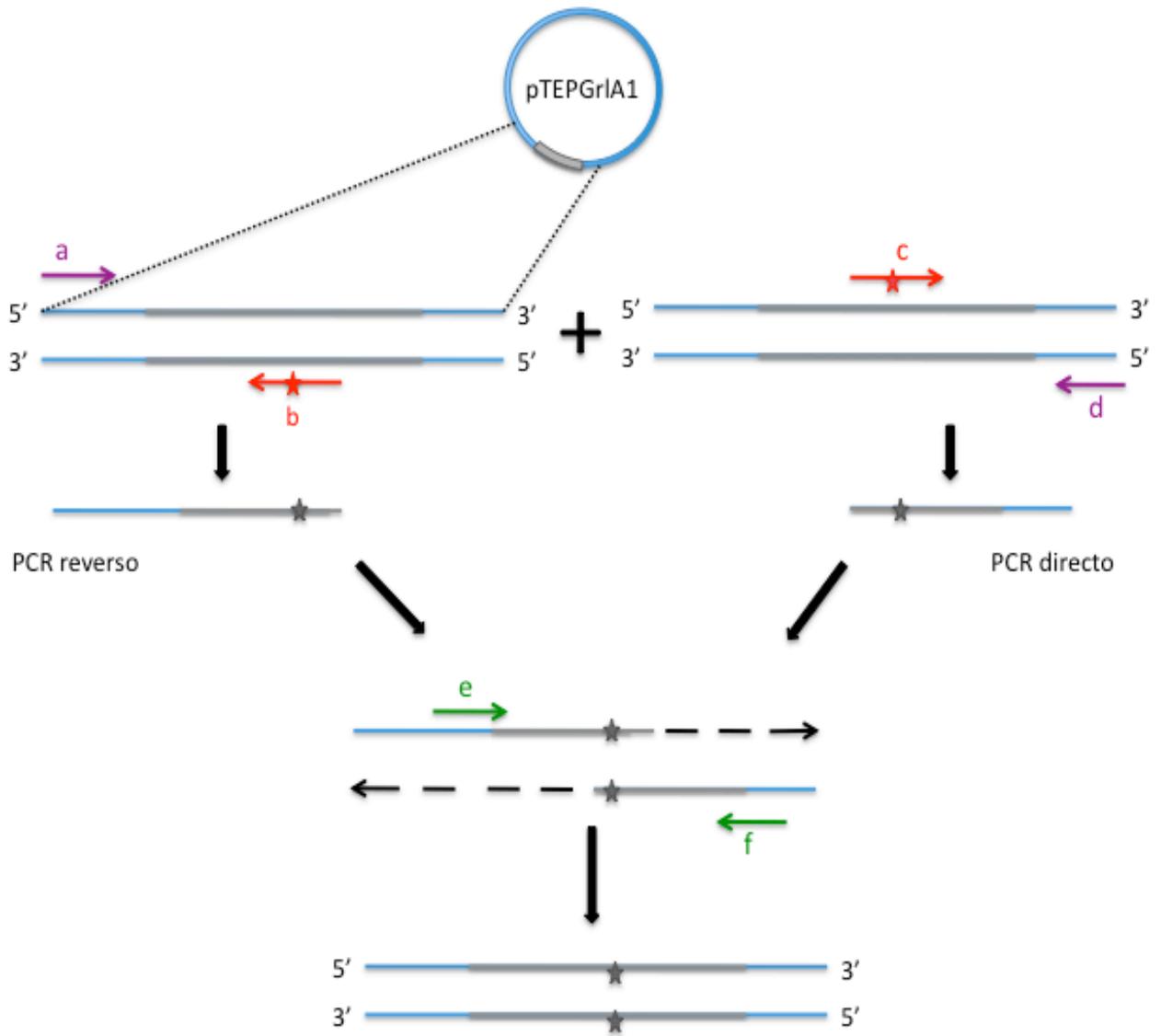


Figura 7. Representación esquemática de la técnica de mutagénesis por PCR sobrelapado. El gen *grlA* (color gris) se encuentra en el plásmido pMPM-T3 (azul). Los oligos externos a y d se unen a la secuencia del vector, mientras que los oligos internos c y b que llevan la mutación deseada se pegan dentro de la secuencia de *grlA*. La reacción de PCR final se realiza mezclando los productos de PCR directo y reverso con los oligos e y f que se unen al inicio y al final de *grlA*.

5.6.2. Eliminaciones y mutantes puntuales en el extremo carboxilo terminal de GrIA.

Para la construcción de eliminaciones y mutaciones puntuales en el extremo carboxilo terminal de la proteína GrIA de EPEC se diseñaron oligonucleótidos reversos complementarios a la región codificante del extremo 3' de *grlA*, introduciendo la

mutación deseada ó un codón de paro, así como un sitio de restricción (**Tabla 5**). Las mutantes se construyeron por PCR utilizando como ADN templado a pTEPGriA1 silvestre; el oligo directo utilizado fue EPGA-XI y como oligo reverso se empleó uno de los diseñados para cada mutación. (**Tabla 5**). El producto obtenido fue purificado, digerido con las enzimas XhoI y HindIII y ligado en el plásmido pMPMT3. Las mezclas de ligaciones se transformaron en células electrocompetentes DH5 α . Una vez crecidas las colonias, se verificó la presencia del inserto y de las colonias seleccionadas se aisló el plásmido para verificar la presencia de las mutaciones por secuenciación.

Cada mutante se reamplificó por PCR para ser clonada en el plásmido pMAL-c2X. Los productos de PCR se purificaron, digirieron y ligaron en el plásmido pMAL-c2X como se describió previamente. Las mezclas de ligaciones se introdujeron en células de DH5 α por electroporación. Una vez crecidas las colonias, se verificó la presencia del inserto haciendo PCR de colonia. Las colonias seleccionadas se crecieron en medio LB adicionado con Ap, para posteriormente realizar extracción del plásmido. Las mutaciones así como la conservación del marco de lectura entre *malE* y *griA* se verificaron por secuenciación.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo*

Oligo	Secuencia (5'→3')
EPGAS29AFW	tatatcttggtGctcttgggtgtaa
EPGAS29ARV	tttacaccaaagagCaaccaagatata
EPGAC32AFW	gtttctcttggGCtaaattgcaggag
EPGAC32ARV	ctcctgcaatttaGCcceaagagaaac
EPGAR41AFW	aatggatttctGCTaatgatattgcc
EPGAR41ARV	ggcaatatcattAGCagaaatccattt
EPGAY61AFW	tttattataactGCTatatcgagaaga

EPGAY61ARV	tcttctcgatatAGCagttataataaa
EPGAR65AFW	tatatatcgagaGCTaaagaaaaaatt
EPGAR65ARV	aatTTTTctttAGCtctcgatatata
EPGA Δ 125RV	TCATAAGCTTCTAgatattgagctgtcc
EPGA Δ 131RV	CCTTAAGCTTCTAcaagatcatttcggt
EPGAR132ARV	CCTTAAGCTTctaactctccttttccgcGCcaagatca
EPGAR133ARV	CCTTAAGCTTctaactctccttttGCcctcaagat
EPGAK134ARV	CCTTAAGCTTctaactctcctttGCccgcctcaa
EPGAK135ARV	CCTTAAGCTTctaactctccGCtttccgctt
EPGAE136ARV	CCTTAAGCTTctaactcGccttttccg
EPGARK133134	CCTTAAGCTTctaactctcctttGCcGCcctcaagatcat
PMPM3FW1	gtgccgtaaagcactaaatcgg
PMPM3RV1	gcggtatcccctgattctgtgg
EPGA-XI	gccaaatttctcgagccattaattat
EPCiOrf11H3R	tactaagaaagcttctgtaactctcc
MBPCrgrIAF	ataaaaagaacatctagaatggaatctaaa

*Las letras mayúsculas indican los cambios introducidos en la secuencia de los oligos respecto a la secuencia silvestre.

5.7. Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).

Se hicieron geles de poliacrilamida al 12% como sigue: se preparó una mezcla para el gel separador (parte inferior del gel), agregando los reactivos en el orden siguiente:

Reactivo	Volumen
H ₂ O MQ	7 ml
Acrilamida/Bis-acrilamida (30/0.8%)	8 ml
Tris-HCl pH 8.8 (1.5 M)	5 ml
PSA 10%	100 μ l
TEMED	14 μ l

La mezcla se homogeneizó y se vertió entre dos vidrios y se dejó polimerizar por 20 minutos. Posteriormente se preparó la mezcla para el gel concentrador (parte superior). Se agregaron los reactivos en el orden siguiente:

Reactivo	Volumen
H ₂ O MQ	6 ml
Acrilamida/Bis-acrilamida (30/0.8%)	1.5 ml
Tris-HCl pH 6.8 (0.5 M)	2.5 ml
PSA 10%	50 µl
TEMED	10 µl

La mezcla se vertió entre los dos vidrios que contenían en gel separador hasta el borde de éstos y luego se insertó un peine para formar los pozos del gel. El gel se dejó polimerizar por aproximadamente 10 minutos; se retiró el peine y posteriormente se ensambló en la cámara de electroforesis vertical, sujetándolo con ayuda de dos pinzas. Se preparó amortiguador de corrida Tris-Glicina-SDS 1X (25 mM Tris Base, 0.2 M Glicina y 0.1% SDS). Se agregó suficiente amortiguador a la cámara de electroforesis, asegurando cubrir la parte superior e inferior del gel. A las muestras a analizar, generalmente extractos celulares, se les agregó amortiguador de carga de proteínas 1X (50 mM Tris-HCl pH 6.8, 12.5% glicerol, 1% de SDS, 1% de β-mercaptoetanol, 0.02% de azul de bromofenol). Estas muestras, así como el marcador de proteínas se calentaron a 92°C por 5 minutos antes de ser cargadas. Se conectaron los electrodos y el gel se corrió a 30 mA por aproximadamente 4 horas. Cuando el gel hubo corrido lo deseado se quitó de la cámara y se removió de los vidrios. Después se tiñó con azul de Coomassie agregando previamente fijador de Coomassie, y se calentó hasta ebullición 2 veces. El gel se destiñó con H₂O.

5.8. Inmunodetección de proteínas (Western Blot).

Las muestras a analizar se separaron en SDS-PAGE y posteriormente se midió el tamaño del gel a transferir. Por otro lado, se cortaron 6 piezas de papel filtro Whatman un poco más grandes que el gel y se cortó un pedazo de membrana de Nitrocelulosa (Millipore) del

mismo tamaño que el gel. La membrana y el gel se sumergieron unos minutos en amortiguador de transferencia (48 mM Tris Base, 39 mM Glicina, 0.0375% de SDS y 20% de metanol). Se utilizó una cámara de transferencia semi-seca Bio-Rad®, la cual se humedeció con H₂O MQ antes de usarse. Se colocaron tres de las piezas de papel Whatman previamente humedecidos con amortiguador de transferencia sobre la superficie de la cámara, enseguida la membrana, después el gel y finalmente otras tres piezas de papel filtro humedecidas. Se eliminaron las posibles burbujas de aire formadas entre las capas y se corrió la transferencia a 15 V por una hora.

Terminada la transferencia, la membrana se bloqueó con Leche Carnation sin grasa al 5% en PBST [PBS 1X (0.13 mM NaCl, 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄, 2.7 mM KCl) y 0.3% de Tween 20] a temperatura ambiente por lo menos una hora.

La membrana se lavó tres veces durante 10 minutos con PBST. Posteriormente se adicionó una dilución 1:10000 del anticuerpo primario α DNaK, α MBP ó α Tir y se incubó en agitación por 4 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, la membrana se lavó tres veces durante 10 minutos con PBST. Se preparó la dilución 1:10000 del anticuerpo secundario anti-inmunoglobulina G de conejo ó anti-inmunoglobulina G de ratón en PBST. Se incubó por una hora en agitación a temperatura ambiente.

La membrana se lavó cuatro veces durante 10 minutos con PBST y posteriormente se eliminó el exceso de PBST. Para revelar, a la membrana se le agregó luminol y reactivo oxidante (Western Lightning PerkinElmer) en proporción 1:1 y se dejó incubando un minuto en agitación a temperatura ambiente, asegurándonos de embeber toda la membrana en la solución. Enseguida, en un cuarto oscuro, la membrana se expuso en una película fotográfica Kodak X-omat durante el tiempo adecuado dependiendo de la señal emitida.

5.9. Perfil de proteínas secretadas.

Las cepas de interés se cultivaron en medio LB con el antibiótico correspondiente durante toda la noche a 37°C en agitación. Posteriormente se subcultivaron en matraces de 250 ml conteniendo 50 ml de medio DMEM y el antibiótico correspondiente así como 1% de medio LB. Se tomó 1.5 ml de muestra cuando los cultivos alcanzaron una D.O.₆₀₀ de 0.8. y se centrifugaron a 13000 r.p.m en una microcentrífuga Eppendorf 5417C durante 5 minutos. Se transfirió 1.3 ml del sobrenadante a un tubo Eppendorf limpio y posteriormente se le agregó 10% de ácido tricloro acético (TCA). Los tubos se dejaron incubando 1 hora en hielo. Por otro lado, las pastillas se resuspendieron en 200 µl de amortiguador de carga de proteínas 1X, se calentaron por 5 minutos a 92°C y se corrieron en un gel de poliacrilamida para realizar Western Blot.

Las proteínas fueron colectadas por centrifugación a 14 000 r.p.m durante 30 minutos; posteriormente se descartó el sobrenadante y se dejaron secar la pastillas, las cuales se resuspendieron en 4 µl de Tris 1 M pH 11 y 15 µl de amortiguador de carga 1X de proteínas. Las proteínas precipitadas se calentaron por 5 minutos a 92°C y se sometieron a separación en SDS-PAGE.

5.10. Cuantificación de la actividad de CAT (Cloranfenicol acetil-transferasa).

Los plásmidos con las mutaciones de interés se transformaron en células electrocompetentes de *E. coli* MC4100 conteniendo la fusión transcripcional *ler-cat* (pler260). Se sembraron las cepas transformadas en tubos de ensayo de 5 ml de medio LB y el antibiótico correspondiente, dejándolas crecer toda la noche a 37°C en agitación. Posteriormente se inocularon 500 µl de estos cultivos en matraces de 250 ml con 50 ml de DMEM, suplementados con 1% de LB y el antibiótico correspondiente. Los cultivos se dejaron crecer a una D.O.₆₀₀ de 1 y en este punto se tomó 1 ml de los mismos. Las

muestras se centrifugaron a 13 000 r.p.m durante 2 minutos a 4°C, se retiró el sobrenadante y la pastilla celular se lavó con un 1 ml de solución TDTT (50 mM Tris-HCl pH 7.8, 30 μ M DL-ditiotritol). Las pastillas lavadas se resuspendieron en 1 ml de solución TDTT para luego sonicarlas con un sonicador SONIPREP, utilizando pulsos de 9.9 segundos con descansos de 5.0 segundos durante tres minutos. Las muestras se centrifugaron a 12 000 r.p.m a 4°C por 20 minutos. El sobrenadante (extracto crudo) se transfirió a un tubo Eppendorf limpio.

Para determinar la concentración de proteína se utilizó el estuche comercial BCA (Pierce). Se colocaron 10 μ l de cada muestra por duplicado en una placa de 96 pozos. Se agregaron 200 μ l de la mezcla de reacción (25 ml de la solución A + 500 μ l de la solución B). Posteriormente se incubó la placa a 37°C por 30 minutos. La lectura de absorbancia se llevó a cabo a una longitud de onda de 562 nm en el lector automatizado de placas CERES 900C en el paquete computacional KC3 jr.

