



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LICENCIATURA EN BIOTECNOLOGÍA

“ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN DEL GEN *nleH1* MEDIADA POR GrlA
EN *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA”

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

MARÍA ALESSANDRA EROSA RIVERA

DIRECTORA:

M. EN C. CRISTINA LARA OCHOA

CODIRECTORA:

M. EN C. STEPHANIE ORTIZ JIMÉNEZ
(Instituto de Biotecnología, UNAM)

COMITÉ SINODAL:

DRA. LILIANA LOPEZ PLIEGO (ICUAP, BUAP)
DR. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA (IBt, UNAM)

PUEBLA, PUE., 27- SEPTIEMBRE- 2023



Agradecimientos

Al **Dr. José Luis Puente García** por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme esta gran oportunidad en mi formación académica, por su asesoramiento, confianza y apoyo en el ámbito académico y personal.

Agradezco de manera muy especial a la **M. en C. Stephanie Ortiz Jiménez** quién fue un pilar fundamental en el desarrollo de este trabajo, por su mentoría en la parte experimental y escrita, por su invaluable apoyo, paciencia, consejos, cariño y porras para no dejarme rendir.

A todos los miembros del **Lab-2 del Instituto de Biotecnología de la UNAM**; gracias por su compañerismo y por hacer más ameno los días de trabajo.

A **Jimena, Alan, Marco, Isela y Liliana**; gracias por las pláticas, las risas, su cariño y amistad. Me alegro de haber conocido personas tan especiales como ustedes.

A la **Dra. Alejandra Vázquez**; gracias por su tutela en la construcción de las cepas etiquetadas con el epítotope 3XFLAG, por compartirme sus tips de trabajo y ser una grandiosa compañera de mesa de trabajo.

También agradezco a la **Dra. Lucía Perezgasga Ciscomani** y el **Biólogo Francisco Javier Santana Estrada** por estar al pendiente de lo que necesitara y por el apoyo técnico durante mi estancia.

A la **M. en C. Cristina Lara Ochoa** por las clases impartidas durante la licenciatura que hicieron interesarme por la sorprendente y bella área de la Microbiología Molecular y por el apoyo en mi formación académica.

A la **Dra. Liliana López Pliego** por formar parte del comité sinodal y por las sugerencias para la mejora del presente proyecto.

Para la realización de este trabajo se contó con financiamiento del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**: 239659 y FC-2015-2/950 y de la UNAM a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT-DGAPA): IN218322.

Dedicatoria

A **mi familia**, mi manada, de quienes también es este logro.

A mis padres, **Wilbert y Charo**; mi mayor ejemplo de perseverancia y fortaleza. Gracias por brindarme su amor y apoyo incondicional, por recorrer conmigo este camino e impulsarme a perseguir mis sueños. Les agradezco por ayudar a construir y forjar la persona que hoy en día soy y de quien espero siempre puedan sentirse orgullosos.

A mi hermana, **Andrea**; por ser un importante pilar en mi vida. Gracias por inspirar, por ser mi cómplice y mi mejor amiga.

A mi compañerito más fiel, **Lobo**; ya no estás aquí conmigo, pero tu amor y los innumerables recuerdos vividos junto a ti por siempre tendrán un lugar muy especial en mi corazón.

A mis abuelos: **Raquel, Miguel, Wilbert y Liduvina**; gracias por los apapachos, cuidados, historias y lecciones de vida. En memoria de mi papá Migue, un kiko y un abrazo hasta el cielo.

A mis **tíos, primos y pugs Bustamante Rivera**; gracias por acogerme en su hogar y brindarme su cariño y apoyo para alcanzar mis metas profesionales.

A mi **Jesús**; a quién admiro y quiero profundamente. Gracias por siempre estar y creer en mí más de lo que a veces yo hago.

A personas maravillosas que la universidad me permitió conocer: **José Marcos, Ricardo, Mary Fer, Jesús y Yareth**; gracias por las aventuras compartidas, por brindarme su valiosa amistad y cariño.

Finalmente, sin la intención de ser egocéntrica, quisiera dedicarme unas palabras a mí misma. **Alessandra**; gracias por ser valiente porque, aunque no ha sido un camino sencillo, has aprendido y logrado más de lo que alguna vez imaginaste. Recuerda que día con día estás construyendo el hábito de recordarte que si puedes.

Índice General

| | |
|--|------------|
| Lista de abreviaturas | i |
| Índice de Figuras y Tablas..... | iii |
| Resumen | iv |
| 1. Introducción..... | 1 |
| 1.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)..... | 2 |
| 1.2 Mecanismo de patogenicidad de EPEC | 3 |
| 1.3 Factores de virulencia de EPEC..... | 5 |
| 1.3.1 pEAF..... | 5 |
| 1.3.2 La isla LEE..... | 6 |
| 1.3.3 Sistema de secreción tipo III..... | 7 |
| 1.3.4 Proteínas efectoras del SST3..... | 8 |
| 1.4 Regulación de los genes de virulencia de EPEC | 11 |
| 2. Antecedentes | 14 |
| 2.1 El papel de NleH en la patogenicidad de EPEC | 14 |
| 2.2 Regulación de <i>nleH1</i> | 15 |
| 3. Planteamiento del problema | 20 |
| 4. Hipótesis..... | 21 |
| 5. Objetivos | 21 |
| 5.1 General | 21 |
| 5.2 Específicos..... | 21 |
| 6. Metodología..... | 22 |
| 6.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento | 22 |
| 6.2 Construcción de fusiones al gen reporte <i>cat</i> | 25 |
| 6.3 Ensayos de actividad transcripcional | 27 |
| 6.4 Construcción de cepas etiquetadas <i>nleH1::3xFLAG-kan</i> | 29 |
| 6.5 Ensayo <i>western blot</i> | 30 |
| 7. Resultados | 32 |
| 7.1 El motivo ATGT-2, adyacente a la caja -35, no participa en la activación de <i>nleH1</i> | 32 |
| 7.2 Una región espaciadora de 17 pb mejora la expresión de <i>nleH1</i> pero no la vuelve independiente de GrlA..... | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 7.3 Expresión de NleH1 bajo la influencia de reguladores específicos de los genes de virulencia de EPEC. | 38 |
| 8. Discusión..... | 42 |
| 9. Conclusiones | 51 |
| 10. Perspectivas..... | 52 |
| 11. Bibliografía..... | 53 |

Lista de abreviaturas

| | |
|----------------|--|
| A/E | Adherencia y esfacelamiento (<u>A</u> ttaching and <u>E</u> ffacing) |
| Arp 2/3 | Proteínas 2 y 3 relacionadas con la actina (<u>A</u> ctin- <u>r</u> elated <u>p</u> roteins 2 and 3) |
| Bfp | Pilus formador de mechones (<u>B</u> undle- <u>f</u> orming <u>p</u> ilus) |
| BI-1 | Bax Inhibidor-1 (<u>B</u> ax <u>I</u> nhibitor- <u>1</u>) |
| CRKL | Proteína similar al oncogén CT10 del virus del sarcoma v-Crk (v-Crk sarcoma virus CT10 oncogene-like protein) |
| DMEM | Medio Eagle's modificado de Dulbecco (<u>D</u> ulbecco's <u>m</u> odified <u>E</u> agle's <u>M</u> edium) |
| EAEC | <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (<u>E</u> nteroaggregative <u>E</u> scherichia coli) |
| EAF | Factor de adherencia de EPEC (<u>E</u> PEC <u>a</u> dherence <u>f</u> actor) |
| ECP | Pilus común de <i>E. coli</i> (<u>E</u> . coli <u>c</u> ommon <u>p</u> ilus) |
| EHEC | <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>) |
| EPEC | <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (<u>E</u> nteropathogenic <u>E</u> . <u>c</u> oli) |
| ETEC | <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (<u>E</u> nterotoxigenic <u>E</u> . <u>c</u> oli) |
| GriA | Regulador global del LEE-activador (<u>G</u> lobal <u>r</u> egulator of <u>L</u> EE- <u>a</u> ctivator) |
| GriR | Regulador global del LEE-Represor (<u>G</u> lobal <u>r</u> egulator of <u>L</u> EE- <u>r</u> epressor) |
| H-NS | Proteína estructurante del nucleoide tipo histona (<u>H</u> istone- <u>l</u> ike <u>n</u> ucleoid- <u>s</u> tructuring protein) |
| LEE | Locus de destrucción del enterocito (<u>L</u> ocus of <u>E</u> nterocyte <u>E</u> ffacement) |
| Ler | Regulador codificado en LEE (<u>L</u> EE- <u>e</u> ncoded <u>r</u> egulator) |
| LifA | Factor de inhibición de linfocitos (<u>L</u> ymphocyte <u>i</u> nhibitory <u>f</u> actor) |

| | |
|-----------------|---|
| Map | Proteína asociada a mitocondria (<u>M</u> itochondrion- <u>a</u> ssociated <u>p</u> rotein) |
| Nle | Efectores no codificados en LEE (<u>N</u> on- <u>L</u> EE- <u>e</u> ncoded effector) |
| NRIR | Secuencia invertida repetida reguladora de <i>nle</i> (<u>n</u> le <u>r</u> egulatory <u>i</u> nverted <u>r</u> ep <u>e</u> at) |
| N-WASP | Proteína del síndrome neural Wiskott-Aldrich (<u>N</u> eural- <u>W</u> iskott <u>A</u> ldrich <u>s</u> yn <u>d</u> rome <u>p</u> rotein). |
| ORF | Marco de lectura abierta (<u>O</u> pen <u>R</u> eading <u>F</u> rame) |
| PBS | Solución amortiguadora de fosfatos salino (<u>P</u> hosphate- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline) |
| Per | Regulador codificado en plásmido (<u>P</u> lasmid- <u>e</u> ncoded regulator) |
| SDS-PAGE | Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate <u>P</u> olyacrylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis). |
| SPATE | Autotransportadores de serina proteasa de Enterobacteriaceae (<u>S</u> erine <u>P</u> rotease <u>A</u> utotransporters of <u>E</u> nterobacteriaceae) |
| SST3 | Sistema de secreción tipo III (<u>T</u> ype III <u>S</u> ecretion <u>S</u> ystem) |
| Tir | Receptor translocado de intimina (<u>t</u> ranslocated <u>i</u> ntimin receptor) |

Índice de Figuras y Tablas

Figuras

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Lesión histopatológica A/E | 3 |
| Figura 2. Mecanismo de patogenicidad de EPEC..... | 4 |
| Figura 3. Isla de patogenicidad LEE de EPEC..... | 7 |
| Figura 4. Sistema de secreción tipo III de EPEC | 8 |
| Figura 5. Efectores no codificados en la isla LEE de EPEC | 9 |
| Figura 6. Regulación de los factores de virulencia de EPEC..... | 13 |
| Figura 7. Alineamiento de las secuencias promotoras de los genes <i>nle</i> que contienen NRIR | 15 |
| Figura 8. La región NRIR es esencial para la activación de <i>nleH1</i> y <i>nleB2</i> en EPEC. | 15 |
| Figura 9. Alineamiento de los genes <i>ler</i> y <i>E1013</i> con los <i>nle</i> portadores del NRIR | 16 |
| Figura 10. GrlA y la región ATGT-1 son esenciales para la activación de <i>nleH1</i> | 18 |
| Figura 11. Representación esquemática de las fusiones transcripcionales pKKnleH1-3, pKKnleH1-14 y pKKnleH1-19 | 32 |
| Figura 12. El motivo ATGT-2 no es importante para la expresión de <i>nleH1</i> | 34 |
| Figura 13. El ATGT-2 no está involucrado en la regulación de <i>nleH1</i> en <i>E. coli</i> K12..... | 35 |
| Figura 14. Representación esquemática de las fusiones transcripcionales pKKnleH1-17, pKKnleH1-18, pKKnleH1-20, pKKnleH1-21..... | 36 |
| Figura 15. La expresión de <i>nleH1</i> es afectada cuando se modifica el tamaño de la región espaciadora entre las cajas -10 y -35 | 37 |
| Figura 16. La expresión de <i>nleH1</i> mediada por GrlA es independiente de la extensión de la región espaciadora | 38 |
| Figura 17. Detección de NleH1-FLAG y NleA-FLAG por <i>western blot</i> | 39 |
| Figura 18. Expresión de NleH1 bajo el control de reguladores específicos de la isla LEE | 41 |
| Figura 19. Modelo propuesto del mecanismo de regulación de <i>nleH1</i> .. ¡Error! Marcador no definido. | |