Para determinar la actividad enzimática de CAT se colocaron 5 μ l de cada muestra por duplicado en una placa de 96 pozos. Posteriormente se agregaron 200 μ l de la mezcla de reacción Tris-HCl 0.1 M pH 7.8, DTNB 5.5 '-ditio-bis (2-ácido nitrobenzoico) 1 mM, acetilcoenzima A 0.1 mM, cloranfenicol 0.1mM. La cinética de actividad enzimática de CAT se determinó a una absorbancia de 410 nm con lecturas cada 5 segundos, durante 5 minutos utilizando el lector CERES 900C y el paquete computacional KC3 jr. La actividad específica de CAT de cada muestra se determinó dividiendo la actividad enzimática entre la concentración de proteína.

5.11. Ensayo de interacción de proteína-proteína mediante “Pull-down”.

5.11.1. Preparación de extractos celulares.

Para el ensayo de pull down se utilizaron las mutantes de GrIA fusionadas a MBP (MBP-GrIA) expresadas a partir del plásmido pMAL-c2X así como GrIR fusionada a la proteína Glutación S Transferasa (GST-GrIR) y GST expresadas a partir del plásmido pGEX-4T1. Para la preparación de extractos celulares se inocularon los cultivos bacterianos deseados en 5 ml de medio LB adicionando el antibiótico correspondiente y se incubaron toda la noche a 37°C en agitación. Posteriormente a partir de dichos cultivos se inocularon matraces con 50 ml de LB, 0.2% de glucosa y el antibiótico correspondiente y se continuó el crecimiento a 37°C. Cuando los cultivos alcanzaron una D.O.₆₀₀ de 0.6, se indujo la expresión de las proteínas recombinantes con IPTG a una concentración de 0.3mM para los plásmidos derivados de pMAL-c2X y 0.5 mM para los de pGEX4T1. La inducción se dejó toda la noche.

Se recuperó la pastilla celular por centrifugación a 8000 r.p.m/4°C/5 min; luego se lavó con 20 ml de PBS 1X frío y se descartó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 2 ml de PBS 1X frío y se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos Eppendorf de 1.5 ml. Cada tubo se sonicó con pulsos de 9.9 segundos y 5 segundos de descanso durante 10 minutos o hasta que el extracto quedara claro. Los tubos se centrifugaron a 12000 r.p.m. a 4°C durante 10 minutos para separar los restos celulares, y el sobrenadante final se transfirió a un tubo limpio.

5.11.2. Preparación de la resina de Glutación Sefarosa™ (GS).

Se tomaron 500 µl de la resina Glutación Sefarosa (Amersham Biosciences) por cada ensayo de *pull down* (esta cantidad varió dependiendo de las interacciones a probar), se lavó con 1 ml de PBS 1X frío a 6000 r.p.m/4°C/1 minuto y el sobrenadante se desechó

con ayuda de una pipeta repitiendo el procedimiento 3 veces. Finalmente se adicionaron 500 μ l de PBS 1X.

5.11.3. Unión de las proteínas GST y GST-GrIR a la resina GS.

Se adicionaron aproximadamente 150 μ l del extracto crudo de GST a un tubo con 50 μ l de resina previamente lavada, mientras que al resto de los tubos se les agregó 400 μ l del extracto GST-GrIR. Los tubos se dejaron 1 hora a 4°C con agitación (captura por la resina, **Fig. 8**). Al término de ese tiempo se centrifugaron a 6000 r.p.m/4°C/1 minuto. Enseguida se decantó el sobrenadante y la resina se lavó con 1 ml de PBS 1X frío 5 veces.

5.11.4. Captura de la proteína blanco fusionada a MBP.

Se adicionaron 800 μ l del extracto crudo de la proteína MBP-GrIA silvestre al tubo conteniendo el complejo resina-GST y a uno con resina-GST-GrIR, mientras que al resto de los tubos con resina-GST-GrIR se adicionaron los extractos de cada una de las mutantes de GrIA fusionadas a MBP. Los tubos se dejaron 2 horas a 4°C en agitación. Al término de este tiempo, se centrifugaron a 6000 r.p.m/4°C/1 minuto y se decantó el sobrenadante. La resina se lavó con 1 ml de PBS 1X frío 5 veces (lavado del complejo, **Fig. 8**). Finalmente los complejos proteicos resultantes se resuspendieron en 200 μ l de amortiguador de carga de proteínas 1X y las muestras se corrieron en SDS-PAGE como se describió anteriormente.

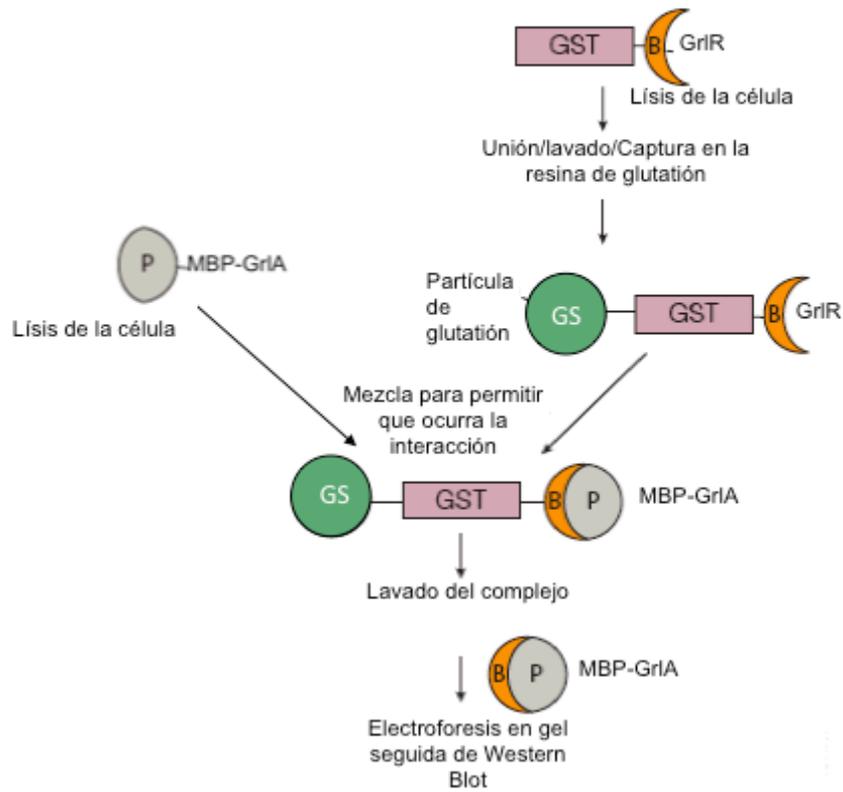


Figura 8. Representación esquemática del ensayo de “pull-down”. La proteína GST-GrIR se unió a las partículas de Glutación Sefarosa (GS) y el complejo se lavó, posteriormente se adicionaron los extractos de las proteínas MBP-GrIA silvestre y mutantes. Las mezclas se lavaron para eliminar proteínas unidas inespecíficamente y los complejos resultantes se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida. Modificado de Promega Corporation.

6. RESULTADOS

6.1. Diseño de mutaciones puntuales en el motivo HTH de GrIA.

GrIA es una proteína reguladora de genes de virulencia con función dual, siendo capaz por un lado de activar a *ler* uniéndose directamente a su región reguladora y por otro de interactuar con el represor GrIR contrarrestando la represión ejercida por éste (Jiménez *et al.*, en preparación; Lara *et al.*, en preparación). Además, GrIA está implicada en la regulación de otros blancos fuera del contexto de LEE (Iyoda *et al.*, 2006; Saitoh *et al.*, 2008). Debido a la importancia de esta proteína para la expresión de *ler* y por tanto en la patogenicidad de los miembros de la familia A/E, en este trabajo realizamos mutagénesis sitio-dirigida para identificar residuos de aminoácidos de GrIA involucrados en las funciones relacionadas a la regulación de los genes de virulencia en EPEC.

Como parte de la caracterización molecular de GrIA, previamente en el laboratorio se realizaron mutaciones puntuales en residuos no conservados y conservados de esta proteína con sus homólogos SHG y CaiF. La mayor parte de estos residuos se encuentran ubicados a lo largo de la secuencia correspondiente al motivo de unión a ADN (HTH). Los aminoácidos escogidos se cambiaron por Alanina, y las mutaciones realizadas fueron en la Prolina 23 (P23A), Leucina 24 (L24A), Tirosina 25 (Y25A), Triptofano 31 (W31A), Asparagina 42 (N42A), Isoleucina 44 (I44A), Ácido glutámico 46 (E46A), Fenilalanina 48 (F48A), Isoleucina 50 (I50A), Leucina 52 (L52A), Arginina 54 (R54A) y Serina 56 (S56A). Las mutantes W31A, I44A, F48A e I50A perdieron su capacidad de activar a *ler* y de complementar a EPEC Δ *grIA*, así como la capacidad de interactuar con GrIR. Las mutantes Y25A y R54A sólo perdieron la capacidad de activar a *ler* y de complementar a EPEC Δ *grIA*, mientras que la mutante L24A perdió únicamente la interacción con GrIR. El resto de las mutaciones (P23A, N42A, E46A, L52A y S56A) no

mostraron ningún efecto en la capacidad de la proteína de activar a *Ier* ni en la interacción con GrIR (Jiménez *et al.*, en preparación).

Teniendo en cuenta estos datos, se llevó a cabo la proyección de la distribución de los aminoácidos que componen las alfa hélices del HTH de GrIA, usando el programa computacional Helical Wheel Applet (http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheel_instructions). De acuerdo a dicha distribución se localizaron los residuos en los que se hicieron las mutaciones puntuales: los cambios en las posiciones L24A, Y25A, W31A se encuentran en la hélice II; las mutaciones N42A, I44A, E46A y F48A en la hélice III y las mutaciones R54A y S56A se ubican en la hélice IV (**Fig. 9**). Se considera que las tres hélices de un motivo HTH contribuyen al contacto de la proteína con el ADN, aunque la especificidad de la secuencia de unión se presume se encuentra mayoritariamente en la tercera (hélice IV de GrIA) (Huffman y Brenna, 2002; Aravind *et al.*, 2005).

En el presente trabajo se diseñaron cambios puntuales en aminoácidos localizados dentro del motivo de unión a ADN de GrIA, específicamente en la Serina 29 (S29), Cisteína 32 (C32), Arginina 41 (R41), Tirosina 61 (Y61) y Arginina 65 (R65) (**Fig. 9**). El criterio para la selección de los aminoácidos a mutar se basó en la localización que éstos presentaron sobre una misma cara de las hélices del HTH respecto a otros residuos previamente mutados y que mostraban afectar la función de la proteína y/o su capacidad de interactuar con GrIR. Los residuos S29 y C32 se encuentran en la misma cara de la hélice II que la mutante inactiva Y25A, el residuo R41 se encuentra en la misma cara de la hélice III que las mutantes inactivas I44A y F48A, y finalmente los aminoácidos Y61 y R65 se localizan en la misma cara de la hélice IV que la mutante inactiva R54A (**Fig. 9**). Los residuos elegidos se substituyeron por Alanina, un aminoácido pequeño que no cuenta con grupo funcional reactivo y que mantiene estructuras tridimensionales debido a su tendencia a formar racimos fuera del agua (Horton *et al.*, 2002).

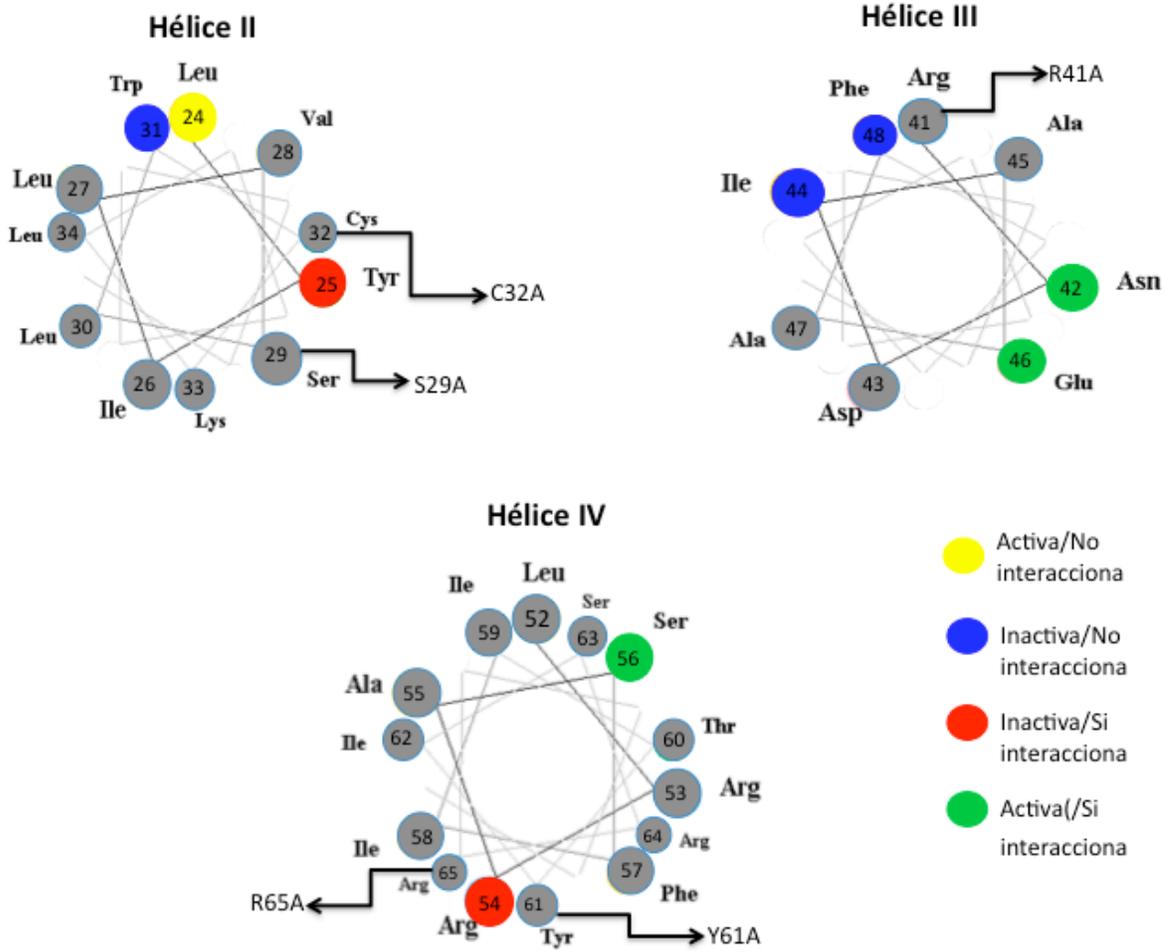


Figura 9. Distribución de los aminoácidos de las hélices del motivo HTH de GrlA de EPEC. En la parte superior de cada hélice se muestra el número de hélice que le corresponde de acuerdo a la predicción de estructura secundaria. El diagrama señala el acomodo de los residuos siguiendo un plano tridimensional. Los colores representan los fenotipos de las mutaciones puntuales que se construyeron previamente y las flechas señalan las posiciones de las mutaciones diseñadas en este trabajo.

Las mutaciones diseñadas se construyeron por PCR sobrelapado, amplificando la región codificante de *grlA* a partir del plásmido pTEPGrlA1 silvestre usando oligonucleótidos específicos que introdujeron la mutación puntual deseada, tal como se describe en materiales y métodos. Los productos de PCR obtenidos se purificaron, digirieron y ligaron en el vector pMPM-T3. Las mezclas de ligación se transformaron en *E. coli* (MC4100 ó DH5 α), se seleccionaron algunas colonias que fueron sometidas a PCR

de colonia y a extracción de plásmidos recombinantes para identificar la presencia del *grlA*. La integridad del inserto así como la presencia de cada una de las mutaciones puntuales se verificó por secuenciación de los plásmidos resultantes pTEPGrlA1/S29A, pTEPGrlA1/C32A, pTEPGrlA1/R41A, pTEPGrlA1/Y61A y pTEPGrlA1/R65A.

6.2. Los residuos Y61 y R65 de GrlA son importantes para activar la expresión de *ler* en *E. coli* MC4100.

El efecto de las mutaciones puntuales dentro del motivo HTH en la función de GrlA se evaluó por su capacidad de promover la expresión de una fusión de *ler* al gen reportero *cat*. La fusión utilizada fue *ler-cat* (pler-260), la cual abarca de los nucleótidos -265 a +216 respecto al inicio de la transcripción de *ler* de EPEC, y se ha demostrado que contiene todos los elementos necesarios para su regulación (Villalba, 2006).

La expresión de la fusión transcripcional *ler-cat* se analizó en una *E. coli* cepa MC4100, la cual es una cepa de laboratorio que al no poseer la isla LEE permite analizar directamente la función de GrlA sobre la expresión de *ler* cuando ambas se expresan a partir de plásmidos. MC4100 (pler-260) se transformó con los plásmidos que expresan a GrlA silvestre pTEPGrlA1 wt y con cada una de las mutantes puntuales pTEPGrlA1/S29A, pTEPGrlA1/C32A, pTEPGrlA1/R41A, pTEPGrlA1/Y61A y pTEPGrlA1/R65A, así como el vector solo pMPMT3. Como se muestra en la **figura 10A**, el plásmido que lleva a GrlA silvestre fue capaz de activar la expresión de *ler*, a diferencia de aquella que sólo lleva el vector pMPMT3, tal como se ha observado previamente (Villalba, 2006; Jiménez *et al.*, en preparación). Las mutantes S29A, C32A y R41A conservaron la capacidad de activar a *ler* a nivel similar o incluso un poco más alto que el de la proteína silvestre. Esto indica que los residuos S29, C32 y R41 de GrlA no están involucrados en la activación de *ler* en *E. coli* MC4100. Por el contrario, la mutación en el aminoácido Y61 abatió completamente la

capacidad de la proteína de promover la expresión de *ler*, mientras que para la mutante en el aminoácido R65, el nivel de actividad de la fusión transcripcional *ler-cat* fue aproximadamente 1/3 del mostrado por GrIA silvestre. Estos resultados sugieren que los residuos Y61 y R65 de GrIA son importantes para activar la expresión de *ler* en *E. coli* MC4100.

Con el fin de analizar el efecto de las mutantes directamente en EPEC, los plásmidos pTEPGrIA1 y pTEPGrIA1/S29A, C32A, R41A, Y61A y R65A se transformaron en EPEC Δ *grIA*, para analizar su capacidad de complementar a dicha cepa mediante el perfil de proteínas secretadas. En el perfil de secreción típico de EPEC se detectan principalmente las proteínas formadoras del translocón (EspA, EspB y EspD) y el autotransportador EspC, cuya expresión depende directamente de Ler. La **figura 10B** muestra los resultados obtenidos, en donde el plásmido que expresa la proteína silvestre GrIA fue capaz de complementar a EPEC Δ *grIA* y no así el vector solo. Por otro lado, las proteínas mutantes expresadas a partir de los plásmidos pTEPGrIA1/Y61A y pTEPGrIA1/R65A no fueron capaces de complementar a EPEC Δ *grIA*, mientras que las proteínas expresadas de los plásmidos pTEPGrIA1/S29A, C32A y R41A restauran la secreción de las proteínas EspC, EspB, EspD y EspA, como lo hace GrIA silvestre. Estos resultados son consistentes con lo observado con las fusiones transcripcionales y refuerzan la idea que los aminoácidos Y61 y R65 son importantes para la función de GrIA en EPEC.

Dado que a la fecha no se cuenta con ningún anticuerpo capaz de reconocer específicamente a GrIA y por lo tanto no podemos monitorear la producción de la proteína expresada a partir del plásmido pTEPGrIA1, se decidió fusionar cada una de las mutantes de GrIA a la proteína de unión a maltosa (MBP); la obtención de las proteínas recombinantes MBP-GrIA/mutante nos permite monitorear su expresión con anticuerpos anti-MBP.

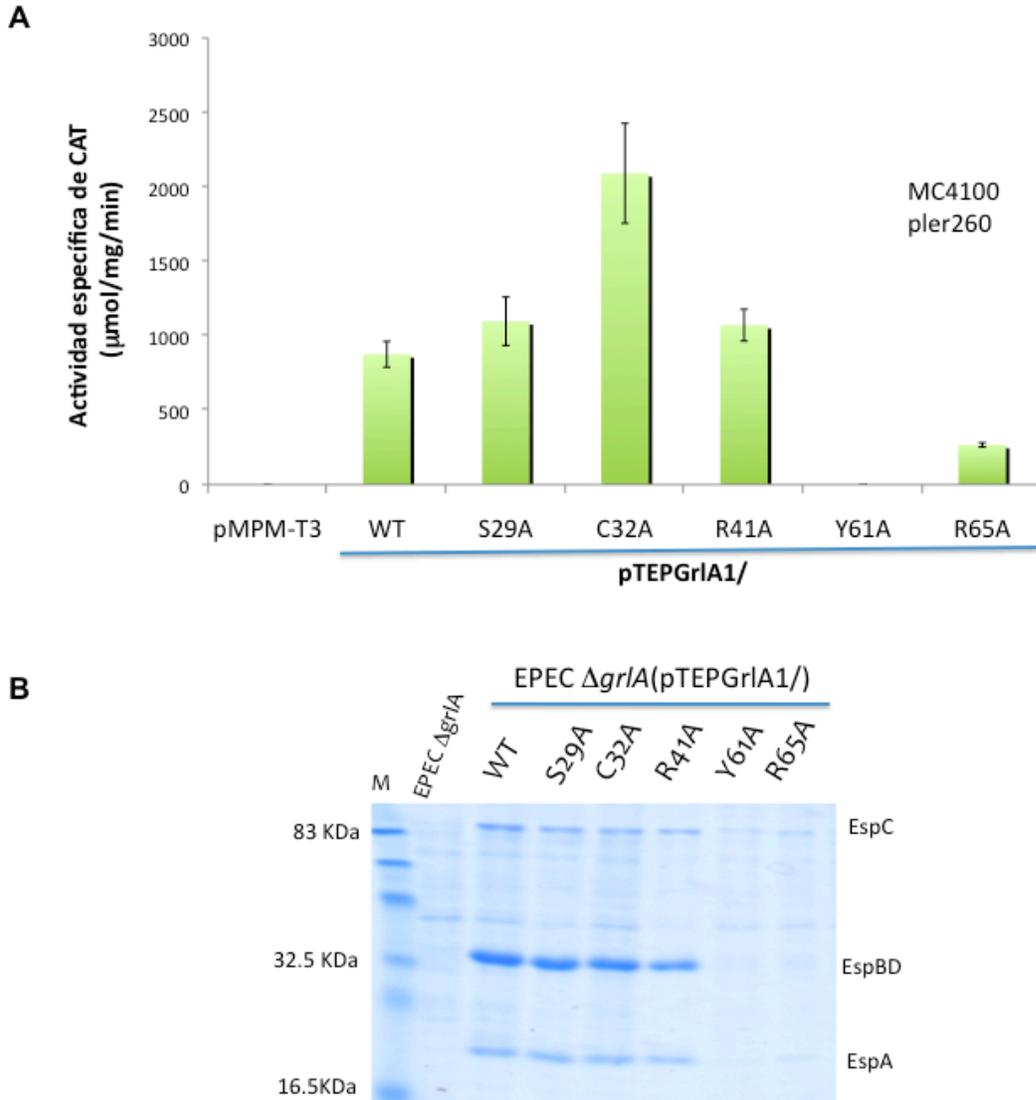


Figura 10. A. Análisis del efecto de las mutaciones puntuales del motivo HTH en la función de GriA. La expresión de la fusión *ler-cat* fue monitoreada en la cepa de *E. coli* MC4100 (MC4100 pler260) en presencia de vector pMPPM-T3, pTEPGriA1 silvestre (wt), y cada una de las mutantes puntuales pTEPGriA1/S29A, C32A, R41A, Y61A y R65A. Se determinó la actividad específica de CAT a partir de muestras colectadas de cultivos bacterianos crecidos a 37°C en medio DMEM en agitación $D.O_{600}$ de 1. Los valores representan el promedio de al menos tres experimentos independientes hechos por duplicado y se muestra la desviación estandar. **B.** Perfil de secreción de EPEC $\Delta grlA$ complementada con las mutantes de GriA S29A, C32A, R41A, Y61A y R65A. Los cultivos de EPEC $\Delta grlA$ transformada con los plásmidos pTEPGriA1(wt), pTEPGriA1/S29A, C32A, R41A, Y61A y R65A fueron crecidos a 37°C en medio DMEM en agitación hasta una $D.O_{600nm}$ de 0.8, a la cual se tomaron las muestras. Las proteínas secretadas se precipitaron con 10% de TCA a partir de 1.3 ml de sobrenadante colectado después de centrifugación. Las proteínas precipitadas se separaron en un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) y teñidas con azul de Coomassie. En el lado izquierdo de la figura se muestra el marcador de peso molecular de proteínas (M), así como el peso de algunas bandas, mientras que en el lado derecho se indica el nombre de las proteínas características del perfil de secreción de EPEC.

Para esto se amplificó por PCR cada una de las mutantes de *grlA* a partir de los plásmidos pTEPGrlA1/S29A, C32A, R41A, Y61A y R65A. Los productos de PCR obtenidos se purificaron, digirieron y se ligaron en el vector pMAL-c2X. Las mezclas de ligación se transformaron en *E. coli* DH5 α y algunas colonias obtenidas se sometieron a PCR de colonia y a extracción de plásmidos para verificar la presencia de *grlA*. La conservación del marco de lectura entre *mbp* y *grlA* así como la presencia de cada una de las mutaciones se verificó por secuenciación. Los plásmidos resultantes pMBP-GrlA/S29A, pMBP-GrlA/C32A, pMBP-GrlA/R41A, pMBP-GrlA/Y61A y pMBP-GrlA/R65A se transformaron en EPEC Δ *grlA* para evaluar su capacidad de complementar a dicha cepa y analizar su producción.

Como se puede ver en la **figura 11**, todas las mutantes fusionadas a MBP (MBP-GrlA/S29A, C32A, R41A, Y61A y R65A) fueron capaces de complementar a EPEC Δ *grlA*, pues todas restauran el perfil de secreción de la misma forma que lo hace la versión silvestre de GrlA (pMBP-GrlA wt). Con el objeto de analizar la expresión de las proteínas recombinantes, se tomaron muestras de cultivo para detectar la producción de MBP por medio de “*western blot*” con anticuerpos anti-MBP. Tal como lo muestra el panel inferior de la **figura 11**, se encontró que todas las mutantes se expresaron a niveles similares que la proteína silvestre. La discrepancia entre los datos obtenidos en el ensayo de activación transcripcional y de complementación con los plásmidos derivados de pMPM-T3 (**Fig. 10A y B**) y el ensayo de complementación con los plásmidos derivados de pMAL-c2X (**Fig. 11**) sugiere que las mutaciones en los residuos Y61 y R65 afectaron la función de GrlA, pero que la fusión a MBP probablemente esté favoreciendo su funcionalidad. Esto podría llevarse a cabo ya sea por un aumento en la estabilidad de las proteínas o simplemente por el nivel de expresión (considerablemente mayor) que alcanzan cuando se expresan como proteínas de fusión.

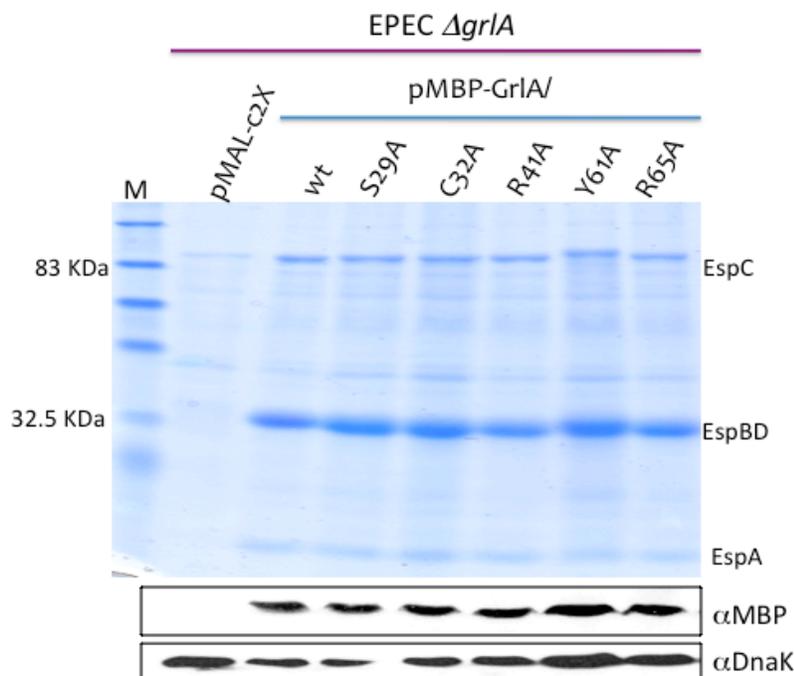


Figura 11. Perfil de secreción de EPEC $\Delta grlA$ complementada con las mutantes puntuales del HTH fusionadas a MBP. Los cultivos bacterianos de EPEC $\Delta grlA$ transformada con los plásmidos pMAL-c2X, pMPB-GrIA wt, pMBP-GrIA/S29A, C32A, R41A, Y61A y R65 fueron crecidos a 37°C en medio DMEM en agitación hasta alcanzar una D.O_{600nm} de 0.8 y en este punto se tomaron las muestras. Las proteínas secretadas se precipitaron y se separaron en SDS-PAGE para después ser teñidas con azul de Coomassie. Se muestra el marcador de peso molecular de proteínas (M), y en el lado derecho se indican las proteínas secretadas por EPEC. En la parte inferior se muestra la inmunodetección de MBP-GrIA silvestre y mutantes a partir de los lisados totales de las células de las mismas muestras tomadas para el perfil de secreción con anticuerpos α -MBP y como control de carga se inmunodetectó a la proteína DnaK con anticuerpos α -DnaK.

Con la finalidad de analizar si el nivel de expresión (sobre-expresión) de las proteínas mutantes opacaba el efecto de las mutaciones puntuales, los plásmidos pTEPGrlA1/Y61A y R65A se transformaron en EPEC $\Delta grlA$, así como los controles pMPM-T3 y pTEPGrlA1 WT y la producción de GrIA en esta cepa se indujo con 1mM de IPTG. De manera interesante, las mutantes Y61A y R65A bajo condiciones de inducción fueron capaces de complementar a EPEC $\Delta grlA$ y restablecer el perfil de secreción característico (**Fig. 12A**) Además, la mutante pTEPGrlA1/R65A inducida fue capaz de aumentar la expresión de la fusión *ler-cat* aproximadamente tres veces con respecto a la no inducida, lo cual representó aproximadamente el 50% de actividad de pTEPGrlA1

silvestre (**Fig. 12B**). Esto datos apuntan que el efecto de las mutaciones puntuales puede enmascarse si las proteínas se expresan en mayor cantidad, como se logra al ser inducidas con IPTG.