Tablas

| | |
|--|-----------|
| Tabla 1. Principales funciones de las proteínas efectoras de EPEC E2348/69..... | 10 |
| Tabla 2. Cepas y plásmidos..... | 22 |
| Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados. | 26 |

Resumen

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es un agente causal de diarrea infantil predominante en países en vías de desarrollo. Una característica de su infección es la formación de la lesión A/E (Ataching and Effacing) que se distingue por la unión íntima a los enterocitos, la eliminación de las microvellosidades y la formación de estructuras de tipo pedestal ricas en actina. Para ello, EPEC emplea un sistema de secreción tipo III (SST3) que le permite translocar proteínas efectoras con el objetivo de subvertir la señalización celular. Los genes requeridos para la lesión A/E están codificados principalmente en la isla de patogenicidad LEE (Locus of enterocyte effacement). Sin embargo, distribuidos de manera dispersa en el cromosoma principalmente asociados a profagos, se encuentran los genes *nle* (non-LEE-encoded) que codifican para proteínas efectoras que son igualmente translocadas por el SST3. Si bien la regulación de la isla LEE ha sido descrita en detalle, poco se sabe de los mecanismos que regulan la expresión de los genes *nle* y de si éstos se encuentran en coordinación con los genes del LEE.

En este trabajo, confirmamos que los reguladores GrlA y GrlR, codificados por la isla LEE, intervienen en la regulación del gen *nleH1*, el cual codifica para el efector NleH1 que participa en la modulación de la respuesta inmune innata del hospedero.

Observamos que las condiciones de crecimiento que favorecen la expresión del LEE no son las óptimas para activar la de *nleH1*; sin embargo, la expresión de *nleH1* es modulada por los reguladores GrlA y GrlR. La participación de GrlA en la activación de una fusión *nleH1-cat* se hace más evidente cuando este activador es sobreexpresado en *E. coli* K12. Además, se observó que Ler, el regulador maestro del LEE, podría regular de forma indirecta a *nleH1* al igual que PerC, un activador codificado en el plásmido EAF.

Previamente, se demostró que el motivo ATGT-1, presente río arriba de la caja -10 en la región reguladora de *nleH1*, es esencial para la unión con GrlA. En cambio, encontramos que un segundo motivo ATGT-2, adyacente a la caja -35, no participa en la regulación de *nleH1*.

Se ha propuesto que la interacción de GrlA con la región reguladora de *ler*, corrige el efecto que genera que la secuencia espaciadora entre las cajas -10 y -35 sea de 18 pb. En este trabajo demostramos que el efecto regulador de GrlA sobre *nleH1* es independiente de la extensión subóptima de 18 pb de la región espaciadora; sin embargo, la alteración de la región espaciadora afecta los niveles de expresión de *nleH1* con o sin GrlA, ya que una región espaciadora óptima de 17 pb (cuando no se afecta la posición -15) mejora la actividad de *nleH1*, pero cuando se reduce a 16 pb el promotor se inactiva.

En conjunto, estos resultados aportan al conocimiento de la regulación de *nleH1* y contribuyen al entendimiento de la regulación de los genes *nle* que conservan elementos característicos como el motivo ATGT-1 en su región reguladora, así como la interacción con GrlA.

1. Introducción

Escherichia coli es una bacteria Gram-negativa anaerobia facultativa de la familia *Enterobacteriaceae* dentro de la clase *Gammaproteobacteria* que reside en el intestino de los animales de sangre caliente incluyendo el ser humano (Jang *et al.*, 2017). *E. coli* coloniza el tracto gastrointestinal de los lactantes pocas horas después del nacimiento, estableciendo una asociación permanente y comensal; de manera que este microorganismo pasa a formar parte importante de la microbiota intestinal, siendo la especie más abundante durante los primeros meses de vida (Kaper *et al.*, 2004).

A pesar de que la mayoría de las cepas de *E. coli* son inocuas, existen algunas con el potencial para causar un amplio espectro de enfermedades. La adquisición de nuevos genes a través de la transferencia horizontal de elementos genéticos como fagos, plásmidos e islas de patogenicidad, así como mutaciones patoadaptativas, han permitido la evolución de cepas patogénicas o patotipos (Ahmed *et al.*, 2008; Chattopadhyay & Sokurenko, 2013; Jang *et al.*, 2017).

Las infecciones causadas por *E. coli* patógena pueden ocasionar tres síndromes clínicos generales: 1) infección del tracto urinario, 2) sepsis/meningitis, y 3) enfermedad entérica o diarreica (Nataro & Kaper, 1998).

La Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO, World Health Organization) define como diarrea a la deposición de heces sueltas o líquidas con una frecuencia mayor que la normal para la persona. Comúnmente es resultado de una infección gastro-intestinal ocasionada por virus, bacterias o parásitos que son transmitidos vía oral-fecal o por la contaminación de agua y alimentos (OMS, 2017). De acuerdo con cifras reportadas por la OMS (2017), las enfermedades diarreicas provocan el deceso de 525 000 infantes cada año, convirtiéndose en la segunda causa de muerte de niños menores de cinco años.

E. coli es uno de los principales contribuyentes de episodios de diarrea aguda en niños, se ha estimado que causa entre el 30% y 40% de los casos de diarrea en

países económicamente en desarrollo (Angulo-Zamudio *et al.*, 2021; O’Ryan *et al.*, 2005). Se han descrito seis patotipos clínicamente importantes: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* adherente difusa (DAEC) y *E. coli* enteropatógena (EPEC) (Nataro & Kaper, 1998).

1.1 *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

EPEC coloniza el intestino delgado provocando diarrea acuosa de tipo aguda y persistente (> 14 días), que puede ocurrir en diversos grados de intensidad y que suele acompañarse de vómito, fiebre y deshidratación (Croxen *et al.*, 2013). Su infección representa una importante causa de mortalidad y morbilidad infantil, principalmente en países en vías de desarrollo, incluyendo México. Siendo los niños menores de dos años la población más susceptible y la de mayor prevalencia los lactantes de hasta seis meses (Patzí-Vargas *et al.*, 2015; Vidal *et al.*, 2007)

EPEC pertenece a la familia de patógenos bacterianos A/E de la que también forma parte EHEC, agente causal de diarrea hemorrágica que puede complicarse a síndrome urémico hemolítico, y el patógeno murino *Citrobacter rodentium*, el cual ocasiona hiperplasia del colon (Nataro *et al.*, 1998). Este grupo se distingue por la habilidad de producir una histopatología en la superficie de las células epiteliales intestinales llamada lesión de adherencia y esfacelamiento (A/E), que se caracteriza por la eliminación localizada de las microvellosidades, seguido del reordenamiento del citoesqueleto debajo del sitio de adherencia bacteriana, lo que conduce a la formación de estructuras en forma de copa o pedestal ricas en actina que favorecen una interacción íntima entre la bacteria y la célula hospedera (Figura 1) (Kaper *et al.*, 2004). Se atribuye que la diarrea inducida por EPEC se debe principalmente a la lesión A/E, ya que produce una disminución en la superficie de absorción que conduce a una alteración en el gradiente electroquímico, un incremento de la permeabilidad celular e inflamación intestinal (Croxen *et al.*, 2010; Vidal *et al.*, 2007).

La cepa E2348/69, serotipo O127:H6, aislada en Taunton, Reino Unido en 1969, es el prototipo de EPEC. Esta cepa comprende de un cromosoma circular de 4,965,553 pb y de dos elementos extra cromosómicos: el plásmido EAF (EPEC adherence factor), también conocido como pMAR2, de 97,978 pb y el plásmido pE2348-2, de 6,147 pb, que confiere resistencia al antibiótico estreptomicina, Además, se han identificado 13 profagos, 8 elementos integrativos y 168 pseudogenes con codones de paro prematuros o remanentes de genes de otras bacterias (Iguchi *et al.*, 2009).

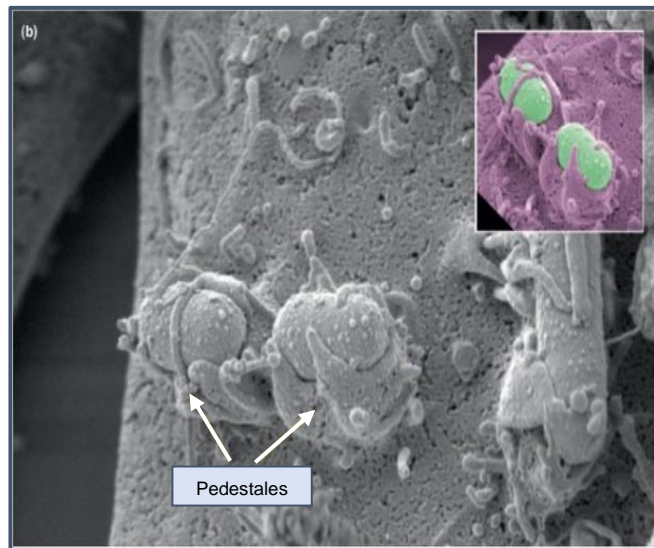


Figura 1. Lesión histopatológica A/E. La reabsorción y reorganización de las microvellosidades conduce la formación de pedestales (flechas amarillas) por la adherencia íntima de EPEC a la célula hospedera. En el recuadro superior se ilustra la imagen pseudocoloreada; bacterias EPEC (verde) y células de mamífero (púrpura). Tomado de Bhatt *et al.*, (2011).

1.2 Mecanismo de patogenicidad de EPEC

Donnenberg & Kaper (1992) propusieron un modelo de tres etapas del proceso de infección de EPEC: (i) adherencia localizada, (ii) transducción de señales, y (iii) adherencia íntima (Figura 2).