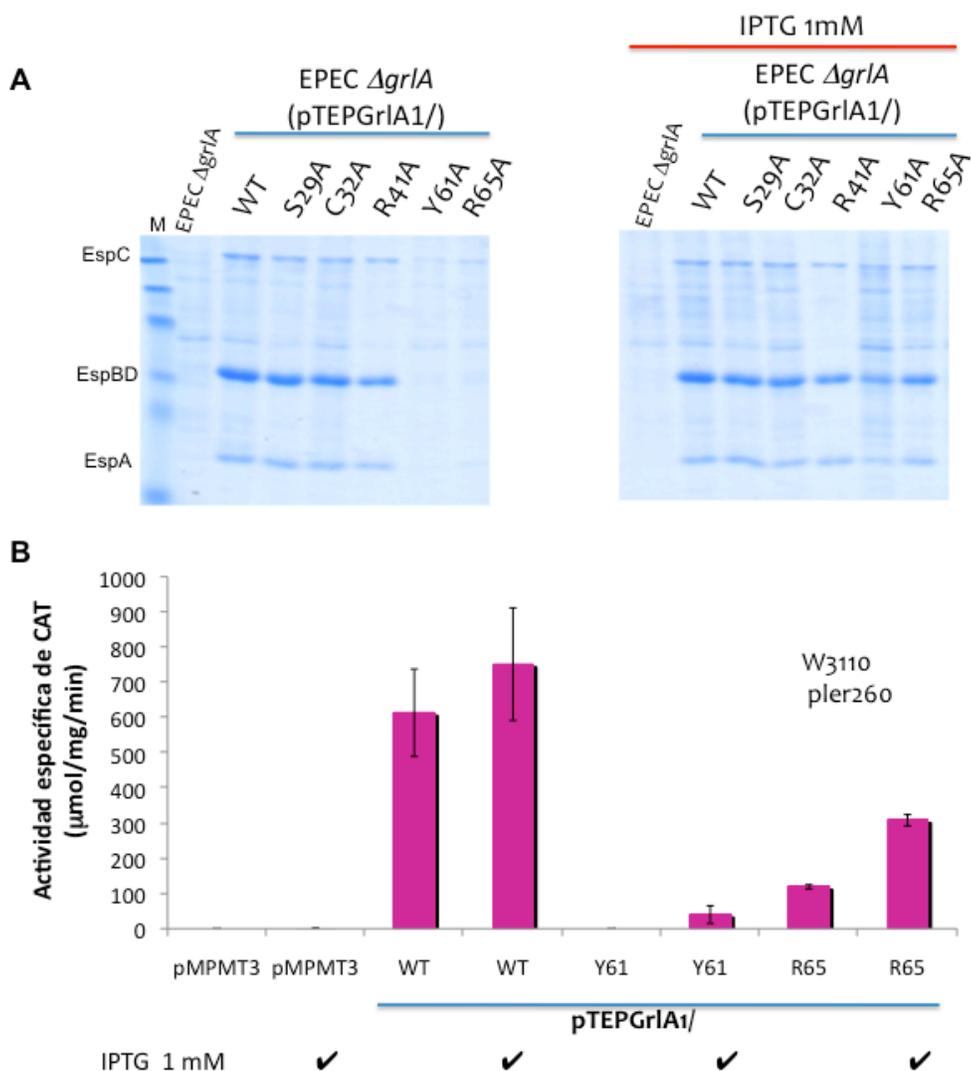


Figura 12. Sobre-expresión de las mutantes puntuales del HTH de GrlA. **A.** Perfil de secreción de EPEC Δ grlA complementada con los plásmidos pTEPGrlA1 silvestre (wt), pTEPGrlA1/S29A, C32A, R41A, Y61A y R65A. Los cultivos se inocularon por duplicado y se crecieron a 37°C en medio DMEM adicionado o no con 1 mM de IPTG, en agitación hasta una D.O_{600nm} de 0.8 a la cual se tomaron las muestras. Las proteínas secretadas se precipitaron y se separaron en SDS-PAGE para después ser teñidas con azul de Coomassie. Se muestra el marcador de peso molecular de proteínas (M), y en el lado derecho se indican las proteínas secretadas por EPEC. **B.** La expresión de la fusión *ler-cat* fue monitoreada en *E. coli* W3130. Los cultivos fueron crecidos a 37°C en medio DMEM adicionado o no con 1 mM de IPTG, en agitación hasta alcanzar una D.O_{600nm} de 1. Los valores representan los promedios de al menos tres experimentos independientes hechos por duplicado y se muestra la desviación estándar.

6.3. Los residuos S29, C32, R41, Y61 y R65 de GrIA no participan en la interacción con el represor GrIR.

En el 2003 Creasey y colaboradores, mediante ensayos de interacción proteína-proteína con el sistema de dos híbridos de levaduras, encontraron que GrIR de EPEC es capaz de interactuar consigo mismo y que también forma heterodímeros con GrIA (Creasey et al., 2003). Esta interacción también ha sido demostrada por ensayos tipo “pull-down” (Jobichen et al., 2007; Huang et al., 2008; Jiménez et al., en preparación).

Teniendo por objetivo analizar el impacto de las mutaciones puntuales de GrIA en la interacción con el represor GrIR, los plásmidos pMBP-GrIA wt, pMBP-GrIA/S29A, C32A, R41A, Y61A y R65A se transformaron en *E. coli* DH5 α en donde las proteínas fusionadas a MBP fueron sobre-expresadas. De igual forma la proteína GST-GrIR se sobre-expresó en *E. coli* BL21, y posteriormente se prepararon extractos totales de estas bacterias. Adicionalmente se sobre-expresaron las proteínas MBP-grIA/I44A y GST en *E. coli* BL21; estas proteínas se utilizaron como controles negativos del ensayo. MBP-GrIA/I44A lleva una mutación puntual por Alanina en la Isoleucina 44, lo que provoca la pérdida de la interacción GrIA-GrIR (Jiménez et al., en preparación). Para el ensayo de “pull down” GST-GrIR se unió a la resina glutatión sefarosa y después se adicionaron los extractos que contenían a MBP-GrIA wt y cada mutante de GrIA. Estas mezclas se lavaron para eliminar las proteínas unidas inespecíficamente y finalmente los complejos proteicos resultantes se separaron por SDS-PAGE.

Se constató que MBP-GrIA silvestre es capaz de interactuar con GST-GrIR y no lo hace con GST sola (**Fig. 13**) tal como se ha visto anteriormente (Jiménez et al, en preparación). Por otro lado, se encontró que todas las proteínas mutantes MBP-GrIA/S29A, C32A, R41A, Y61A y R65A conservaron la interacción con GST-GrIR de manera similar a como lo hace MBP-GrIA silvestre, sugiriendo que estos residuos no se localizan en la interfase de interacción entre GrIA y GrIR (**Fig. 13**). El análisis de la

producción de las proteínas usadas en el experimento de “pull-down” con anticuerpos α -MBP indicó que todas se expresaron a un nivel similar (**Fig. 13** panel inferior).

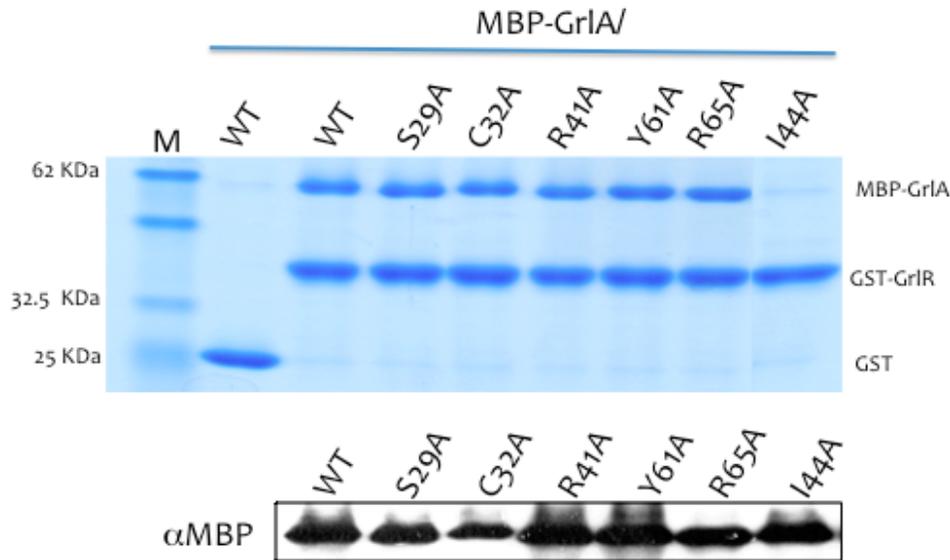


Figura 13. Los aminoácidos S29, C32, R41, Y61 y R65 de GrIA no participan en la interacción con GrIR. Para el ensayo de *pull down* la proteína GST-GrIR se unió a la resina de glutatión sefarosa, y al complejo resina/GST-GrIR se adicionaron extractos de cada mutante fusionada a MBP. Después de varios lavados los complejos resultantes fueron separados en SDS-PAGE. En la figura se muestran las bandas correspondientes a MBP-GrIA, GST-GrIR y GST, así como el marcador de peso molecular (M). Como control negativo se usó MBP-GrIA/I44A la cual se ha demostrado pierde la interacción con GrIR. En la parte inferior se observa la inmunodetección de las proteínas MBP-GrIA silvestre y mutantes a partir de los extractos usados en el “pull-down”, empleando anticuerpos α -MBP.

6.4. Caracterización del extremo C-terminal de GrIA: los últimos seis aminoácidos son requeridos para la activación de *ler*.

Previamente en el laboratorio, como parte de la caracterización funcional de GrIA, se realizaron eliminaciones de 20 aminoácidos a lo largo de la proteína (Δ 2-20; Δ 21-40; Δ 41-60; Δ 61-80; Δ 81-100; Δ 101-120; Δ 121-137). Los resultados arrojaron que ninguna de las eliminaciones fue capaz ni de activar la fusión *ler-cat* ni de complementar a EPEC Δ *grIA*; no obstante, las mutantes con las eliminaciones Δ 101-120 y Δ 121-137 conservaron la interacción con GrIR. Estos datos indican que los primeros 100 aminoácidos son importantes para la interacción de GrIA con GrIR, y que al menos esa región de la

proteína conserva una estructura terciaria lo suficientemente bien plegada para permitir dicho fenómeno (Jiménez *et al.*, en preparación). Entonces, si la mutante $\Delta 121-137$ de GrIA continúa interactuando con GrIR pero no es capaz de activar la expresión de *ler*, esto sugiere que los 17 aminoácidos del extremo carboxilo terminal de GrIA pudieran estar involucrados en la habilidad de la proteína de activar a *ler*.

Tomando como base lo anterior y con el fin de analizar con más detalle esta parte de la proteína, decidimos realizar dos recortes adicionales en el extremo C-terminal de GrIA de EPEC, que van de los aminoácidos 125-137 y 131-137 (**Fig. 14**). Dichos recortes se construyeron por PCR, con oligonucleótidos reversos específicos que introdujeron el codón de paro dentro de *grIA* en el codón 125 ó 131. Los productos de PCR se purificaron, digirieron y ligaron al vector pMPM-T3, y las eliminaciones se verificaron por secuenciación.

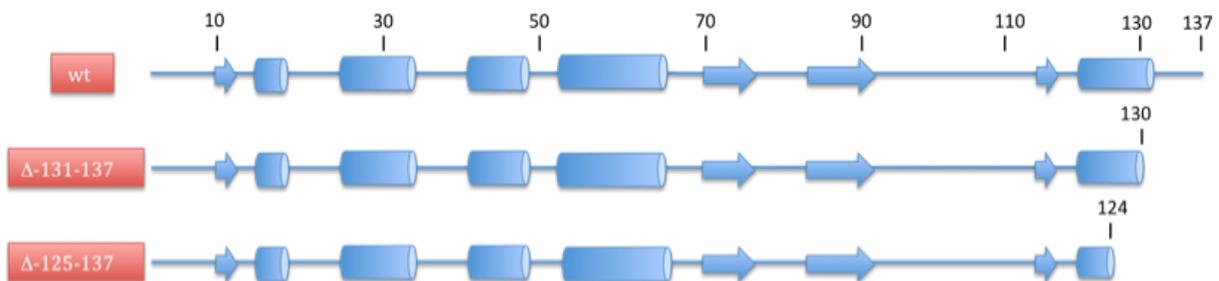


Figura 14. Representación esquemática de las eliminaciones del extremo C-terminal de GrIA. La figura muestra la estructura secundaria de la proteína y en el lado derecho se indica la parte de la proteína eliminada. Las figuras se obtuvieron a partir de la predicción de la **figura 6**.

El fenotipo de cada eliminación se evaluó por su capacidad de activar la expresión de la fusión *ler-cat* en *E. coli* MC4100. Como se puede ver en la **figura 15A**, ninguna de las dos eliminaciones (pTEPGrIA1/ $\Delta 125-137$ y pTEPGrIA1/ $\Delta 131-137$) activó a *ler* como lo hace la versión silvestre (pTEPGrIA1 wt), mostrando un abatimiento total de la actividad de la fusión transcripcional. Este resultado indica que los últimos 6 aminoácidos de GrIA son requeridos para el funcionamiento de la proteína en la activación *ler*.

Posteriormente, las secuencias de *grlA* llevando las eliminaciones se amplificaron por PCR a partir de los plásmidos pTEPGrlA1/ Δ 125-137 y pTEPGrlA1/ Δ 131-137 y ligadas al vector pMAL-c2X. Los plásmidos resultantes pMBP-GrlA/ Δ 125-137 y pMBP-GrlA/ Δ 131-137 se transformaron en EPEC Δ *grlA* para evaluar directamente su efecto en dicha bacteria. Como se muestra en la **figura 15B**, ninguna de las eliminaciones fue capaz de restablecer el perfil de secreción característico de EPEC, lo que es consistente con la incapacidad de las proteínas de activar a *ler*. Además, el análisis de la producción de las dos proteínas truncadas mediante “*western blot*” mostró que las eliminaciones de GrlA se producen satisfactoriamente (**Fig. 15B** panel inferior). Los resultados sugieren que los aminoácidos 131-137 son importantes para la función de GrlA.

Dado que GrlA cuenta con un motivo de unión a ADN tipo HTH en la mitad amino terminal de la proteína, resulta interesante encontrar aminoácidos en el extremo carboxilo que afecten su funcionalidad. Anteriormente se había reportado que una versión trunca de GrlA de EHEC (GrlA Δ ₁₀₇₋₁₃₈) era capaz de restaurar parcialmente la expresión de LEE al ser sobre-expresada (Huang *et al.*, 2008). Con la finalidad de analizar si la sobre-expresión de pMBP-GrlA/ Δ 125-137 y pMBP-GrlA/ Δ 131-137 de EPEC era capaz de complementar a EPEC Δ *grlA* evaluando su perfil de secreción, estas eliminaciones se indujeron en EPEC Δ *grlA*. Las cepas de interés se crecieron por duplicado en medio DMEM adicionando 0.1 mM de IPTG a 37°C en agitación hasta alcanzar una D.O_{600nm} de 0.8. Como se observa en la **figura 16**, cuando los plásmidos pMBP-GrlA/ Δ 125-137 y pMBP-GrlA/ Δ 131-137 se indujeron, las versiones truncas de GrlA sobre-expresadas fueron capaces de complementar parcialmente a EPEC, mostrando un aumento en el perfil de secreción característico de la bacteria con respecto a las condiciones de no inducción.

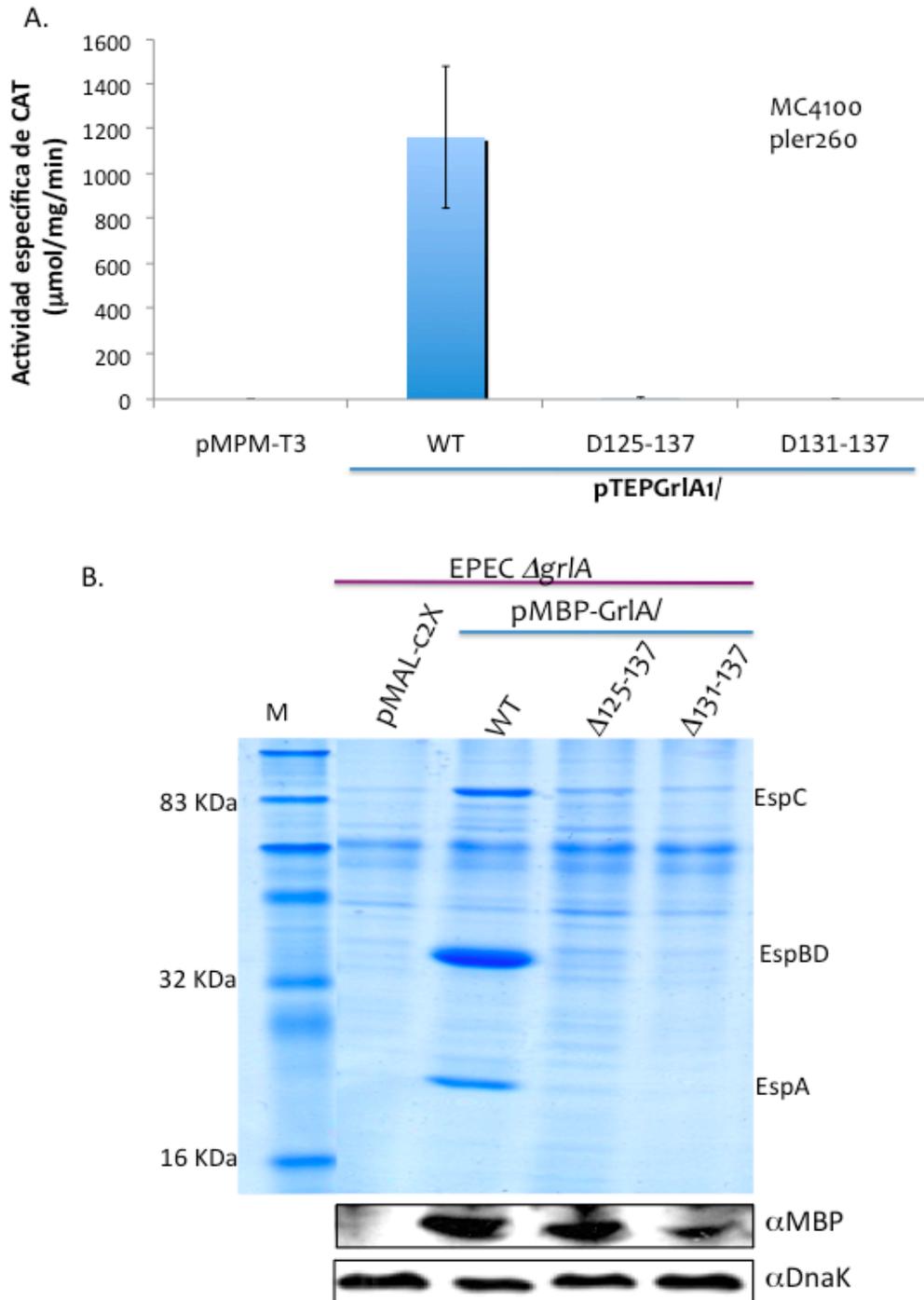


Figura 15. Los últimos 6 aminoácidos de GrlA son importantes para la activación de *ler*. **A.** La expresión de la fusión *ler-cat* fue monitoreada en *E. coli* MC4100. Los valores representan los promedios de al menos tres experimentos independientes hechos por duplicado y se muestra la desviación estándar. **B.** La complementación de EPEC ΔgrlA con los plásmidos pMAL-c2X, pMBP-GrlA wt, pMBP-GrlA/ $\Delta 125-137$ y $\Delta 131-137$ se analizó a través del perfil de proteínas secretadas. Los ensayos de *western blot* se hicieron a partir de los lisados totales de las células, usando anticuerpos αMBP y como control de carga αDnaK .

De acuerdo a lo observado en el perfil de secreción, la sobre-expresión de estos recortes aumentó la expresión de Tir, tal como se muestra en la inmunodetección con anticuerpos α -Tir. Esto indica que las eliminaciones probablemente estén provocando una disminución en la afinidad de GrIA por el ADN, pero que la concentración alcanzada por la sobre-expresión de estas versiones truncas fusionadas a MBP, notablemente superior a las no inducidas (**Fig. 16**), es capaz de restaurar la funcionalidad de GrIA y por tanto sean capaces de complementar a EPEC Δ grIA.

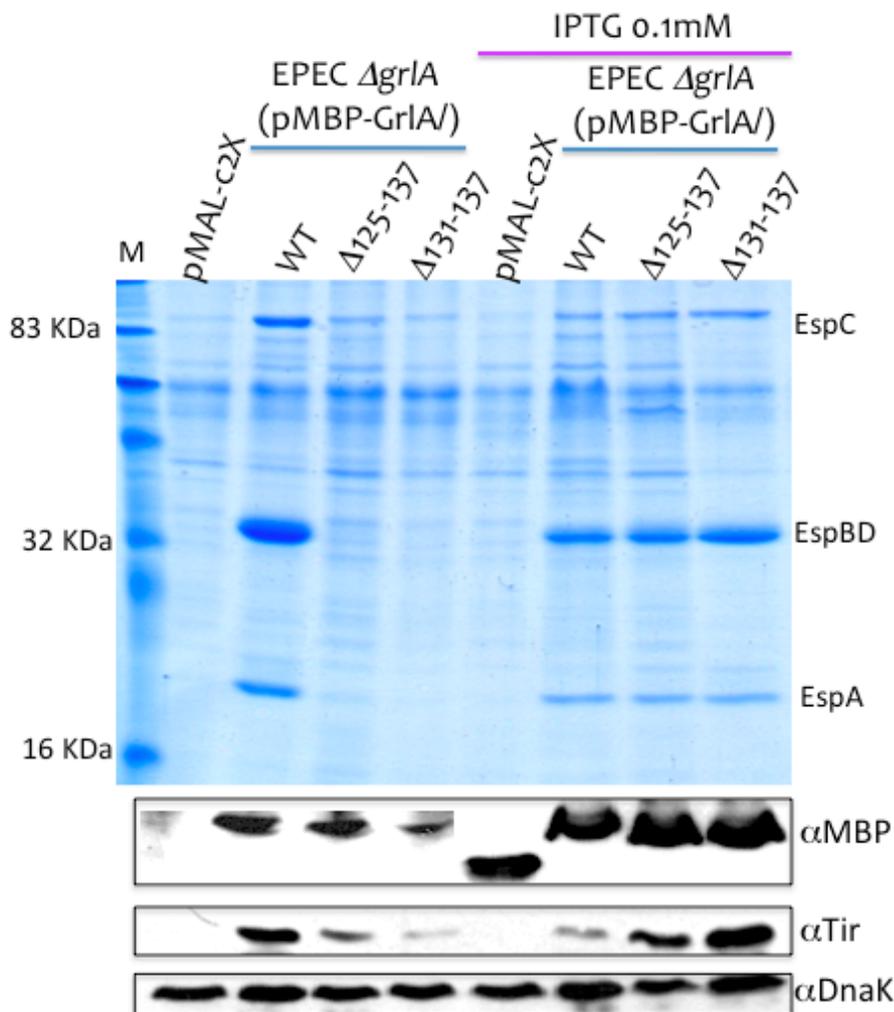


Figura 16. Sobre-expresión de las mutantes truncas de GrIA. Los cultivos fueron crecidos a 37°C en medio DMEM adicionado o no con 0.1 mM de IPTG, en agitación hasta alcanzar una D.O_{600nm} de 0.8. Los sobrenadantes fueron colectados después de centrifugación para obtener proteínas secretadas por precipitación con TCA. En la parte inferior se muestra la inmunodetección de las proteínas GrIA fusionadas a MBP, de la proteína Tir y como control de carga la proteína DnaK a partir de los lisados totales de las bacterias.

6.5. Los residuos R133 y K134 de GrIA son requeridos para activar la expresión de *ler* en *E. coli* MC4100.

La eliminación de los residuos 131-137 de GrIA fue incapaz de activar la expresión de *ler*, lo cual sugiere que en esta parte de la proteína puede haber aminoácidos importantes para su función. Con el propósito de identificar dichos residuos en esta zona de GrIA, decidimos hacer mutaciones puntuales por Alanina en las posiciones Arginina 132 (R132), Arginina 133 (R133), Lisina 134 (K134), Lisina 135 (K135) y Ácido glutámico 136 (E136). Las mutaciones se llevaron a cabo por PCR, para lo cual se diseñaron oligonucleótidos reversos específicos que introdujeran las sustituciones en los codones deseados. Los productos de PCR obtenidos se purificaron y ligaron en el vector pMPM-T3. Las mutaciones se verificaron por secuenciación y los plásmidos resultantes se denominaron pTEPGrIA1/R132A, pTEPGrIA1/R133A, pTEPGrIA1/K134A, pTEPGrIA1/K135A y pTEPGrIA1/E136A.

Los plásmidos arriba mencionados se transformaron en *E. coli* MC4100, al igual que los plásmidos pTEPGrIA1 silvestre y pMPM-T3, para evaluar el impacto de las mutaciones puntuales en su capacidad de activar a la fusión *ler-cat*. Como se puede observar en la **figura 17**, las mutaciones puntuales por Alanina en las posiciones R133 y K134 no fueron capaces de promover la expresión de *ler* en *E. coli* MC4100, mostrando aproximadamente un 16% de actividad con respecto a la proteína silvestre. De manera interesante, sólo estos dos residuos parecen afectar el funcionamiento de la proteína, ya que el resto de las mutantes (pTEPGrIA1/R132A, pTEPGrIA1/K135A y pTEPGrIA1/E136A) tienen un comportamiento muy similar al de GrIA silvestre, indicando que estos aminoácidos no participan en la activación de *ler*. Con el objeto de corroborar estas observaciones se construyó el plásmido pTEPGrIA1/R133A134A el cual lleva dos sustituciones por Alanina en los residuos R133 y K134. Esta doble mutante fue incapaz de activar la fusión *ler-cat* en *E. coli* MC4100, de tal forma que la expresión de la fusión

transcripcional se abatió por completo (**Fig. 17**). Estos datos indican que los aminoácidos R133 y K134 de GrIA juegan un papel importante en la activación de *ler* en *E. coli* MC4100.

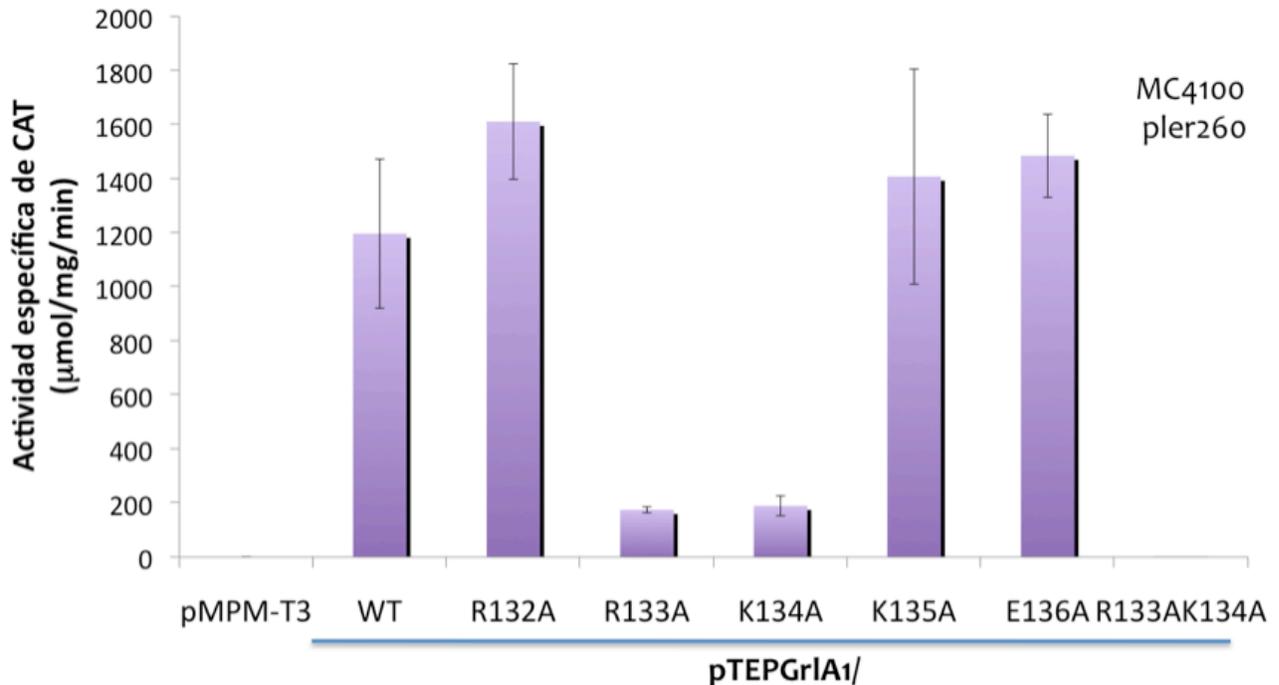


Figura 17. Los residuos R133 y K134 de GrIA son importantes para activar la expresión de *ler*. La actividad específica de CAT fue determinada a partir de muestras colectadas de cultivos crecidos a 37°C en medio DMEM en agitación. Los valores representan el promedio de al menos tres experimentos independientes hechos por duplicado y se muestra la desviación estándar.

Posteriormente el fenotipo de las mutaciones sitio-dirigidas del extremo C-terminal de GrIA se probó directamente en EPEC $\Delta grIA$. Las mutantes puntuales se amplificaron a partir de los plásmidos pTEPGrIA1/R132A, R133A, K134A, K135A y E136A y se clonaron en el vector pMAL-c2X. Las mutaciones se verificaron por secuenciación y las construcciones obtenidas se denominaron pMBP-GrIA/R132A, R133A, K134A, K135A y E136A. Estos plásmidos se introdujeron a EPEC $\Delta grIA$ y la complementación de la cepa fue analizada a través del perfil de proteínas secretadas. Como puede apreciarse en la **figura 18**, todas las proteínas fusionadas a MBP restablecieron el perfil de secreción en EPEC $\Delta grIA$. Además, la detección por “western blot” muestra que se expresan a niveles

similares que los de la proteína silvestre, a excepción de las mutantes K135 y E136, las cuales aunque se expresan a niveles menores que MBP-GrlA silvestre, son capaces de complementar la secreción. No obstante, la doble mutante MBP-GrlA/R133AK134A complementó parcialmente a EPEC Δ grlA, mostrando un perfil de proteínas secretadas bajo (Fig. 18).

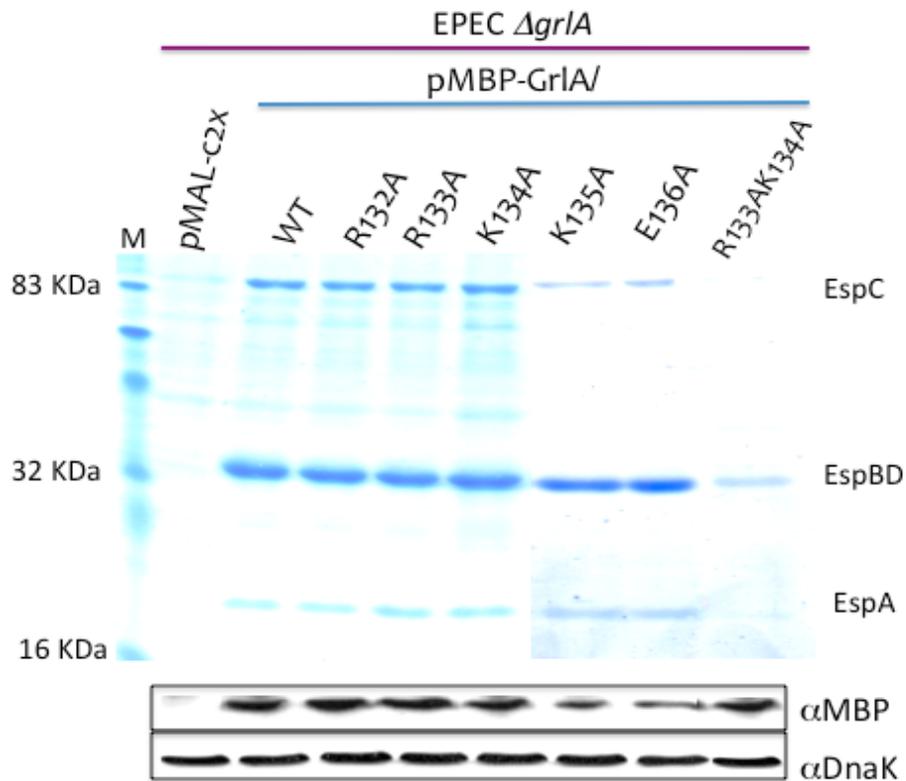


Figura 18. Perfil de secreción de EPEC Δ grlA complementada con los plásmidos pMAL-c2X, pMPB-GrlA wt, pMBP-GrlA/R132A, R133A, K134A, K135A, E136A y R133AK134A. La complementación se analizó por perfil de proteínas secretadas como en los ensayos anteriores y el “western blot” se realizó usando los lisados totales de las bacterias, utilizando anticuerpos α -MBP y como control de carga α -DnaK.