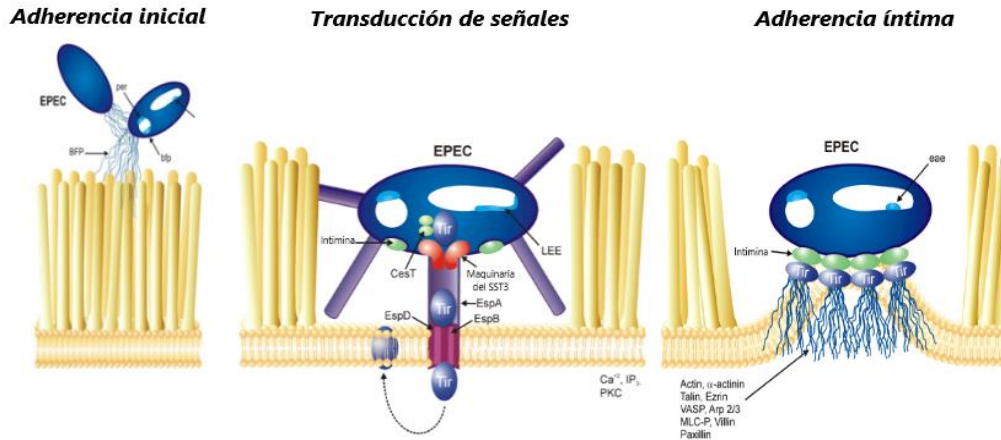


Figura 2. Mecanismo de patogenicidad de EPEC. 1) *Adherencia inicial*: la bacteria se establece y adhiere a la superficie del enterocito mediante la fimbria BFP, 2) *Transducción de señales*: la bacteria transloca efectores mediante un SST3 al interior de la célula hospedera alterando procesos celulares y, 3) *Adherencia íntima*: el efector Tir actúa como receptor de la proteína de membrana externa intimina, ocasionando el reordenamiento del citoesqueleto que media la lesión A/E. Modificado de Strynadka & Ness (2002).

La adherencia inicial es el resultado de la interacción de EPEC con las células epiteliales a través de una fimbria llamada BFP (Bundle-Forming Pilus), y de otras adhesinas como: LifA, EspA, el flagelo, el pilus común de *E. coli* (ECP) (Saldaña *et al.*, 2009; Torres, 2006). Posteriormente, a través de un SST3, EPEC transloca proteínas efectoras que subvierten rutas la transducción de señales y funciones celulares que alteran la homeostasis y las defensas inmunitarias del hospedero, lo que da como resultado el establecimiento de la infección (Pinaud *et al.*, 2018). Dentro de los efectores destaca la participación de Tir (translocated intimin receptor), el cual interacciona con la proteína de membrana externa intimina. Este suceso es el que conduce a la tercera etapa, que como lo indica su nombre se caracteriza porque EPEC se une íntimamente a la membrana de la célula epitelial. Cuando Tir es translocado a la célula, se inserta en la membrana de la célula eucariota formando una horquilla en la superficie que interactúa con la intimina y proyecta sus extremos amino y carboxilo terminal hacia el citosol (Kenny, 1999). Tir entonces se fosforila en un residuo de tirosina en la posición 474 que permite el reclutamiento de la proteína adaptadora Nck del hospedero, que activa a proteínas reguladoras del citoesqueleto como N-WASP (Neural-Wiskott Aldrich sndrome

protein) y el complejo Arp 2/3 (Actin-related proteins 2 and 3) conduciendo a la formación de los pedestales de actina (Croxen *et al.*, 2013; Garmendia *et al.*, 2005).

1.3 Factores de virulencia de EPEC

Los genes que codifican para los principales factores de virulencia de EPEC se encuentran localizados en el plásmido EAF (pEAF) y en la isla de patogenicidad LEE.

1.3.1 pEAF

El pEAF comprende a los operones *bfp* y *per* (plasmid-encoded regulator) (Nisa *et al.*, 2013).

El locus *bfp* codifica para BFP, una fimbria tipo IV. Los pili o fimbrias son apéndices largos y delgados parecidos a “pelos” o “mechones” que se extienden desde la superficie bacteriana y son estructuras de interacción clave para la colonización en ambientes extremadamente versátiles como el intestino humano. Este operón consta de 14 genes dispuestos en tándem: *bfpA*, *bfpB*, *bfpC*, *bfpD*, *bfpE*, *bfpF*, *bfpG*, *bfpH*, *bfpI*, *bfpJ*, *bfpK*, *bfpL*, *bfpP* y *bfpU*, cuyos productos son necesarios para la biogénesis de BFP (De Masi *et al.*, 2013; Sohel *et al.*, 1996). La fimbria BFP es un factor de virulencia clave en la adherencia de EPEC a los enterocitos y durante la infección en humanos.

Existe una subclasificación de EPEC con base en la presencia del pEAF, se denomina como EPEC típica (tEPEC) a las cepas que contienen el pEAF y, por tanto expresan la fimbria BFP, permitiendo su adhesión a las células epiteliales en un patrón llamado adherencia localizada. Mientras que se conoce como EPEC atípica (aEPEC) a aquellos aislados que no contienen el pEAF, por lo que muestran un patrón de adherencia distinto como la adherencia semejante a la localizada, adherencia difusa o adherencia agregada (Blank *et al.*, 2002; Nisa *et al.*, 2013; Torres, 2006). Empero, ambos patotipos, tEPEC y aEPEC, tienen la habilidad de formar las lesiones A/E.

Por otro lado, el locus *perABC*, también conocido como *bfpTVW*, consta de tres genes *perA* (*bfpT*), *perB* (*bfpV*) y *perC* (*bfpW*). El primer gen codifica para la proteína PerA, un regulador transcripcional de la familia AraC que se encarga de la regulación positiva de los operones *bfp* y *per*, el segundo gen codifica para PerB que se encuentra implicada en la activación de *bfp* y, el último gen codifica para PerC, un regulador transcripcional atípico que participa en la activación de los genes de la isla LEE (Gómez-Duarte & Kaper, 1995; Tobe *et al.*, 1996).

1.3.2 La isla LEE

Los genes que codifican para los componentes estructurales del SST3, proteínas efectoras, reguladores y chaperonas que son responsables del fenotipo A/E, se agrupan en la isla de patogenicidad LEE de 35,624 kb con un contenido promedio de G + C de 38,36%. Engloba 41 ORFs organizados en cinco operones policistrónicos: *LEE1-LEE5*, dos operones bicistrónicos: *rorf1-espG* (*LEE6*) y *grlR-grlA* (*LEE7*), y cuatro unidades transcripcionales: *etgA*, *cesF*, *map* y *escD* (Figura 3) (Elliott *et al.*, 1998; Gaytán *et al.*, 2016).

Los operones *LEE1*, *LEE2* y *LEE3*, además de contener a los grupos de genes *esc* y *sep* que codifican para las proteínas estructurales del SST3, también incluyen otros genes relevantes para la patogenicidad. El primer gen del operón *LEE1* codifica para una proteína de unión a DNA llamada Ler (LEE-encoded regulator) considerado como el regulador maestro de la expresión de la isla LEE. Mientras que los operones *LEE2* y *LEE3* codifican para los efectores EspZ y EspH, respectivamente. El operón *LEE4* codifica para los genes de las proteínas translocadoras EspA, EspB y EspD, el efector EspF y reguladores involucrados en la secreción de los efectores. En el operón *LEE5* se ubican los genes involucrados en la adhesión íntima de EPEC a la célula huésped, como *tir*, *cesT* y *ea*e (EPEC attaching and effacing), este último codifica para la proteína de membrana externa llamada intimina. Finalmente, *LEE7* comprende a los reguladores globales de la isla LEE; GrIR (Global regulator of LEE-Repressor) y GrIA (Global regulator of LEE-Activator) (Elliott *et al.*, 1998; Gaytán *et al.*, 2016; Pearson *et al.*, 2016).

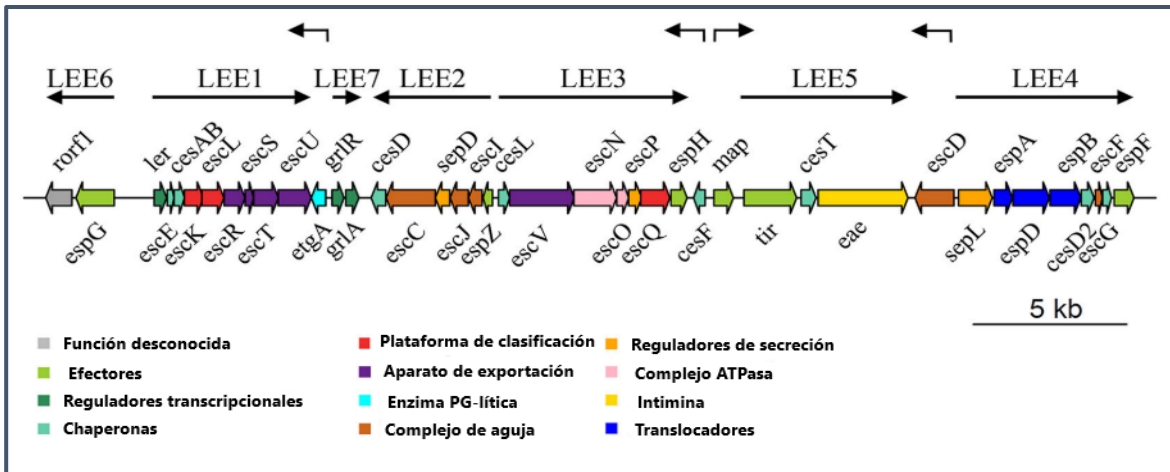


Figura 3. Isla de patogenicidad LEE de EPEC. Se ilustra la organización de los 41 ORFs y función que desempeña cada uno. PG, peptidoglucano. Modificado de Gaytán *et al.* (2016).

1.3.3 Sistema de secreción tipo III

El SST3, también llamado inyectisoma, es una maquinaria molecular de 35 MDa ampliamente distribuido en bacterias Gram-negativas que permite translocar proteínas denominadas efectores directamente del citoplasma bacteriano al citosol de la célula huésped, favoreciendo la supervivencia y la colonización bacteriana. Consiste en una estructura en forma de aguja que sobresale de la superficie bacteriana, con un canal central de 2-3 nm de diámetro y una sucesión de anillos que abarcan la membrana interna (MI) y externa (ME) llamado cuerpo basal (Figura 4). El ensamblaje de esta maquinaria compuesta por alrededor de 20 proteínas ocurre de forma secuencial y coordinada; inicialmente se forma el cuerpo basal, en donde se establecen EscD y EscJ que forman dos anillos en la MI y la proteína EscC que forma un anillo en la ME. Luego, EscI forma una varilla interna periplásmica que conecta ambas estructuras. Además, en la MI se localiza un complejo llamado aparato de exportación, compuesto por EscR, EscS, EscT, EscU y EscV. Mientras que la plataforma del cuerpo basal es llamado anillo C formado por EscQ, EscK y EscL. El ensamble y funcionamiento del SST3 requiere de energía, la cual es suministrada por el complejo ATPasa: EscN, EscL y EscO. A continuación, EscF se ensambla con EscC para formar la punta de la estructura de aguja. Eventualmente, tres proteínas translocadoras intervienen para formar un puente que permita la

conexión de la aguja con el citoplasma de la célula huésped. Primero, la proteína filamentosa EspA se ensambla directamente con EscF y se polimeriza formando un conducto cilíndrico que permite extender la estructura de aguja. Después, EspB y EspD se localizan en la membrana de la célula huésped para formar un complejo llamado SST3-translocón, que crea un poro que permite la inyección directa de las proteínas efectoras (De Masi *et al.*, 2013; Gaytán *et al.*, 2016).