Nuevamente nos enfrentamos con fenotipos discrepantes, en donde las mutantes R133A y K134A fueron incapaces de activar la fusión *ler-cat*, pero complementaron a EPEC Δ grlA. Con el objeto de analizar esta discordancia, se realizaron ensayos sobre-expresando a las mutantes pTEPGrlA1/R133A y pTEPGrlA1/K134A con 1 mM de IPTG en *E. coli* W3110. Se constató que al inducir la expresión de la mutante K134A se alcanzaron

niveles de activación de *ler* similares a los que muestra GrIA silvestre y, aunque para las mutantes R133A los niveles no fueron equiparables a los de la proteína silvestre, la sobre-expresión aumentó significativamente la actividad transcripcional de la mutante respecto a la misma mutante no inducida (**Fig. 19**). Esto sugiere que, como en el caso de las mutantes anteriores (Y61A y R65A), la dosis de expresión del vector pMAL-c2x ó la fusión a MBP favorece la función y/o estabilidad de las mutantes, enmascarando el efecto de las sustituciones sobre GrIA.

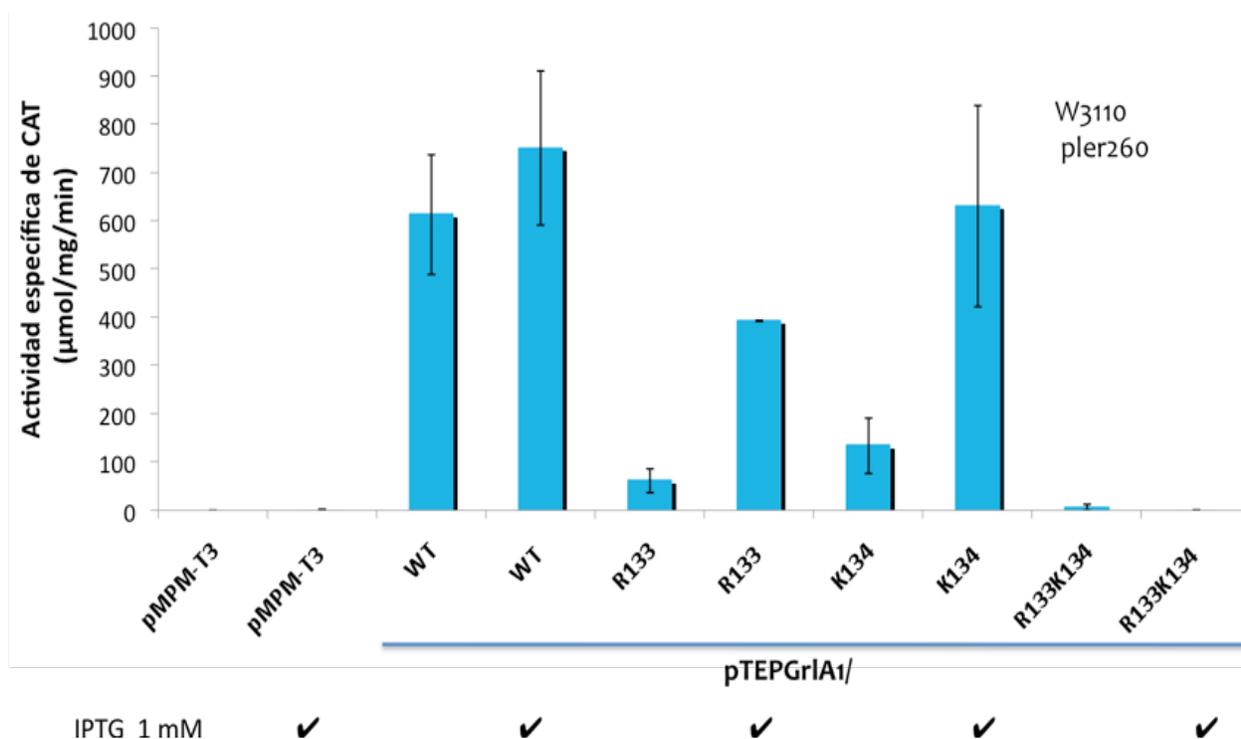


Figura 19. Sobre-expresión de las mutantes puntuales del extremo C-terminal de GrIA. La expresión de la fusión *ler-cat* fue monitoreada en *E. coli* W3130. Los cultivos fueron crecidos a 37°C en medio DMEM adicionado o no con 1 mM de IPTG, en agitación hasta alcanzar una D.O_{600nm} de 1. Los valores representan los promedios de al menos tres experimentos independientes hechos por duplicado y se muestra la desviación estándar

6.6. El extremo carboxilo de GrIA no participa en la interacción con GrIR.

Como parte de la caracterización molecular de los recortes $\Delta 125-137$ y $\Delta 131-137$ así como de las mutantes puntuales R132A, R133A, K134A, K135A y E136A de GrIA, se evaluó el impacto de dichas eliminaciones y mutaciones en la interacción con GrIR. Eliminaciones realizadas previamente mostraron que los últimos 17 aminoácidos de la proteína no intervienen en dicha interacción, por lo que era de esperarse que las proteínas arriba mencionadas no afectaran este fenómeno.

La **figura 20A** muestra los resultados obtenidos del ensayo de “*pull-down*”, en donde las dos proteínas trucas MBP-GrIA/ $\Delta 125-137$ y MBP-GrIA/ $\Delta 131-137$ conservan su capacidad de interactuar con GrIR de la misma forma que lo hace la versión silvestre de MBP-GrIA y no así nuestro control negativo, la mutante MBP-GrIA/I44A. De manera similar, las proteínas mutantes MBP-GrIA/R132A, R133A, K134A, K135A y E136A interactuaron con GrIR de la misma manera que MBP-GrIA silvestre (**Fig. 20B**). Estos datos confirman que la parte más distal del extremo C-terminal de GrIA no es necesaria para la interacción con GrIR.

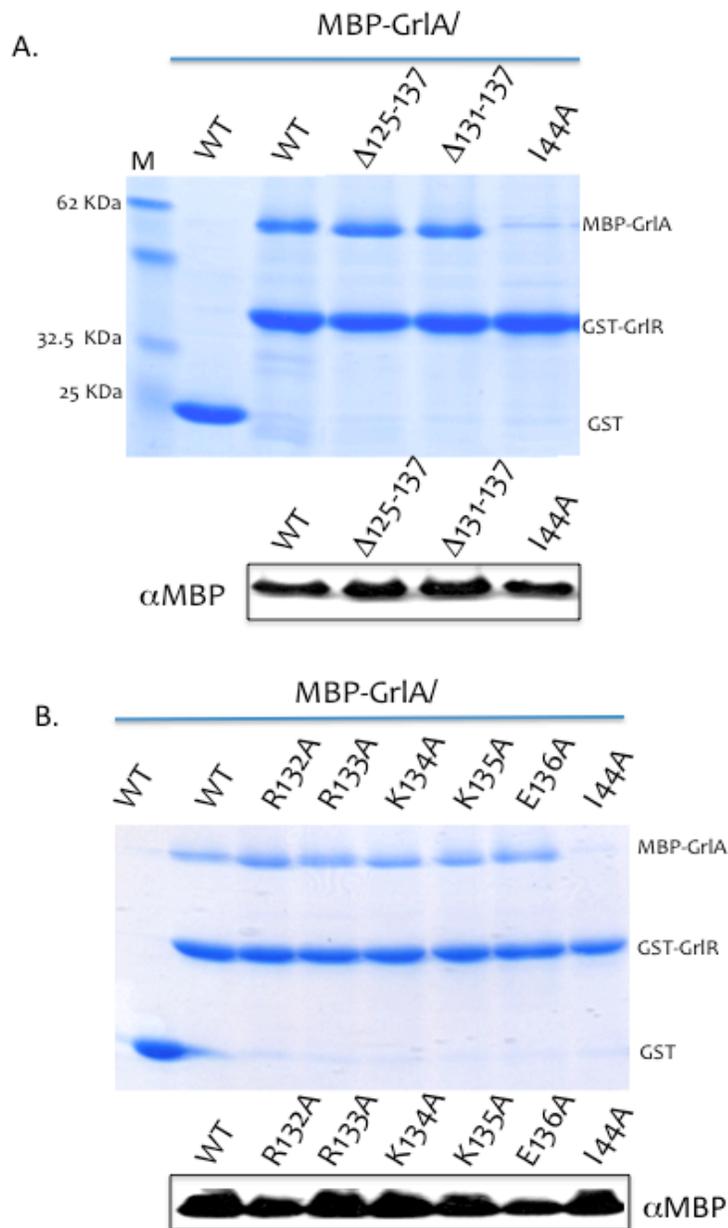


Figura 20. Ensayo de “pull-down” de los recortes y mutaciones puntuales del extremo C-terminal de GrIA. **A.** Análisis de la interacción de las mutantes MBP-GrIA/ $\Delta 125-137$ y MBP-GrIA/ $\Delta 131-137$ con la proteína GST-GrIR. La figura muestra los resultados de interacción de MBP-GrIA silvestre (wt), MBP-GrIA/ $\Delta 125-137$, MBP-GrIA/ $\Delta 131-137$. En el lado izquierdo de la figura se señala el marcador de peso molecular de proteínas (M), así como el peso de algunas bandas, mientras que en el lado derecho se indica el nombre de las proteínas visualizadas en el gel. **B.** Se muestran los resultados de interacción para la proteína GrIA silvestre (wt), MBP-GrIA/R132A, R133A, K134A, K135A y E136A. En ambos experimentos se utilizó a la proteína MBP-GrIA/I44A como control negativo. En la parte inferior de cada gel se muestra la inmunodetección de MBP-GrIA a partir de los extractos usados en el “pull-down” y en donde se sobre expresaron las proteínas usadas en el ensayo.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Una de las características fundamentales de las bacterias patógenas es la capacidad de adaptarse al medio ambiente cambiante con el que se enfrentan durante el proceso de infección para asegurar la supervivencia en un nicho determinado. Para lograr esto las bacterias tienen que acoplar la expresión de los genes asociados a la colonización a las señales ambientales recibidas. Uno de los principios fundamentales que estos microorganismos emplean para controlar la expresión de los genes involucrados en la virulencia es la regulación (activación y represión) de la transcripción de los genes en respuesta a estímulos externos específicos (Morschhäuser *et al.*, 2000).

Los factores de transcripción son proteínas que acoplan la expresión de sus genes blanco a las señales ambientales al modular su actividad o su expresión (Browning y Busby, 2004). Muchos de estos factores poseen secuencias específicas de unión a ADN que interactúan con la región reguladora de los genes blanco para activar o reprimir el inicio de la transcripción (Browning y Busby, 2004).

En el caso de EPEC, la expresión de los genes de la isla de patogenicidad LEE se encuentra bajo el control de varias proteínas reguladoras que la modulan positiva y negativamente (Mellies *et al.*, 2007; Tree *et al.*, 2009), tres de las cuales, Ler, GrIR y GrIA, están codificadas dentro del mismo LEE (Mellies *et al.*, 1999; Deng *et al.*, 2004). GrIA funge como un regulador positivo, siendo capaz de activar a *ler* al unirse directamente a su región reguladora (Barba *et al.*, 2005; Jiménez *et al.*, en preparación), contrarrestando en parte la represión mediada por H-NS (Jiménez *et al.*, en preparación). Ler, por su parte, regula de manera positiva la expresión del operón *grIRA*, por lo que se ha sugerido la existencia de un circuito de regulación positiva, en donde GrIA y Ler se regulan recíprocamente una a otra para modular la expresión de los genes de LEE (Barba *et al.*,

2005). Además, se ha demostrado que GrIA tiene la capacidad de formar heterodímeros con el represor GrIR (Creasey *et al.*, 2003).

GrIA pertenece a una familia de reguladores transcripcionales poco caracterizada entre los que figuran una proteína hipotética de *Salmonella* denominada SHG y el activador CaiF de la familia Enterobacteriaceae, siendo esta última la única proteína de la familia parcialmente caracterizada. Estas proteínas al igual que GrIA poseen un probable motivo de unión a ADN de tipo hélice-giro-hélice (HTH) (Deng *et al.*, 2004; Barba *et al.*, 2005). Los motivos HTH son probablemente la característica más antigua conservada en el aparato transcripcional, siendo determinantes críticos en la interacción con el ADN de muchos factores de transcripción (Huffman y Brenna, 2002). No obstante, los residuos individuales involucrados en el contacto con el ADN varían a lo largo del plegado de dicho motivo (Aravind *et al.*, 2005).

El motivo HTH de GrIA parece ser un motivo típico compuesto de tres hélices (II, III y IV) donde la hélice IV formaría la interfase de interacción ADN-proteína (**Figura 6B**). Se ha demostrado que algunas mutaciones puntuales localizadas en el motivo HTH de GrIA de EPEC abatieron la actividad de la proteína, volviéndola incapaz de activar a *ler* y/o de interactuar con GrIR (**Tabla 1**; Jiménez *et al.*, en preparación). En el presente estudio se hicieron cinco mutaciones puntuales adicionales en este motivo, en los residuos S29, C32, R41, Y61 y R65. Las sustituciones por Alanina de los aminoácidos Y61 y R65 fueron las únicas que tuvieron un efecto adverso en la función de GrIA, ya que ambas afectaron la capacidad de la proteína de activar a *ler*. Esto es consistente con lo observado para la mutante R54A, la cual, además de encontrarse hipotéticamente muy cerca de estos residuos en la hélice IV (**Fig. 9**), fue incapaz de activar a *ler*, pero continuó interactuando con GrIR. La mutante en la posición Y61A mostró un fenotipo más marcado que el de la R65A, debido probablemente a que el residuo Y61 está conservado en las proteínas homólogas de GrIA, SHG y CaiF, y no así el R65. A pesar de que no saber el papel

específico que estén jugando los residuos Y61 y R65 en la función de GrIA, es probable que estén participando en la interacción con el ADN ya que se encuentran en la hélice de reconocimiento (hélice IV) del HTH de GrIA. También es posible que estos residuos estén interactuando con otros aminoácidos dentro de la proteína y que ayuden a estabilizar la correcta conformación del HTH. De acuerdo a esto se sabe que los residuos de Tirosina están involucrados en contactos con el ADN vía interacciones Van der Waals, además de que la Tirosina es capaz de unirse a aminoácidos cargados positivamente formando interacciones que estabilizan la estructura tridimensional de las proteínas (Sathyapriya y Vishveshwara, 2004). Por otro lado, se ha sugerido que las interacciones más prominentes entre proteínas y ADN están favorecidas por los puentes de hidrógeno formados entre residuos como Arginina con guanina; de hecho la Arginina es el aminoácido que potencialmente puede formar más puentes de hidrógeno con el ADN (Luscombe y Thornton, 2002). Así mismo, la Arginina juega un papel importante en la estabilidad de las proteínas al poder interactuar con residuos aromáticos (Sathyapriya y Vishveshwara, 2004).

El motivo HTH presente en GrIA está directamente involucrado en la unión de la proteína al ADN. No obstante, no puede descartarse la existencia de contactos secundarios con el ADN en extensiones fuera del HTH o residuos que estabilicen el plegado de la proteína y que al estar mutados afecten la conformación y funcionalidad de dicho motivo. Este pudiera ser el caso de las mutaciones puntuales R133A y K134A ubicadas en el extremo C-terminal de GrIA. Estos aminoácidos se caracterizan por estar cargados positivamente y ser altamente hidrofílicos, atributos importantes de residuos que participan en el plegado de una proteína, así como de los que interactúan con el ADN. La sustitución por Alanina de estos residuos afectó severamente la capacidad de GrIA para activar a *ler*, aunque ambas mutantes conservaron aproximadamente un 16% de actividad respecto a la proteína GrIA silvestre. De manera interesante, la doble mutante

GrIA/R133AK134A abatió por completo la función de la proteína, sugiriendo un efecto sinérgico de las sustituciones R133A y K134A sobre la función de GrIA. Además como se mencionó anteriormente, los residuos básicos como Arginina y Lisina juegan un papel importante en las interacciones con residuos aromáticos o con el mismo ADN, pudiendo contribuir en la especificidad y estabilidad de la interface ADN-proteína (Sathyapriya y Vishveshwara, 2004).

Las mutantes construidas en el presente trabajo fueron realizadas en su mayoría en residuos no conservados entre las proteínas GrIA, SGH y CaiF, por lo que pudiera esperarse que el impacto en dichos aminoácidos no fuese tan dramático como lo fue en aminoácidos que sí están conservados. Lo anterior concuerda con la observación que los residuos de aminoácidos que hacen contacto directo con el ADN generalmente están más conservados que aquellos que no están involucrados en dicho fenómeno (Luscombe y Thornton, 2002). Teniendo esto en cuenta, es inevitable cuestionarse porqué las mutaciones R133A y K134A del extremo C-terminal de GrIA abatieron su capacidad de activar a la fusión *ler-cat*, dado que estos residuos no se encuentran en el motivo putativo de unión a la región reguladora de *ler*. Si bien pudiera ser que estos estén participando en contactos secundarios con el ADN, también es probable que sean críticos para estabilizar de alguna manera el plegado de GrIA y al estar mutados ocasionen cambios estructurales en la proteína, afectando su pegado al ADN. Sin embargo, cualquier posible cambio estructural ocasionado por las mutantes del extremo C-terminal en GrIA pudiera no ser tan drástico, de manera que no se altera la interacción con GrIR.

En otras proteínas se han observado fenómenos similares, como en el caso del activador transcripcional ToxT de *V. cholerae*. ToxT es un miembro de la familia AraC, cuyo dominio de unión a ADN se localiza en el extremo C-terminal; sin embargo, se han identificado residuos de aminoácidos en el extremo amino terminal críticos para la activación transcripcional (Prouty *et al.*, 2005). Otro ejemplo es el del factor de

transcripción SoxR involucrado en la activación del mecanismo de protección contra especies reactivas de oxígeno en *E. coli*. Esta proteína está clasificada dentro de la familia MerR, la cual se caracteriza por tener dos motivos HTH de unión a ADN en la mitad amino. No obstante, mutaciones en regiones fuera de los motivos putativos de unión a ADN en SoxR, sobre todo en el extremo carboxilo terminal, resultaron en proteínas con defectos en el mecanismo de activación (Chander *et al.*, 2003). Adicionalmente, el regulador negativo de genes relacionados con la resistencia múltiple a antibióticos MarR posee residuos de aminoácidos situados fuera del dominio putativo de unión a ADN que exhiben propiedades de reconocimiento alteradas, incrementando su afinidad por el ADN al ser sitios de contacto accesorios (Alekhun y Levy, 1999).

Algo intrigante encontrado en este trabajo fue que, cuando las mutantes GrIA/Y61A, GrIA/R65A, GrIA/R133A y GrIA/K134A inactivas al ser expresadas a partir del plásmido pMPM-T3 se fusionaron a MBP, éstas fueron capaces de complementar a la cepa EPEC Δ grIA evaluado por el perfil de proteínas secretadas (**Fig. 11 y 18**). Esto nos indicó que en estas condiciones en las proteínas mutantes se opaca el efecto de las mutaciones puntuales. Como se mencionó anteriormente, existe la posibilidad de que la fusión a MBP esté favoreciendo la función de nuestras mutantes, ya sea aumentando su estabilidad, mejorando su plegado, incrementando su afinidad por el ADN o dado que en el vector pMAL-c2X las proteínas están expresadas bajo el control de un promotor fuerte, alcancen un nivel de expresión capaz de restaurar la función similar a la de la proteína silvestre. Si bien determinar la causa precisa de la incongruencia de fenotipos resulta difícil, los ensayos complementarios de inducción con IPTG de los plásmidos pTEPGrIA1/Y61A, pTEPGrIA1/R65A, pTEPGrIA1/R133A y pTEPGrIA1/K134A en EPEC Δ grIA y en *E. coli* W3110 indican que el efecto de las mutaciones se enmascara cuando las proteínas mutantes se sobre-expresan (**Fig. 12 y 19**). Interesantemente, cuando el plásmido pMBP-GrIA/R133AK134A se introdujo en EPEC Δ grIA, la secreción de proteínas

se vio considerablemente disminuida en comparación a la cepa que contenía el mismo plásmido con MBP-GrlA silvestre, confirmando el efecto aditivo de las mutaciones R133A y K134A en el extremo C-terminal de la proteína. Esto indica que si el efecto de alguna mutación es parcial, MBP influye de manera positiva para enmascararlo y no así en una doble mutante en donde los dos aminoácidos que se mutan tienen efectos adversos similares y por ende crean un fenotipo más radical sobre la proteína.

Previamente se sugirió que la proteína de unión a maltosa afecta el plegado de las proteínas a las que se fusiona, probablemente al funcionar como una chaperona molecular en el contexto de proteína de fusión (Kapust y Waugh, 1999). Además, MBP destaca por sus características solubilizantes, permitiendo que muchas proteínas a las que se fusiona incrementen su solubilidad y puedan plegarse en conformaciones biológicamente activas (Fox y Waugh, 2002). MBP ha sido ampliamente usada como proteína de fusión en la purificación de proteínas pequeñas altamente insolubles, como en el caso de los reguladores Rns, ExsA, PerA, ToxT y GadX pertenecientes o asociados a la familia de activadores AraC (Munson y Scott, 1999; Hovey y Frank, 1995; Ibarra *et al.*, 2003; Prouty *et al.*, 2005; Tramonti *et al.*, 2002). Esta estrategia ha tenido resultados satisfactorios aunque también se ha reportado que algunas proteínas fusionadas a MBP se comportan anormalmente, tal es el caso de ToxT de *Vibrio cholerae*. Para esta proteína se había aseverado que el dominio carboxilo terminal era capaz de interactuar con la subunidad α de la RNAP; sin embargo cuando éste se fusionó a MBP, la proteína recombinante no pudo interactuar con la RNAP (Prouty *et al.*, 2005). Por otro lado, se reportó que la proteína quimérica MBP-GadX era capaz de activar al sistema *gad* en *E. coli*, pero a una magnitud inferior que la versión silvestre de GadX (Tramonti *et al.*, 2002).

Por otro parte, en el laboratorio se determinó que los últimos 17 aminoácidos de GrlA no participan en la interacción con GrlR, pero que podrían estar jugando un papel en la capacidad de activación de *ler* (Jiménez *et al.*, en preparación). En este trabajo

encontramos que los plásmidos pTEPGrlA1/ Δ 125-137 y pTEPGrlA1/ Δ 131-137 en un fondo *E. coli* MC4100 fueron incapaces de promover la expresión de la fusión *ler-cat* así como de complementar a EPEC Δ *grlA*, evidenciando la importancia de la región más distal del extremo C-terminal de GrlA (últimos 6 aminoácidos) en la activación de *ler*. Sin embargo en el 2008 se reportó que una mutante de GrlA de EHEC a la cual se le habían eliminado los últimos 31 aminoácidos (GrlA $_{\Delta$ 107-138) restauraba la expresión de LEE casi al mismo nivel que la GrlA íntegra cuando era sobre-expresada (Huang y Syu, 2008). Por ello se decidió analizar el comportamiento de los plásmidos pMBP-GrlA/ Δ 125-131 y pMBP-GrlA/ Δ 131-137 bajo condiciones de inducción; cuando estos plásmidos se indujeron con 0.1mM de IPTG, la sobre-expresión de las proteínas mutantes pudo complementar a EPEC Δ *grlA* (**Fig. 16**). Esto sugiere que los niveles de sobre-expresión de las deleciones de GrlA alcanzados a partir del plásmido pMAL-c2X (1:50 con respecto al nivel de expresión sin inducir) son necesarios para poder complementar a EPEC Δ *grlA*.

Finalmente, en lo que concierne al análisis de interacción de GrlA con GrlR, en este trabajo se encontró que las mutaciones S29A, C32A, R41A, Y61A, R65A, R132A, R133A, K134A, K135A y K136A no intervienen en dicho fenómeno ya que probablemente no se encuentran en la interfase de interacción entre las dos proteínas. Esto contrasta con un reporte que sugirió que la región C-terminal de GrlA de EHEC rica en residuos básicos podría estar involucrada en la interacción con un parche de aminoácidos cargados negativamente dentro de la secuencia de GrlR, el motivo EDED (Glu-Asp-Glu-Asp) (Jobichen *et al.*, 2007). Como se mencionó anteriormente, en nuestro laboratorio se demostró que los últimos 17 aminoácidos de GrlA de EPEC no son importantes para la interacción con GrlR (Jiménez *et al.*, en preparación), de la misma forma que se observó con GrlA de EHEC (Huang y Syu, 2008). De acuerdo con lo anterior las mutaciones del extremo C-terminal realizadas en este trabajo confirman que los últimos 13 aminoácidos

de GrIA no intervienen en la interacción con GrIR, tal como lo muestran los ensayos de tipo “pull-down” (**Fig. 20A y B**).

Los resultados obtenidos en este trabajo aportan datos interesantes sobre residuos de aminoácidos dentro del motivo HTH (Y61 y R65), así como en el extremo carboxilo terminal de GrIA (R133 y K134). Estos residuos son importantes para la proteína en su papel como regulador positivo del LEE sobre todo por que afectaron su capacidad de activar a *ler*. Si bien la caracterización molecular de GrIA y del mecanismo molecular específico por el cual regula a *ler* están siendo elucidados poco a poco, nuestros datos aportan información relevante a lo que actualmente se sabe de la proteína.

PERSPECTIVAS

Gracias a las diferentes aproximaciones moleculares realizadas por nuestro laboratorio y otros grupos de investigación, el camino hacia el entendimiento del papel de GrIA en la regulación de los patógenos A/E se ha ido acortando. No obstante, podemos sugerir algunas perspectivas a realizar a partir de los datos aquí presentados y de los que se conocen hasta el presente:

- Purificar las proteínas MBP-GrIA/Y61A, R65A, R133A, K134A, R133AK134A, así como MBP-GrIA/ Δ 125-137 y MBP-GrIA/ Δ 131-137 para realizar EMSAs y saber si las mutaciones afectan el pegado de GrIA al ADN.
- Etiquetar las proteínas mutantes en los plásmidos pTEPGrIA1/Y61A, R65A, R133A, K134A y R133AK134A para monitorear su nivel de expresión en los ensayos de actividad de CAT.

REFERENCIAS

1. **Abe, H., I. Tatsuno, T. Tobe, A. Okutani, y C. Sasakawa.** 2002. Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **70**:3500-9.
2. **Alekshun, M. N., y S. B. Levy.** 1999. Characterization of MarR superrepressor mutants. *J Bacteriol* **181**:3303-6.
3. **Aravind, L., V. Anantharaman, S. Balaji, M. M. Babu, y L. M. Iyer.** 2005. The many faces of the helix-turn-helix domain: transcription regulation and beyond. *FEMS Microbiol Rev* **29**:231-62.
4. **Barba, J., V. H. Bustamante, M. A. Flores-Valdez, W. Deng, B. B. Finlay, y J. L. Puente.** 2005. A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *J Bacteriol* **187**:7918-30.
5. **Berdichevsky, T., D. Friedberg, C. Nadler, A. Rokney, A. Oppenheim, y I. Rosenshine.** 2005. Ler is a negative autoregulator of the *LEE1* operon in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**:349-57.
6. **Bonacorsi, S. P., O. Clermont, C. Tinsley, I. Le Gall, J. C. Beaudoin, J. Elion, X. Nassif, y E. Bingen.** 2000. Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. *Infect Immun* **68**:2096-101.
7. **Browning, D. F., y S. J. Busby.** 2004. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol* **2**:57-65.
8. **Buchet, A., W. Nasser, K. Eichler, and M. A. Mandrand-Berthelot.** 1999. Positive co-regulation of the *Escherichia coli* carnitine pathway *cai* and *fix* operons by CRP and the CaiF activator. *Mol Microbiol* **34**:562-75.
9. **Bustamante, V. H., F. J. Santana, E. Calva, y J. L. Puente.** 2001. Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* **39**:664-78.
10. **Casadaban, M. J.** 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* **104**:541-55.
11. **Castillo, A., L. E. Eguarte, y V. Souza.** 2005. A genomic population genetics analysis of the pathogenic enterocyte effacement island in *Escherichia coli*: the search for the unit of selection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:1542-7.
12. **Chander, M., L. Raducha-Grace, y B. Demple.** 2003. Transcription-defective *soxR* mutants of *Escherichia coli*: isolation and in vivo characterization. *J Bacteriol* **185**:2441-50.
13. **Chen, H. D., y G. Frankel.** 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* **29**:83-98.
14. **Clarke, S. C., R. D. Haigh, P. P. Freestone, y P. H. Williams.** 2003. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* **16**:365-78.
15. **Cornelis, G. R.** 2006. The type III secretion injectisome. *Nat Rev Microbiol* **4**:811-25.
16. **Creasey, E. A., R. M. Delahay, S. J. Daniell, y G. Frankel.** 2003. Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **149**:2093-106.
17. **Dean, P., M. Maresca, y B. Kenny.** 2005. EPEC's weapons of mass subversion. *Curr Opin Microbiol* **8**:28-34.
18. **Dean, P., y B. Kenny.** 2009. The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr Opin Microbiol* **12**:101-9.
19. **Deng, W., Y. Li, B. A. Vallance, y B. B. Finlay.** 2001. Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. *Infect Immun* **69**:6323-35.
20. **Deng, W., J. L. Puente, S. Gruenheid, Y. Li, B. A. Vallance, A. Vazquez, J. Barba, J. A. Ibarra, P. O'Donnell, P. Metalnikov, K. Ashman, S. Lee, D. Goode, T. Pawson, y B. B. Finlay.** 2004. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:3597-602.
21. **Deng, W., Y. Li, P. R. Hardwidge, E. A. Frey, R. A. Pfuetzner, S. Lee, S. Gruenheid, N. C.**