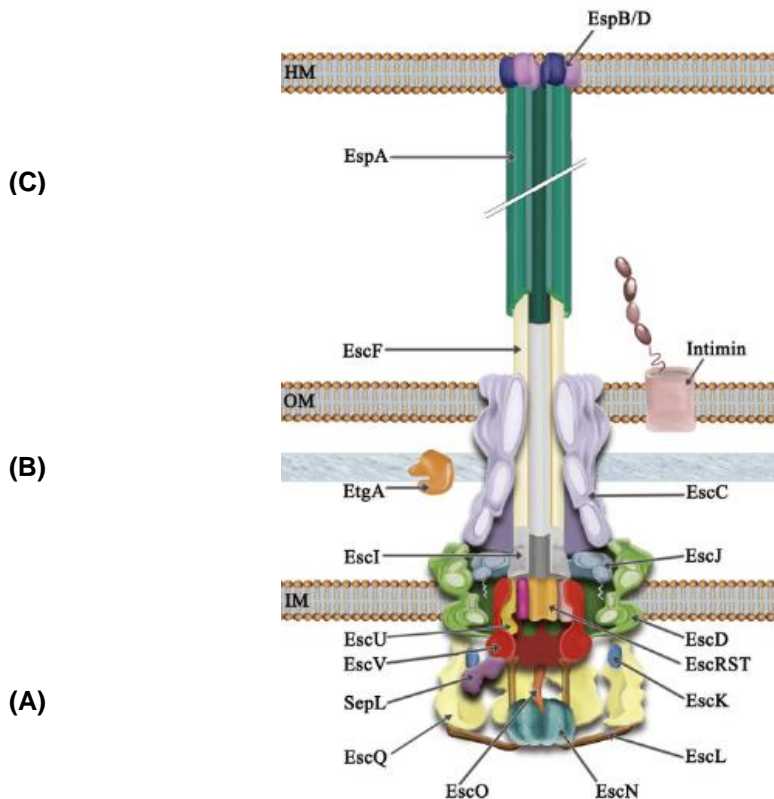


Figura 4. Sistema de secreción tipo III de EPEC. Su estructura puede ser dividida en tres partes principales: (A) componentes citoplásmicos, (B) cuerpo basal y (C) componentes de translocación. También se ilustra la proteína de la membrana externa intimina y la enzima lítica de peptidoglicano EtgA. **HM:** membrana del hospedero, **IM:** membrana interna, **OM:** membrana externa. Modificado de Gaytán *et al.* (2016).

1.3.4 Proteínas efectoras del SST3

A través del SST3, EPEC secreta un amplio repertorio de proteínas efectoras que se encargan de modular y subvertir múltiples procesos celulares del hospedero, que en conjunto aseguran la colonización y, por lo tanto, persistir y propagarse de un huésped a otro (Pearson *et al.*, 2016). Estas proteínas son variables en número y

tipo en los patógenos A/E; la cepa EHEC O157:H7 Sakai cuenta con un total de 62, *C. rodentium* con 35 y EPEC O127:H6 E2348/69 con 27, los cuales pueden estar codificados dentro o fuera de la isla LEE (Iguchi *et al.*, 2009).

EPEC dispone de siete efectores codificados en el LEE: EspB, EspF, EspG, EspH, EspZ, Map y Tir. Adicionalmente, existen otros efectores comúnmente llamados Nle (Non-LEE-encoded), como NleA, NleB, NleE, NleF, NleG, NleH, y otros denominados Esp, como EspJ y EspL, que se encuentran agrupados en profagos o secuencias de inserción (elementos IS) (Figura 5) (Dean & Kenny, 2009). Así mismo, existe una segunda isla de patogenicidad que codifica para la proteína EspC, la cual posee un motivo conservado de serina proteasa; por esta razón es miembro de una subfamilia de autotransportadores llamada SPATE (Serine protease autotransporter of Enterobacteriaceae). La secreción de este efector está mediada por un sistema de secreción tipo V (SST5), y luego a través del SST3 es translocada de manera no canónica a la célula hospedera (Navarro-García *et al.*, 2004; Vidal & Navarro, 2008). En la tabla 1 se enlista el papel conocido que desempeña cada efector en la patogenicidad de EPEC.

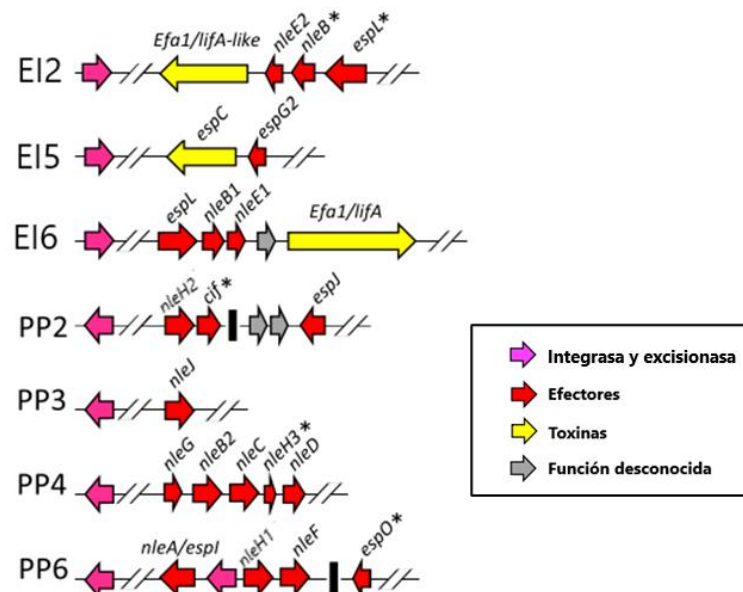


Figura 5. Efectores no codificados en la isla LEE de EPEC. La orientación de las flechas indica la dirección de los genes efectores codificados en profagos (PP) y elementos integradores (EI), los cuales con colores se denota su función. Los asteriscos señalan los pseudogenes. Modificado de Serapio-Palacios *et al.* (2020).

Tabla 1. Principales funciones de las proteínas efectoras de EPEC E2348/69.

| Proteína efectora | Presentes en E2348/69 O127:H6 | Función | Referencia |
|------------------------------|--------------------------------------|--|--|
| Codificados en LEE | | | |
| EspB | 1 | Regula el reordenamiento del citoesqueleto y media la fagocitosis por su unión a miosina. | Iizumi <i>et al.</i> , 2007 |
| EspF | 1 | Induce apoptosis por la desestabilización de las mitocondrias, altera las uniones estrechas y modula la red de filamentos intermedios. | Pinaud <i>et al.</i> , 2018 |
| EspG | 2 | Desestabiliza la red de microtúbulos e inhibe el tráfico membranal. | Matsuzawa <i>et al.</i> , 2004; Pinaud <i>et al.</i> , 2018 |
| EspH | 1 | Modula la formación de los pedestales e inhibe la fagocitosis. | Tu <i>et al.</i> , 2003 |
| EspZ | 1 | Inhibe la apoptosis y reduce la citotoxicidad celular. | Shames <i>et al.</i> , 2011 |
| Map | 1 | Induce apoptosis por la disrupción del potencial de membrana mitocondrial, altera las uniones estrechas y participa en la formación de filopodios. | Pearson <i>et al.</i> , 2016 Dean & Kenny, 2009 |
| Tir | 1 | Receptor de intimina, conduce la polimerización de la actina para la formación de los pedestales e inhibe la actividad de NF-κB | Gruenheid <i>et al.</i> , 2001 Ruchaud-Sparagano <i>et al.</i> , 2011 |
| No codificados en LEE | | | |
| EspC | 1 | Enterotoxina, efectúa actividades citotóxicas e induce la vía de apoptosis intrínseca. | Serapio-palacios <i>et al.</i> , 2016; Vidal <i>et al.</i> , 2007 |
| EspJ | 1 | Inhibe la fagocitosis | Young <i>et al.</i> , 2014 |
| EspL | 3 (2) | Induce la agregación de actina | Miyahara <i>et al.</i> , 2009 |
| NleA/EspI | 1 | Interfiere con el tráfico vesicular e inhibe la formación del inflammasoma NLRP3. | Kim <i>et al.</i> , 2007 Yen <i>et al.</i> , 2015 |
| NleB | 3 (1) | Bloquea la vía de apoptosis extrínseca e inhibe la activación de NF-κB. | Newton <i>et al.</i> , 2010 |
| NleC | 1 | Metaloproteasa que escinde la subunidad p65 del NF-κB y la acetiltransferasa p300. | Pearson <i>et al.</i> , 2011 |
| NleD | 1 | Metaloproteasa que escinde mediadores de señalización MAPK. | Baruch <i>et al.</i> , 2010 |
| NleE | 2 | Interfiere con la activación de NF-κB | Nadler <i>et al.</i> , 2010 |
| NleF | 1 | Previene la activación del inflammasoma e inhibe la apoptosis extrínseca e intrínseca | Blasche <i>et al.</i> , 2013 |
| NleG/NleI | 1 | Ubiquitin Ligasa E3 | Wu <i>et al.</i> , 2010 |
| NleH | 3 (1) | Interfiere con la activación de NF-κB y bloquea la señalización proapoptótica intrínseca | Gao <i>et al.</i> , 2009. Wan <i>et al.</i> , 2011. |

NF-κB: factor nuclear-kappaB. En paréntesis se indican cuántos corresponden a pseudogenes.

1.4 Regulación de los genes de virulencia de EPEC

La expresión de los factores de virulencia de EPEC está controlada por una compleja red de regulación en respuesta a señales derivadas del huésped, el ambiente y la microbiota, con la finalidad de lograr una máxima eficiencia energética y evitar alertar al sistema inmune para una colonización exitosa (Serapio-Palacios, *et al.* 2020).

Se han descrito más de 40 reguladores de la transcripción de los genes LEE, los cuales incluyen: una variedad de proteínas asociadas al nucleóide, reguladores específicos, sistemas de dos componentes, *quorum sensing* y RNAs reguladores (Furniss & Clements, 2018; Platenkamp & Mellies, 2018). A continuación se describen sólo aquellos que son los de mayor relevancia para este trabajo (Figura 6).

La isla de patogenicidad LEE se encuentra silenciada por el regulador global H-NS (Histone-like Nucleoid-Structuring). Ler, que comparte homología con H-NS, modula positivamente la expresión de genes codificados dentro y fuera del LEE, contrarrestando la represión ejercida por H-NS (Bustamante *et al.*, 2011). A su vez, la regulación de la isla LEE se encuentra influenciada por GrlA y GrlR, de manera positiva y negativa, respectivamente (Furniss *et al.* 2018; Platenkamp *et al.* 2018). Así mismo, Ler activa al operón *grlRA*, estableciendo un circuito de retroalimentación positivo que promueve la expresión de GrlA para optimizar un nivel adecuado de Ler y promover la activación de la isla LEE (Barba *et al.*, 2005). De manera interesante, conforme aumenta la concentración de Ler en la célula, éste reprime su propia expresión (Berdichevsky *et al.*, 2005).

GrlA es una proteína de 15 kDa que forma parte de una familia de reguladores poco estudiada, donde su homólogo más conocido es CaiF, regulador positivo de los operones *cai* y *fix*, que están implicados en el metabolismo anaeróbico de carnitina en *E. coli* y otras enterobacterias; otros homólogos son SghR de *S. enterica*, Yber de *Yersinia bercobieri* y Plu de *Photorhabdus luminicens*. Estas proteínas, comparten residuos de aminoácidos en la mitad del extremo N-terminal de GrlA en

donde se encuentra un motivo de unión al DNA tipo hélice-vuelta-hélice (HTH, Helix-turn-helix) (Jiménez *et al.*, 2010). GrIA actúa uniéndose al promotor de *LEE1*, eliminando el efecto represor de H-NS y activando la expresión de *ler* (Islam *et al.*, 2011; Jiménez *et al.*, 2010). Por el contrario, GrIR forma dímeros que antagonizan la función de GrIA mediante interacciones proteína-proteína, además de reprimir la expresión de los operones del LEE mediante un mecanismo independiente de la interacción con GrIA (Jiménez *et al.*, 2010; Padavannil *et al.*, 2013; Lara-ochoa *et al.*, 2023). De esta manera, a través de la formación de heterotrímeros GrIA-GrIR₂, GrIA también antagoniza la acción represora independiente de GrIR sobre la isla LEE. Por tal motivo, se sugiere que GrIA tiene un papel dual en la regulación positiva de los genes LEE como activador directo de *ler* y antirrepresor de GrIR (Lara-Ochoa *et al.*, 2023). Otras investigaciones han descrito que GrIA regula la expresión de genes situados fuera del LEE en EHEC, activando el operón *ehxCABD* que codifica para una enterohemolisina, o reprimiendo los genes flagelares *flhDC* (Iyoda *et al.*, 2006; Saitoh *et al.*, 2008).

Por otro lado, PerA regula la expresión del operón *bfp* y la de su propio promotor a través de la autoactivación (Martínez-Laguna *et al.*, 1999). Esto permite la activación de PerC, el cual también regula positivamente a *ler*, aunque bajo condiciones ambientales diferentes a las que permiten la regulación por GrIA (Bustamante *et al.*, 2011), ya que cuando EPEC es crecida a 37°C en DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) en cultivos agitados se favorece la activación mediada por GrIA, por el contrario, en cultivos estáticos bajo una atmósfera de 5% de CO₂ se favorece la expresión dependiente de PerC (Bustamante *et al.*, 2011). Adicionalmente, en un medio como LB (Luria-Bertani), en presencia de sales de amonio y a una temperatura por encima o debajo de 37°C; se reprime la expresión de PerA (Girón *et al.*, 1991; Ibarra *et al.*, 2013; Puente *et al.*, 1996).

En lo que respecta a las condiciones y los reguladores involucrados en la expresión de los factores de virulencia codificados fuera del LEE, poco se sabe. Se piensa que los mecanismos reguladores de la isla LEE también coordinan la expresión de los genes *nle*, para así asegurar la producción espaciotemporal de los efectores A/E en

el momento indicado en el que deben ser translocados a la célula hospedera. Tal es el caso de NleA, cuya expresión es reprimida por H-NS, y requiere de GrlA y Ler para su activación (García-Angulo *et al.*, 2012). La participación de estos reguladores muestra que el gen *nleA* está integrado en el circuito de regulación del LEE. Este mecanismo de comunicación transcripcional entre la isla de patogenicidad LEE y efectores codificados fuera de éste, es posiblemente resultado de un proceso de adaptación evolutiva que le ha permitido a EPEC coordinar eficientemente la expresión de los factores de virulencia.

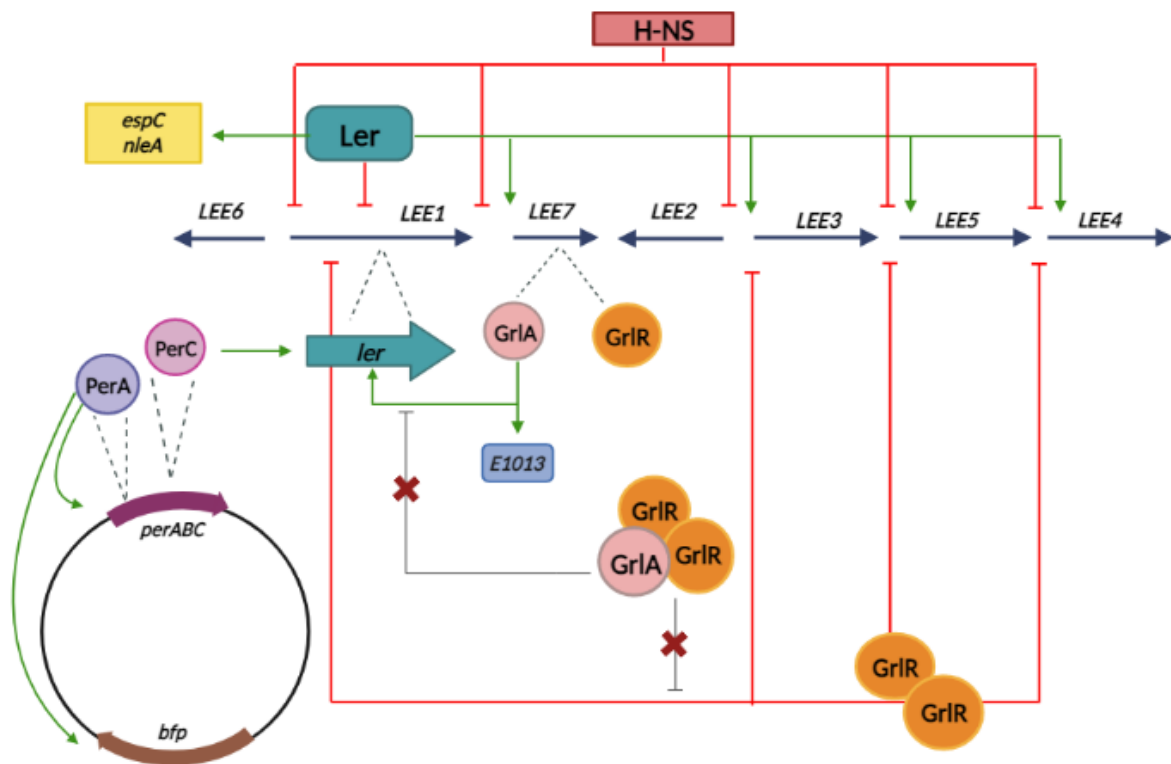


Figura 6. Regulación de los factores de virulencia de EPEC. Se ilustran las principales proteínas que intervienen en la regulación génica de la isla de patogenicidad LEE, el pEAF y algunos genes blanco fuera del LEE. Las flechas color verde indican activación transcripcional y las flechas color rojo regulación negativa.

2. Antecedentes

En vista de la diversidad de genes que codifican para efectores fuera del LEE y su importancia en la colonización, resulta interesante estudiar los mecanismos por los cuales la bacteria regula y coordina su expresión. Debido a que el efector NleH1 es secretado y translocado de manera dependiente del SST3, en los últimos años se ha investigado si su expresión está corregulada con la expresión de la isla LEE.

2.1 El papel de NleH en la patogenicidad de EPEC

La infección por EPEC da como resultado la inducción de la respuesta inmune innata del huésped. La actividad concertada de proteínas efectoras, principalmente tipo Nle, evita que las células generen dicha activación dirigiéndose a los componentes de la señalización proinflamatoria (Wong *et al.*, 2011; Zhuang *et al.*, 2017). Dentro de estas proteínas, destaca la participación de NleH, el cual se encuentra conservado en los patógenos A/E y comparte similitud de secuencia con el efector OspG de *Shigella flexneri*, el cual inhibe la activación del factor de transcripción proinflamatorio NF- κ B (García-Angulo *et al.*, 2008). EPEC contiene dos homólogos NleH denominados 1 y 2 que se encuentran codificados en los profagos tipo lambda PP6 y PP2, respectivamente (Figura 6) (García-Angulo *et al.*, 2008).

Se ha reportado que NleH1 actúa interfiriendo con la vía NF- κ B al unirse a la proteína ribosómica S3 (RPS3), bloqueando la fosforilación del residuo Ser-209 de RPS3 mediada por I κ B quinasa- β (IKK β), lo que inhibe su participación como guía en la unión de NF- κ B a promotores de genes diana (Gao *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2018). Además, se encontró que la proteína similar al oncogén CT10 del virus del sarcoma v-CrK (CRKL), una proteína que interactúa con IKK β , recluta a NleH1 a complejos IKK β -RPS3 para su inhibición a través de la actividad quinasa Ser/Thr de NleH1 (Pham *et al.*, 2013). Así también, Pollock *et al.* (2022) informaron que NleH1/2 fosforilan el residuo Ser-775 de Eps8, una proteína de agrupación de actina que

determina la estructura y el crecimiento de las microvellosidades, lo que alterara la composición del citoesqueleto durante la infección por EPEC.

De acuerdo con Pham *et al.*, (2012), NleH1 y NleH2 interactúan entre sí, lo que plantea la posibilidad de un mecanismo adicional que modula de forma más estricta el alcance y duración de la respuesta inmune innata del huésped a la infección bacteriana. Además, se propone que los efectores NleH son importantes inhibidores de la apoptosis intrínseca, dicha función se atribuye a su interacción con el supresor de muerte celular Bax inhibitor-1 (BI-1) (Hemrajani *et al.*, 2010).

2.2 Regulación de *nleH1*

Investigaciones realizadas por García-Angulo *et al.* (2012) analizando la región reguladora de un subgrupo de genes *nle*: *nleH1-nleF*, *nleB2-nleC*, *nleH2* y *nleG*, identificaron una secuencia altamente conservada que contiene una repetición invertida de 13 pb separadas por un espaciador TCCGG ubicada río arriba de la caja -35 del promotor, la cual se denominó como NRIR (Nle Regulatory Inverted Repeat) (Figura 7).

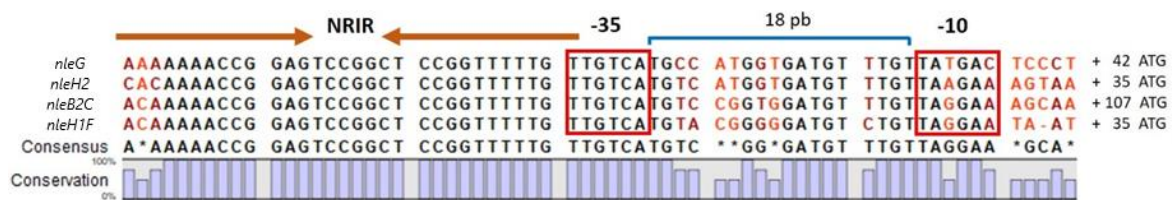


Figura 7. Alineamiento de las secuencias promotoras de los genes *nle* que contienen NRIR. En rojo se señalan las cajas -35 y -10. Las flechas naranjas señalan el NRIR y las barras azules el porcentaje de conservación. Las letras en rojo o naranja indican los nucleótidos variables en esa posición. Al final de cada secuencia se muestra el número de nucleótidos restantes hasta el codón de inicio ATG de cada gen. Alineamiento realizado con CLC Sequence Viewer 8.0. Tomado de González-Lara, F., Tesis de maestría en proceso.

En este trabajo, encontraron que la región NRIR es esencial para la activación transcripcional de *nleH1* y *nleB2*, puesto que al interrumpir o eliminar esta secuencia su expresión disminuye drásticamente o es nula (Figura 8). Además, observaron que *nleH1* y *nleB2* se expresan en DMEM en agitación a 37°C, las cuales son condiciones que inducen la expresión de LEE (García-Angulo *et al.*, 2012).

Complementando lo anterior, evidencias recientes generadas por nuestro grupo de investigación indican que la integridad y la localización del NRIR son importantes en la activación transcripcional de *nleH1* (González-Lara, F., Tesis de maestría en proceso). En conjunto, estos datos sugieren la existencia de un regulador, conservado en *E. coli* K12, que podría estar interactuando con la región NRIR para activar la expresión de los genes que la contienen. Sin embargo, se desconoce qué proteína y cómo es llevado a cabo el mecanismo de regulación.

Por otra parte, una particularidad que resalta de la región reguladora de este subgrupo de genes *nle*, es la identidad que conservan con el promotor de *ler* y el gen *E1013*, ubicado en el profago PP4 de EPEC, (genes que no contienen NRIR). Los cuales presentan en la caja -10 guaninas y citosinas que la alejan del consenso TATAAT, un motivo ATGT ubicado río arriba de la caja -10 y una región espaciadora entre la caja -35 y -10 de 18 pb (Figura 9).