- Strynakda, J. L. Puente, and B. B. Finlay.** 2005. Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens. *Infect Immun* **73**:2135-46.
22. **Dobrindt, U., B. Hochhut, U. Hentschel, y J. Hacker.** 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **2**:414-24.
 23. **Donnenberg, M. S., A. Donohue-Rolfe, y G. T. Keusch.** 1989. Epithelial cell invasion: an overlooked property of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with the EPEC adherence factor. *J. Infect. Dis.* **160**:452-459.
 24. **Donnenberg, M. S., y J. B. Kaper.** 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **60**:3953-61.
 25. **Donnenberg, M. S., L. C. Lai, y K. A. Taylor.** 1997. The locus of enterocyte effacement pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes secretion functions and remnants of transposons at its extreme right end. *Gene* **184**:107-14.
 26. **Donnenberg, M. S., y T. S. Whittam.** 2001. Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Invest* **107**:539-48.
 27. **Dorman, C. J.** 2004. H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nat Rev Microbiol* **2**:391-400.
 28. **Eichler, K., A. Buchet, R. Lemke, H. P. Kleber, y M. A. Mandrand-Berthelot.** 1996. Identification and characterization of the *caiF* gene encoding a potential transcriptional activator of carnitine metabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **178**:1248-57.
 29. **Elliott, S. J., L. A. Wainwright, T. K. McDaniel, K. G. Jarvis, Y. K. Deng, L. C. Lai, B. P. McNamara, M. S. Donnenberg, y J. B. Kaper.** 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* **28**:1-4.
 30. **Frankel, G., A. D. Phillips, I. Rosenshine, G. Dougan, J. B. Kaper, y S. Knutton.** 1998. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* **30**:911-21.
 31. **Fratamico, P. y Smith, L.** 2006. Diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC). En *Foodborne infections and intoxications*, Riemann, H y Cliver, D. (Eds). El Sevier Academic Press. UK. 210.
 32. **Friedberg, D., T. Umanski, Y. Fang, y I. Rosenshine.** 1999. Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **34**:941-52.
 33. **Fox, J. D., y D. S. Waugh.** 2003. Maltose-binding protein as a solubility enhancer. *Methods Mol Biol* **205**:99-117.
 34. **Garmendia, J., G. Frankel, y V. F. Crepin.** 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* **73**:2573-85.
 35. **Giron, J. A., A. S. Ho, y G. K. Schoolnik.** 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**:710-3.
 36. **Goldberg, M. D., M. Johnson, J. C. Hinton, y P. H. Williams.** 2001. Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**:549-59.
 37. **Grant, A. J., M. Farris, P. Alefounder, P. H. Williams, M. J. Woodward, y C. D. O'Connor.** 2003. Co-ordination of pathogenicity island expression by the BipA GTPase in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Mol Microbiol* **48**:507-21.
 38. **Haack, K. R., C. L. Robinson, K. J. Miller, J. W. Fowlkes, y J. L. Mellies.** 2003. Interaction of Ler at the *LEE5* (*tir*) operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **71**:384-92.
 39. **Hacker, J., y J. B. Kaper.** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* **54**:641-79.
 40. **Hansen, A. M., y J. B. Kaper.** 2009. Hfq affects the expression of the LEE pathogenicity island in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **73**:446-65.
 41. **Hayward, R. D., J. M. Leong, V. Koronakis, y K. G. Campellone.** 2006. Exploiting pathogenic *Escherichia coli* to model transmembrane receptor signalling. *Nat Rev Microbiol* **4**:358-70.
 42. **Heckman, K. L., y L. R. Pease.** 2007. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat Protoc* **2**:924-32.
 43. **Hicks, S., G. Frankel, J. B. Kaper, G. Dougan, y A. D. Phillips.** 1998. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in

- vitro. *Infect Immun* **66**:1570-8.
44. **Horton, H., Moran, L., Ochs, R., Rawn, D. y Scrimgeour, K.** 2002. *Bioquímica*. Ed. Prentice Hall. Pág. 3-5.
 45. **Hovey, A. K., y D. W. Frank.** 1995. Analyses of the DNA-binding and transcriptional activation properties of ExsA, the transcriptional activator of the *Pseudomonas aeruginosa* exoenzyme S regulon. *J Bacteriol* **177**:4427-36.
 46. **Huang, L. H., y W. J. Syu.** 2008. GrIA of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 activates LEE1 by binding to the promoter region. *J Microbiol Immunol Infect* **41**:9-16.
 47. **Hueck, C. J.** 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**:379-433.
 48. **Huffman, J. L., y R. G. Brennan.** 2002. Prokaryotic transcription regulators: more than just the helix-turn-helix motif. *Curr Opin Struct Biol* **12**:98-106.
 49. **Ibarra, J. A., M. I. Villalba, and J. L. Puente.** 2003. Identification of the DNA binding sites of PerA, the transcriptional activator of the *bfp* and *per* operons in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**:2835-47.
 50. **Ide, T., S. Michgehl, S. Knappstein, G. Heusipp, and M. A. Schmidt.** 2003. Differential modulation by Ca²⁺ of type III secretion of diffusely adhering enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **71**:1725-32.
 51. **Iyoda, S., N. Koizumi, H. Satou, Y. Lu, T. Saitoh, M. Ohnishi, y H. Watanabe.** 2006. The GrIR-GrIA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and LEE-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**:5682-92.
 52. **Iyoda, S., y H. Watanabe.** 2004. Positive effects of multiple *pch* genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 to HEp-2 cells. *Microbiology* **150**:2357-571.
 53. **Iyoda, S., y H. Watanabe.** 2005. ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrIR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**:4086-94.
 54. **Jarvis, K. G., J. A. Giron, A. E. Jerse, T. K. McDaniel, M. S. Donnenberg, y J. B. Kaper.** 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:7996-8000.
 55. **Jensen, K. F.** 1993. The *Escherichia coli* K-12 "wild types" W3110 and MG1655 have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels. *J Bacteriol* **175**:3401-7.
 56. **Jiang, Z. y J. Butzler.** 2007. The bacterial pathogens. En *Travelers' Diarrhea*. Ericsson, C., Dupont, H. y Steffen, R. (Eds). BC Decker Inc. Pág. 6-11.
 57. **Jobichen, C., M. Li, G. Yerushalmi, Y. W. Tan, Y. K. Mok, I. Rosenshine, K. Y. Leung, y J. Sivaraman.** 2007. Structure of GrIR and the implication of its EDED motif in mediating the regulation of type III secretion system in EHEC. *PLoS Pathog* **3**:e69.
 58. **Johnson, T. J., y L. K. Nolan.** 2009. Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**:750-74.
 59. **Juhas, M., J. R. van der Meer, M. Gaillard, R. M. Harding, D. W. Hood, y D. W. Crook.** 2009. Genomic islands: tools of bacterial horizontal gene transfer and evolution. *FEMS Microbiol Rev* **33**:376-93.
 60. **Kaper, J. B., Elliott, S., Sperandio, V., Perna, N. T., Mayhew, G. F. y Blattner, F. R.** 1998. Attaching and-effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement. En *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-producing *E. coli* Strains, A. D.O'Brien y J. B. Kaper (Eds.), ASM Press, Washington, D.C. 163-182.
 61. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, y H. L. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**:123-40.
 62. **Kapust, R. B., y D. S. Waugh.** 1999. *Escherichia coli* maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* **8**:1668-74.
 63. **Karch, H.** 2001. The role of virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) associated hemolytic-uremic syndrome. *Semin Thromb Hemost* **27**:207-13.
 64. **Karmali, M. A., B. T. Steele, M. Petric, y C. Lim.** 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic

- syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* **1**:619-20.
65. **Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey, y B. B. Finlay.** 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**:511-20.
 66. **Kenny, B., A. Abe, M. Stein, y B. B. Finlay.** 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* **65**:2606-12.
 67. **Kenny, B.** 1999. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol Microbiol* **31**:1229-41.
 68. **Kim, K. S.** 2001. *Escherichia coli* translocation at the blood-brain barrier. *Infect Immun* **69**:5217-22.
 69. **Knutton, S., D. R. Lloyd, and A. S. McNeish.** 1987. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun* **55**:69-77.
 70. **Levine, M. M., y R. Edelman.** 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev* **6**:31-51.
 71. **Lio, J. C., y W. J. Syu.** 2004. Identification of a negative regulator for the pathogenicity island of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Biomed Sci* **11**:855-63.
 72. **Lucchini, S., G. Rowley, M. D. Goldberg, D. Hurd, M. Harrison, y J. C. Hinton.** 2006. H-NS mediates the silencing of laterally acquired genes in bacteria. *PLoS Pathog* **2**:e81.
 73. **Luscombe, N. M., y J. M. Thornton.** 2002. Protein-DNA interactions: amino acid conservation and the effects of mutations on binding specificity. *J Mol Biol* **320**:991-1009.
 74. **Mayer, M. P.** 1995. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* **163**:41-6.
 75. **McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Donnenberg, y J. B. Kaper.** 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:1664-8.
 76. **Mellies, J. L., A. M. Barron, y A. M. Carmona.** 2007. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infect Immun* **75**:4199-210.
 77. **Mellies, J. L., S. J. Elliott, V. Sperandio, M. S. Donnenberg, y 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.
 78. **Mekalanos, J. J.** 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* **174**:1-7.
 79. **Moon, H. W., S. C. Whipp, R. A. Argenzio, M. M. Levine, y R. A. Giannella.** 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* **41**:1340-51.
 80. **Morschhauser, J., G. Kohler, W. Ziebuhr, G. Blum-Oehler, U. Dobrindt, y J. Hacker.** 2000. Evolution of microbial pathogens. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **355**:695-704.
 81. **Munson, G. P., y J. R. Scott.** 1999. Binding site recognition by Rns, a virulence regulator in the AraC family. *J Bacteriol* **181**:2110-7.
 82. **Nataro, J. P., y J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**:142-201.
 83. **Navarre, W. W., S. Porwollik, Y. Wang, M. McClelland, H. Rosen, S. J. Libby, y F. C. Fang.** 2006. Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* **313**:236-8.
 84. **Oshima, T., S. Ishikawa, K. Kurokawa, H. Aiba, y N. Ogasawara.** 2006. *Escherichia coli* histone-like protein H-NS preferentially binds to horizontally acquired DNA in association with RNA polymerase. *DNA Res* **13**:141-53.
 85. **Percival, S., R. M. Chalmers, M. Embrey, P. Hunter, J. Sellwood y P. Wyn-Jones.** 2004. Microbiology of waterborne diseases. *El Sevier. Pág.* 78-84.
 86. **Petty, N. K., R. Bulgin, V. F. Crepin, A. M. Cerdano-Tarraga, G. N. Schroeder, M. A. Quail, N. Lennard, C. Corton, A. Barron, L. Clark, A. L. Toribio, J. Parkhill, G. Dougan, G. Frankel, y N. R. Thomson.** 2010. The *Citrobacter rodentium* genome sequence reveals

- convergent evolution with human pathogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol **192**:525-38.
87. **Porter, M. E., P. Mitchell, A. Free, D. G. Smith, y D. L. Gally.** 2005. The LEE1 promoters from both enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* can be activated by PerC-like proteins from either organism. J Bacteriol **187**:458-72.
 88. **Promega Corporation.** 2007. Pull-Down Assays, Protein Interaction guide, BR188. 7-8.
 89. **Prouty, M. G., C. R. Osorio, y K. E. Klose.** 2005. Characterization of functional domains of the Vibrio cholerae virulence regulator ToxT. Mol Microbiol **58**:1143-56.
 90. **Saitoh, T., S. Iyoda, S. Yamamoto, Y. Lu, K. Shimuta, M. Ohnishi, J. Terajima, y H. Watanabe.** 2008. Transcription of the ehx enterohemolysin gene is positively regulated by GrlA, a global regulator encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. J Bacteriol **190**:4822-30.
 91. **Sanchez-SanMartin, C., V. H. Bustamante, E. Calva, y J. L. Puente.** 2001. Transcriptional regulation of the *orf19* gene and the *tir-cesT-eae* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. J Bacteriol **183**:2823-33.
 92. **Sathyapriya, R., y S. Vishveshwara.** 2004. Interaction of DNA with clusters of amino acids in proteins. Nucleic Acids Res **32**:4109-18.
 93. **Scaletsky, I. C., M. L. Silva, y L. R. Trabulsi.** 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. Infect Immun **45**:534-6.
 94. **Schmidt, H., and M. Hensel.** 2004. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. Clin Microbiol Rev **17**:14-56.
 95. **Senerwa, D., O. Olsvik, L. N. Mutanda, K. J. Lindqvist, J. M. Gathuma, K. Fossum, y K. Wachsmuth.** 1989. Enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O111:HNT isolated from preterm neonates in Nairobi, Kenya. J Clin Microbiol **27**:1307-11.
 96. **Shakhnovich, E. A., B. M. Davis, y M. K. Waldor.** 2009. Hfq negatively regulates type III secretion in EHEC and several other pathogens. Mol Microbiol **74**:347-63.
 97. **Sharma, V. K., y 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.
 98. **Shin, S., M. P. Castanie-Cornet, J. W. Foster, J. A. Crawford, C. Brinkley, y J. B. Kaper.** 2001. An activator of glutamate decarboxylase genes regulates the expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator, Per. Mol Microbiol **41**:1133-50.
 99. **Spears, K. J., A. J. Roe, y D. L. Gally.** 2006. A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. FEMS Microbiol Lett **255**:187-202.
 100. **Sperandio, V., J. L. Mellies, R. M. Delahay, G. Frankel, J. A. Crawford, W. Nguyen, y J. B. Kaper.** 2000. Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler. Mol Microbiol **38**:781-93.
 101. **Sperandio, V., C. C. Li, y 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.
 102. **Staley, T. E., L. D. Corley, y E. W. Jones.** 1970. Early pathogenesis of colitis in neonatal pigs monocontaminated with *Escherichia coli*. Fine structural changes in the colonic epithelium. Am J Dig Dis **15**:923-35.
 103. **Stenutz, R., A. Weintraub, y G. Widmalm.** 2006. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. FEMS Microbiol Rev **30**:382-403.
 104. **Tendeng, C., y P. N. Bertin.** 2003. H-NS in Gram-negative bacteria: a family of multifaceted proteins. Trends Microbiol **11**:511-8.
 105. **Tramonti, A., P. Visca, M. De Canio, M. Falconi, y D. De Biase.** 2002. Functional characterization and regulation of *gadX*, a gene encoding an AraC/XylS-like transcriptional activator of the *Escherichia coli* glutamic acid decarboxylase system. J Bacteriol **184**:2603-13.
 106. **Tree, J. J., E. B. Wolfson, D. Wang, A. J. Roe, y D. L. Gally.** 2009. Controlling injection: regulation of type III secretion in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Trends Microbiol **17**:361-70.
 107. **Turner, S. M., A. Scott-Tucker, L. M. Cooper, y I. R. Henderson.** 2006. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett **263**:10-20.
 108. **Umanski, T., I. Rosenshine, y D. Friedberg.** 2002. Thermoregulated expression of virulence

- genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **148**:2735-44.
109. **Vallance, B. A., C. Chan, M. L. Robertson, y B. B. Finlay.** 2002. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: emerging themes in pathogenesis and prevention. *Can J Gastroenterol* **16**:771-8.
 110. **Vallance, B. A., y B. B. Finlay.** 2000. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:8799-806.
 111. **Vidal, J. E., A. Canizalez-Roman, J. Gutierrez-Jimenez, y F. Navarro-Garcia.** 2007. Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex* **49**:376-86.
 112. **Villalba, M.** 2006. Estudio sobre el papel de PerC y GrIA en la regulación del gen *ler* de *Escherichia coli* enteropatógena. (Tesis de maestría). Instituto de Biotecnología, UNAM.
 113. **Wales, A. D., M. J. Woodward, y G. R. Pearson.** 2005. Attaching-effacing bacteria in animals. *J Comp Pathol* **132**:1-26.
 114. **Weintraub, A.** 2007. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *J Med Microbiol* **56**:4-8.
 115. **Wiles, T. J., R. R. Kulesus, y M. A. Mulvey.** 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* **85**:11-9.