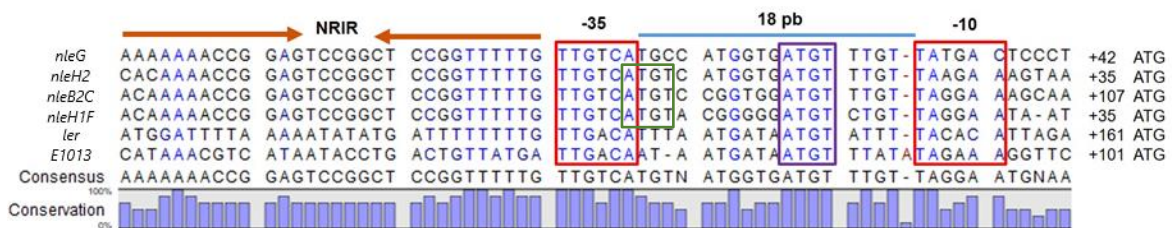


Figura 8. Alineamiento de los genes *ler* y *E1013* con los *nle* portadores del NRIR. En rojo se señalan las cajas -35 y -10 separadas por 18 pb en donde se localiza un motivo ATGT conservado, posible sitio de unión de GrlA. En verde se señala otro motivo ATGT conservado en *nleH2*, *nleB2C* y *nleH1F*, del cual se desconoce hasta el momento si tiene algún papel en la regulación. Las barras azules indican el porcentaje de conservación y arriba de éstas el nucleótido consenso. Al final de cada secuencia se muestra el número de nucleótidos restantes hasta el codón de inicio ATG de cada gen. Alineamiento realizado con CLC Sequence Viewer 8.0. Tomado de González-Lara, F., Tesis de maestría en proceso.

Estudios previos demostraron la importancia del motivo ATGT en la regulación de *ler* mediada por GrlA, dado que cambios en esta secuencia afectan la expresión de este gen (Islam *et al.*, 2011). De igual manera, se encontró que este motivo es esencial para la activación mediada por GrlA del gen *E1013*, del cual aún no se conoce su función (Cadena, E. 2016, Tesis de maestría, Morales, A., 2019, Tesis de maestría). Bajo esta premisa, investigaciones realizadas por nuestro grupo, demostraron que la expresión de *nleH1* es promovida por GrlA y que éste, se une directamente a su promotor en forma dependiente del motivo ATGT, denominado como GBS (GrlA Binding Site) (González-Lara, F., Tesis de maestría en proceso). Sin embargo, también observaron que el motivo ATGT participa en la transcripción de *nleH1* independientemente de la regulación por GrlA, ya que el cambio en la secuencia de la segunda T por una A provoca una marcada caída en los niveles basales de expresión (Figura 10) (González-Lara, F., Tesis de maestría en proceso). Además, cabe destacar que la expresión del promotor de *nleH1*, con el motivo ATGT silvestre, aumenta significativamente en mutantes que acercan la caja -10 a la secuencia consenso con o sin GrlA (González-Lara, F., Tesis de maestría en proceso). De manera interesante, hay un segundo motivo ATGT localizado adyacente a la caja -35, del cual no se ha evaluado si está involucrado en la regulación de *nleH1* mediada por GrlA. A este motivo lo denominamos ATGT-2, para distinguirlo del motivo ATGT previamente estudiado, al cual denominamos como ATGT-1.

En resumen, los resultados de este estudio proponen que el motivo ATGT-1, localizado en la región espaciadora y GrlA, juegan un papel cooperativo para permitir el reconocimiento e interacción productiva de la RNA polimerasa con el promotor de *nleH1*, así como para potenciar su capacidad para transitar a la formación del complejo abierto de transcripción en el contexto de una caja -10 que desfavorece dicho proceso (González-Lara, F., Tesis de maestría en proceso).

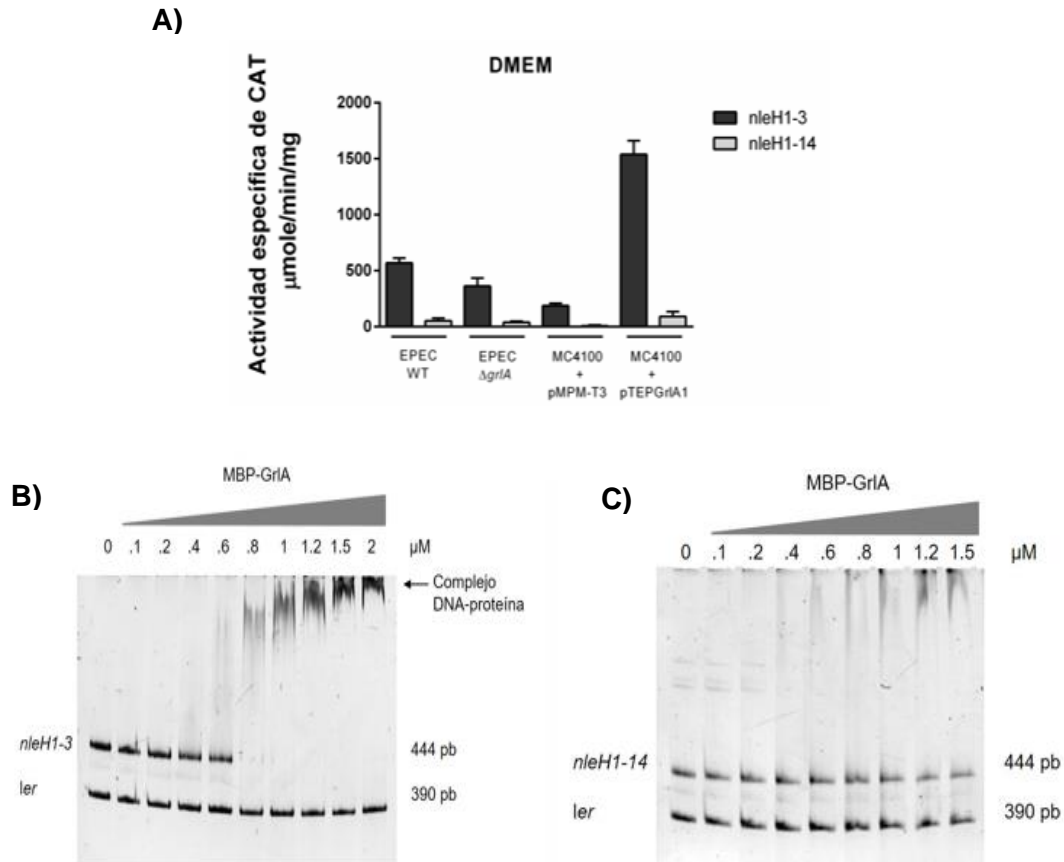


Figura 9. GrlA y la región ATGT-1 son esenciales para la activación de *nleH1*. **A)** Ensayo de actividad específica de CAT de las fusiones *nleH1-3* (secuencia silvestre del promotor) y *nleH1-14* (modificación del ATGT por ATGA entre las cajas -35 y -10 del promotor) en 4 fondos genéticos a partir de cultivos crecidos en DMEM. La actividad de la fusión *nleH1-14* se ve afectada drásticamente en todas las cepas. **B)** Ensayo EMSA de la región promotora de *nleH1* y concentraciones crecientes de MBP-GrlA purificada. Se forma el complejo DNA-proteína a partir de 0.4 μM de MBP-GrlA, con un retardo completo a partir de 0.8 μM . **C)** Ensayo EMSA de la región promotora de la fusión *nleH1-14* y concentraciones crecientes de MBP-GrlA purificada. Se observa muy poco retardo incluso con una concentración de 1.5 μM de proteína, sugiriendo que la segunda T del motivo ATGT es esencial para la interacción de GrlA con el promotor de *nleH1*. Como control negativo en ambos EMSA se emplea un fragmento que abarca al gen estructural de *ler* Tomado de González-Lara, F., Tesis de maestría en proceso.

Otros reguladores de la isla LEE involucrados en la regulación de *nleH1* es GrlR, el cual actúa como un regulador negativo, lo que es consistente con su papel de represor en la regulación de la isla LEE (García-Angulo *et al.*, 2012, González-Lara, F., Tesis de maestría en proceso). Por otra parte, PerC no activa directamente la expresión de *nleH1*, como ocurre con el promotor de *ler* (Bustamante *et al.*, 2011,

González-Lara, F., Tesis de maestría en proceso). Así también, H-NS no reprime directamente a *nleH1* (González-Lara, F., Tesis de maestría en proceso).

En la mayoría de los promotores bacterianos regulados por el factor σ^{70} , las secuencias clave requeridas para el reconocimiento de la RNA polimerasa son los hexámeros -10 y -35, los cuales están separados por un espaciador, con una extensión preferentemente de 17 pb (Davis *et al.*, 2017). Los promotores de los genes *nle* con las características mencionadas presentan una región espaciadora subóptima de 18 pb. Aunque no poseen similitud con GrlA, se conoce que los reguladores transcripcionales de la familia MerR activan la transcripción uniéndose a sitios entre los hexámeros -10 y -35 con una separación mayor de 17 pb (Brown *et al.*, 2003). Islam *et al.* (2011) proponen que GrlA, mediante un mecanismo de activación similar al de los reguladores MerR, actúa uniéndose a la región espaciadora de 18 pb entre las cajas -10 y -35 del promotor de *ler* de EHEC, “doblando” el DNA para optimizar la unión de la RNA polimerasa y permitiendo el inicio de la transcripción a partir de un promotor que de otro modo sería subóptimo. En apoyo a esta propuesta, observaron que cuando el espaciador cambia a una extensión de 17 pb, la actividad del promotor de *ler* aumenta en forma independiente de GrlA.

Con base en estas evidencias, se propone que GrlA participa en la activación de los genes que contienen el NRIR, incluyendo a *nleH1*; sin embargo, su mecanismo de acción aún no ha sido confirmado.

3. Planteamiento del problema

Todos los efectores desempeñan, en menor o mayor medida, un papel fundamental en la patogenicidad de EPEC, y en conjunto aseguran la colonización. Debido a esta importancia, los mecanismos por los cuales la bacteria regula y coordina su expresión son objeto de estudio. La expresión de los genes de virulencia está sujeta a una compleja red de regulación que responde a múltiples señales del entorno en el que se encuentra la bacteria. Esta red involucra reguladores específicos como GrIA, el cual se encarga de regular positivamente los genes de la isla LEE a través de la activación de *ler*.

Estudios previos demostraron que GrIA también puede regular genes codificados fuera la isla LEE como *nleA* y *nleH1*, este último forma parte de un subgrupo de genes *nle* que contienen una región reguladora altamente conservada. Por las características de este subgrupo, el gen *nleH1* ha sido modelo de estudio para entender en más detalle el mecanismo de acción de GrIA, en particular a genes que codifican para otros factores de virulencia no codificados por el LEE.

Se propone que GrIA y el motivo ATGT-1 ubicado en la región espaciadora, son elementos clave que regulan positivamente la expresión de *nleH1* al favorecer la formación del complejo abierto de la transcripción, a partir de un promotor que posee características subóptimas respecto a un promotor consenso. Por tal razón, este trabajo se centró en aportar nuevas evidencias sobre el papel que juegan características específicas de la región reguladora de *nleH1*, en la activación mediada por GrIA, para así profundizar en el entendimiento de su mecanismo de acción.

4. Hipótesis

La activación del gen *nleH1* se favorece en presencia del regulador GrlA, independientemente del número de bases que comprenden la región espaciadora entre las cajas -10 y -35 y del motivo ATGT-2 adyacente a la caja -35, pero es sensible a los cambios de posición del motivo ATGT-1.

5. Objetivos

5.1 General

- Determinar el mecanismo de activación de *nleH1* mediado por el regulador GrlA.

5.2 Específicos

- Determinar el papel del motivo ATGT-2 adyacente a la caja -35 en la activación de *nleH1*.
- Analizar la importancia de la extensión de la región espaciadora del gen *nleH1* en la activación dependiente de GrlA.
- Evaluar la expresión de la proteína NleH1 bajo el control de reguladores específicos en condiciones de inducción y represión de los genes de virulencia de EPEC.

6. Metodología

6.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas se cultivaron de forma rutinaria en medio LB pH 7.4 (peptona de caseína, extracto de levadura y NaCl) en agitación a 37°C. Para analizar la expresión de los genes de virulencia bajo condiciones de inducción, las cepas fueron crecidas en DMEM pH 7.4 (Gibco-BRL Life Technologies, Grand Island, N.Y), conteniendo glucosa (0.45%) y L-glutamina (584 mg), y suplementado con piridoxal (4 µg/mL), bicarbonato de sodio (200 mg/ 800 µl) y 1% de LB a 37°C en agitación. Mientras que, para las condiciones de represión, las cepas se cultivaron en LB a 37°C en agitación. Estos medios se suplementaron con ampicilina (200 µg/ml), estreptomycin (100 µg/ml), cloranfenicol (34 µg/ml), kanamicina (25 µg/ml) o tetraciclina (12 µg/ml), según fuera el caso. Las cepas y plásmidos utilizados en el presente trabajo se encuentran enlistados en la Tabla 2.

Tabla 2. Cepas y plásmidos.

| Cepa | Descripción | Referencia |
|---------------------------|--|---------------------------------|
| <i>E. coli</i> DH5α | Cepa de laboratorio derivada de <i>E. coli</i> K-12. NaIR F- 80d <i>lacZ</i> M15 (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1hsdR17</i> (rk-, mk+) <i>phoA supE44 -thi-1 gyrA96 relA1</i> | Stratagene |
| <i>E. coli</i> MC4100 | Cepa de laboratorio derivada de <i>E. coli</i> K-12. F- <i>araD139 Δ(ara-leu)</i> 7696 <i>gal E15 galK16 Δ(lac)</i> X74 <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>hsd R2</i> (r-k m+k) <i>mcrAmcrB1</i> | Casadaban, 1976 |
| EPEC WT | EPEC E2348/69 O127:H26 Sm ^R | Levine <i>et al.</i> , 1978 |
| EPEC Δ <i>ler</i> | Derivada de E2348/69 Sm ^R en la que se generó una eliminación en fase del gen <i>ler</i> | Bustamante <i>et al.</i> , 2011 |
| EPEC Δ <i>grlR</i> | Derivada de E2348/69 Sm ^R en la que se generó una eliminación en fase del gen <i>grlR</i> | Lara-Ochoa <i>et al.</i> , 2023 |

| | | |
|---------------------------|---|------------------------------------|
| EPEC $\Delta grIA$ | Derivada de E2348/69 Sm ^R en la que se generó una eliminación en fase del gen <i>grIA</i> | Lara-Ochoa <i>et al.</i> , 2023 |
| EPEC $\Delta grIRA$ | Derivada de E2348/69 Sm ^R en la que se generó una eliminación en fase del gen <i>grIRA</i> | Lara-Ochoa <i>et al.</i> , 2023 |
| EPEC $\Delta perC$ | Derivada de E2348/69 Sm ^R en la que se generó una eliminación en fase del gen <i>perC</i> | Bustamante <i>et al.</i> , 2011 |
| NleH1-FLAG | Derivada de E2348/69 en la que se introdujo en fase la secuencia que codifica para el epítipo FLAG triple en el extremo 3' del gen <i>nleH1</i> (<i>nleH1::3XFLAG</i>), Sm ^R , Km ^R | Este trabajo |
| NleH1-FLAG Δler | Derivada de NleH1-FLAG, Δler , Sm ^R Km ^R | Este trabajo |
| NleH1-FLAG $\Delta grIR$ | Derivada de NleH1-FLAG, $\Delta grIR$, Sm ^R Km ^R | Este trabajo |
| NleH1-FLAG $\Delta grIA$ | Derivada de NleH1-FLAG, $\Delta grIA$, Sm ^R Km ^R | Este trabajo |
| NleH1-FLAG $\Delta grIRA$ | Derivada de NleH1-FLAG, $\Delta grIRA$, Sm ^R Km ^R | Este trabajo |
| NleH1-FLAG $\Delta perC$ | Derivada de NleH1-FLAG, $\Delta perC$, Sm ^R Km ^R | Este trabajo |
| NleA-FLAG | Derivada de E2348/69 <i>nleA::3XFLAG</i> , Sm ^R , Km ^R | García-Angulo <i>et al.</i> , 2012 |
| Plásmidos | Descripción | Referencia |
| pKK232-8 | Derivado de pBR322 que contiene al gen <i>cat</i> carente de promotor, Ap ^R | Brosius, 1984 |
| pKKnleH1-3 | Derivado de pKK232-8 con la fusión transcripcional a <i>cat</i> de la región reguladora de <i>nleH1</i> de los nucleótidos -97 a +49*. | García-Angulo <i>et al.</i> , 2012 |

| | | |
|-------------|---|--|
| pKKnleH1-14 | Derivado de pKK232-8 con la fusión transcripcional a <i>cat</i> de la región reguladora de <i>nleH1-cat</i> de los nucleótidos -97 a +49*, modificando la segunda T del GBS por una A. | González-Lara, F., Tesis maestría en proceso |
| pKKnleH1-17 | Derivado de pKK232-8 con la fusión transcripcional a <i>cat</i> de la región reguladora de <i>nleH1-cat</i> de los nucleótidos -97 a +49*, eliminando un nucleótido entre el GBS y la caja -35. | Este trabajo |
| pKKnleH1-18 | Derivado de pKK232-8 con la fusión transcripcional a <i>cat</i> de la región reguladora de <i>nleH1-cat</i> de los nucleótidos -97 a +49*, eliminando un nucleótido entre el GBS y la caja -10. | Este trabajo |
| pKKnleH1-19 | Derivado de pKK232-8 con la fusión transcripcional a <i>cat</i> de la región reguladora de <i>nleH1-cat</i> de los nucleótidos -97 a +49*, modificando la segunda T del motivo ATGT adyacente a la caja -35 por una A. | Este trabajo |
| pKKnleH1-20 | Derivado de pKK232-8 con la fusión transcripcional a <i>cat</i> de la región reguladora de <i>nleH1-cat</i> de los nucleótidos -97 a +49*, eliminando los nucleótidos de las posiciones -27 y -26 con un cambio por una A en la posición -23. | Este trabajo |
| pKKnleH1-21 | Derivado de pKK232-8 con la fusión transcripcional a <i>cat</i> de la región reguladora de <i>nleH1-cat</i> de los nucleótidos -97 a +49*, eliminando los nucleótidos de las posiciones -26 y -25. | Este trabajo |
| pMPM-T3 | Vector de clonación de mediano número de copias derivado del pACYC117 (p15 ori) con un casete de resistencia a Tetraciclina y el sitio múltiple de clonación del pBSKS. | Mayer, 1995 |

| | | |
|------------|--|---------------------------------|
| pTEP-GrlA1 | Derivado de pMPM-T3 que contiene al gen <i>grlA</i> bajo el promotor <i>lac</i> . | Bustamante <i>et al.</i> , 2011 |
| pSUB11 | Vector que porta la secuencia para la etiqueta del epítotope 3XFLAG. | Uzzau <i>et al.</i> , 2001 |
| pKD46 | Vector que porta los genes del sistema λ -Red bajo el control del promotor <i>araBAD</i> inducible por arabinosa, T ^s Ap ^R | Datsenko & Wanner, 2000 |
| pKD78 | Vector que porta genes del sistema λ -Red bajo el control del promotor <i>araBAD</i> inducible por arabinosa, T ^s Cm ^R | Datsenko & Wanner, 2000 |

*Las coordenadas de la región reguladora fusionada a *cat* son con respecto al inicio de la transcripción.

6.2 Construcción de fusiones al gen reporte *cat*

Mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificaron los fragmentos de interés con los oligonucleótidos *forward* específicos y el oligo *reverse* Seq1-Rev (Tabla III), utilizando como DNA molde la fusión silvestre pKKnleH1-3 y enzima Taq Polimerasa purificada de manera casera.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

| | | |
|----------------------------|---------------|-------------|
| Desnaturalización inicial: | 95°C – 5 min | } 30 ciclos |
| Desnaturalización: | 94°C – 30 seg | |
| Alineamiento: | 56°C – 30 seg | |
| Extensión: | 72°C – 30 seg | |
| Extensión final: | 72°C – 7 min | |

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados.

| Nombre | Secuencia 5' a 3' | Uso y características |
|--------------------|---|--|
| nleH1-17 cat Fw | GGAGGATCCCACAAAAACC GGAGTCCGGCTCCGGTTTTT GTTGTCATGTAGGGGGATGTC | Construcción de la fusión pKKnleH1-17. Introduce un sitio BamHI en el extremo 5' y elimina el nucleótido de la posición -26, localizado entre la caja -35 y el GBS de la región promotora del gen <i>nleH1</i> . |
| nleH1-18 cat Fw | GGAGGATCCCACAAAAACC GGAGTCCGGCTCCGGTTTTT GTTGTCATGTACGGGGGATGTC GTTAGGAA | Construcción de la fusión pKKnleH1-18. Introduce un sitio BamHI en el extremo 5' y elimina el nucleótido de la posición -15, localizado entre el GBS y la caja -10 de la región promotora del gen <i>nleH1</i> . |
| nleH1-19 cat Fw | GGAGGATCCCACAAAAACC GGAGTCCGGCTCCGGTTTTT GTTGTCATGAAGGGGGATGTC | Construcción de la fusión pKKnleH1-19. Introduce un sitio BamHI en el extremo 5', modificando el nucleótido de la posición -28 por una A, localizado adyacente a la caja -35 del promotor del gen <i>nleH1</i> . |
| Seq2-Fw | GAGGCCCTTTCGTCTTCAAG | Comprobación de fusiones a <i>cat</i> uniéndose 200 pb río arriba del sitio de corte BamHI |
| Seq1-Rev | CAACGGTGGTATATCCAGTG | Empleado para la construcción de las fusiones a <i>cat</i> , uniéndose 100 pb río abajo del sitio de corte HindIII en el plásmido pKK232-8. |
| nleH1-FLAG H1P1 | GGAGGAAAGCTGGATCTTATT AGTGTAGTATTAAGTAAGATA GACTACAAAGACCATGACGG | Empleado para etiquetar con el epítotope 3XFLAG, porta una extensión homóloga la última porción de <i>nleH1</i> . |
| nleH1-FLAG H2P2 | ATCCATAAATATTATTACAATAA TATATCTGGATAAAAATACAT ATGAATATCCTCCTTAG | Empleado para etiquetar con el epítotope 3XFLAG, porta una extensión homóloga a una región río abajo de <i>nleH1</i> . |
| nleH1 FLAG Fw | ATCAGTATTATGGTTCCGGGA | Empleado para comprobar la etiqueta 3XFLAG. |

| | | |
|---------------|-----------------------|---|
| nleH1 FLAG Rv | AGAGACCATAACATCAAGTTT | Empleado para comprobar la etiqueta 3XFLAG. |
| K2 Fw | CAGTCATAGCCGAATAGCCT | Empleado para comprobar la etiqueta 3X FLAG, uniéndose a la secuencia del casete de kanamicina. |
| K1 Rv | CGGTGCCCTGAATGAACTGC | Empleado para comprobar la etiqueta 3X FLAG, uniéndose a la secuencia del casete de kanamicina. |

Los productos de PCR obtenidos se purificaron utilizando el kit comercial Gel/PCR Extraction Biomiga siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, los fragmentos de PCR purificados y el plásmido pKK232-8 se digirieron con las enzimas de restricción FastDigest BamHI (Thermo Scientific) y HindIII (Thermo Scientific), con el buffer 10X FastDigest (Thermo Scientific) en un volumen final de 30 µl a 37°C por 10 min. Los productos de PCR digeridos se purificaron con el estuche comercial Gel/PCR Extraction Biomiga, mientras que el vector digerido se purificó con el estuche comercial Gel DNA Recover Zymoclean. Las reacciones de ligación se prepararon utilizando la enzima ligasa y su buffer correspondiente (Invitrogen) utilizando el vector y fragmento de interés en una proporción 1:3. Estas reacciones se incubaron a 16°C toda la noche. Los productos de las ligaciones se precipitaron con glucógeno y etanol y se transformaron en la cepa DH5α por electroporación. Las colonias candidatas se seleccionaron en placas de LB agar con ampicilina. Para validar que contuvieran el fragmento esperado se realizó PCR empleando los oligonucleótidos Seq2-Fw y Seq1-Rv. Las colonias positivas se crecieron en LB líquido más ampicilina para extraer plásmido utilizando el kit comercial Plasmid Miniprep Biomiga, y para verificar los cambios introducidos y la integridad del resto de la secuencia se enviaron a secuenciar en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología-UNAM.

6.3 Ensayos de actividad transcripcional

De acuerdo con el protocolo descrito por Puente *et al.*, (1996), se partió de preinóculos de las cepas de interés crecidas en 5 ml de LB con los antibióticos

correspondientes, en agitación a 37°C toda la noche. Al día siguiente, se inocularon 100 µl de los preinóculos en 5 ml de LB o DMEM (más 1% de LB) con ampicilina, y se incubaron a 37° en agitación durante 8 h. Transcurrido este tiempo se colectó 1 ml de cada cultivo y se centrifugó a 13,500 rpm por 3 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y las pastillas obtenidas se lavaron con 800 µl de buffer TDTT (Tris-HCl 1M pH 7.8, ditiotreitól 1M), se centrifugaron nuevamente a 13, 500 rpm durante 3 min y se descartó completamente el sobrenadante. Posteriormente, las muestras se resuspendieron en 500 µl de buffer TDTT y se sonicaron a 35% de amplitud, pulsos de 10 segundos con descansos de 5 segundos por 3 minutos en el equipo "Soniprep 150" (Vibra Cell). Finalmente, las muestras sonicadas se centrifugaron a 13,500 rpm por 15 minutos y se recuperó el sobrenadante.

Para medir la concentración de proteínas se empleó el estuche comercial BCA (Pierce). Alícuotas de 10 µl de cada extracto se colocaron por duplicado en una placa de 96 pozos y se adicionó 200 µl de la mezcla de reacción: 25 ml de la solución A + 0.5 ml de la solución B. Luego, se dejaron incubando a 37° C por 30 min. La lectura de la absorbancia se realizó a 562 nm utilizando un lector automático para microplacas "CERES 900C" (Bio-Tek) utilizando el programa Gen5 Microplate Reader and Imager Software. Por otro lado, para cuantificar la actividad de CAT, se colocó 5 µl de cada extracto por duplicado en una placa de 96 pozos, a la cual se adicionaron 200 µl de la mezcla de reacción: DNTB 1mM (ácido 5-5'-ditiobis-2-nitrobenzoico), 0.1 mM cloranfenicol (Sigma) y 0.1 mM de acetil-coenzima A (Pharmacia Biotech) disueltos en Tris-HCl 1 mM pH 7.8. Los cambios en la absorbancia se registraron a 412 nm cada 5 segundos durante 5 minutos con un lector de microplacas computarizado "CERES 900C" (Bio-Tek) utilizando el programa Gen5 Microplate Reader and Imager Software.

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

6.4 Construcción de cepas etiquetadas *nleH1::3xFLAG-kan*

Con el propósito de seguir la expresión de la proteína efectora NleH1 en diferentes fondos genéticos, se empleó la técnica de etiquetado de genes con el epítipo 3XFLAG (Uzzau *et al.*, 2001).

Mediante PCR se generó el fragmento de interés con los oligonucleótidos *nleH1-FLAG H1P1* y *nleH1-FLAG H2P2* (Tabla 3), empleando como DNA molde el plásmido pSUB11y enzima Taq Polimerasa purificada de manera casera.

Las condiciones de reacción fueron las siguientes:

| | | |
|----------------------------|--------------|-------------|
| Desnaturalización inicial: | 95°C – 5 min | } 35 ciclos |
| Desnaturalización: | 95°C – 1 min | |
| Alineamiento: | 56°C – 1 min | |
| Extensión: | 72°C – 2 min | |
| Extensión final: | 72°C – 7 min | |

Se prepararon 10 reacciones de 100 µl cada una; posteriormente, los productos de PCR se mezclaron para concentrarlos mediante una extracción con fenol-cloroformo: alcohol isoamílico, seguido de una precipitación con etanol absoluto y lavado con etanol al 70% para, finalmente, resuspender el DNA en agua estéril.

Este producto de PCR se transformó por electroporación en células competentes de las cepas EPEC WT, EPEC Δler , EPEC $\Delta grlR$, EPEC $\Delta grlA$, EPEC $\Delta grlRA$ y EPEC $\Delta perC$ conteniendo el plásmido pKD46 (Ap^R) o pKD78 (Cm^R). Las células transformadas se dejaron en medio SOC toda la noche a 30°C y al día siguiente se sembraron en LB agar más estreptomycin y kanamicina para seleccionar candidatas y se dejaron incubando a 42° C toda la noche. Acto seguido, con el propósito de que las cepas pierdan el plásmido que codifica para la recombinasa, se realizaron tres pases de las colonias candidatas crecidas en LB agar kanamicina, en el último pase se incluyó una réplica en LB agar con cloranfenicol o ampicilina (según el plásmido utilizado) para asegurarse de que, en efecto, las cepas ya carecían del vector.

A partir de las colonias crecidas en el tercer pase en LB agar kanamicina, se seleccionaron candidatas para validar mediante PCR, a partir de extractos de las colonias preparados por calor, la presencia de la etiqueta *nleH1::3XFLAG-kan*, empleando la siguiente combinación de oligonucleótidos: *nleH1-FLAG Fw/ nleH1-FLAG Rv*, *nleH1-FLAG Fw/ K2 y K1/ nleH1-FLAG Rv*, como control se incluyó la cepa de EPEC silvestre.

Para las cepas que se comprobó estaban etiquetadas, se generó el fragmento de PCR correspondiente con los oligos *nleH1-FLAG Fw/ nleH1-FLAG Rv* a partir de una reacción de 100 µl, el cual se purificó mediante el estuche comercial Gel/PCR Extraction Biomiga y para confirmar el etiquetado se mandó a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología-UNAM.

6.5 Ensayo *western blot*

Las cepas de estudio se cultivaron en 5 ml de LB con estreptomicina y kanamicina en agitación a 37°C toda la noche. Al día siguiente, se inocularon 100 µl del preinóculo en 5 ml de LB o DMEM (más 1% de LB) (por duplicado), y se incubaron a 37° en agitación. Después de 4 h, se centrifugó 10 ml de cada cultivo a 13,500 rpm por 3 min y se descartó el sobrenadante. Las pastillas obtenidas se lavaron con 1 ml de buffer PBS 1X (Phosphate-buffered saline), se centrifugaron nuevamente a 13,500 rpm durante 3 min y se descartó completamente el sobrenadante.

Las pastillas obtenidas se resuspendieron en 300 µl de buffer PBS 1X y se sonicaron a 35% de amplitud, pulsos de 10 segundos con descansos de 5 segundos por 3 minutos en el equipo "Soniprep 150" (Vibra Cell). Luego, a las muestras sonicadas se les añadió 100 µl de buffer de lisis (Glicerol 50% v/v, SDS 20%, Tris-HCl 1M pH 6.8, β-mercaptoetanol 10%, azul de bromofenol 0.04% w/v) y se calentaron por 10 min a 94° C.

Las muestras se resolvieron mediante electroforesis SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis), en la cual en geles de acrilamida 30% bis acrilamida 0.8% se cargó 20 µl de cada muestra y se corrió a 300 V durante 5 h o 10 h en cámaras verticales utilizando Tris-Glicina 1X como buffer para la

electroforesis. Al finalizar, se realizó la transferencia del gel humedeciéndolo junto con una membrana de nitrocelulosa en buffer de transferencia (Tris 48 mM, Glicina 39 mM, SDS 0.04%, metanol 20%). La transferencia se realizó en una cámara de BioRad durante 43 min a 17 V. Transcurrido este tiempo, se verificó la transferencia de las proteínas del gel a la membrana, utilizando Rojo de Ponceau (Sigma).

Posteriormente, las membranas se dejaron incubando con una solución de bloqueo (leche Carnation en polvo, Nestlé) al 5% disuelta en PBS-T (PBS-10X, NaCl 5 M, Tween 20%) durante 1 h en agitación. Posteriormente, se desechó la leche y se realizaron 3 lavados con PBS-T en agitación, dejando pasar 10 min entre cada lavado.

A continuación, las membranas se expusieron a un anticuerpo primario; para el reconocimiento del epítipo FLAG se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-FLAG (Sigma), del cual se preparó una dilución de 1:5,000 en TBS-T (Tris 48 Mm, NaCl 150 mM, Tween 20%, se ajustó a pH 7.5) y 3% de la solución de bloqueo, como control de carga se empleó la proteína GroEL, para el cual se preparó una dilución del anticuerpo policlonal anti-GroEL de 1:5,000 en PBS-T. Las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios de 1 a 2 hrs en agitación a temperatura ambiente. Al concluir, se realizaron 3 lavados con PBS-T en agitación, dejando pasar 10 min entre cada lavado.

Luego, se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo secundario durante 1h en agitación a temperatura ambiente, para FLAG se utilizó el anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa en una dilución 1:5,000 en PBS-T y para GroEL anti-conejo conjugado con peroxidasa en una dilución 1:50,000 en PBS-T. Al finalizar, se realizaron 3 lavados con PBS-T en agitación, dejando pasar 10 min entre cada lavado.

Posteriormente, las membranas fueron expuestas por 3 min a una mezcla de luminol/oxidante 1:1, y en seguida se colocaron separadas en acetatos que se encontraban fijados en un casete. En oscuridad, se dispuso una película (Kodak X-omat) sobre los acetatos durante diferentes lapsos de tiempo según la intensidad de la señal. Finalmente, la película se reveló y se observaron los resultados.

7. Resultados

7.1 El motivo ATGT-2, adyacente a la caja -35, no participa en la activación de *nleH1*.

Anteriormente, se demostró que el motivo ATGT-1 presente en la región reguladora de los genes *ler*, *E1013* y *nleH1* es importante para la activación mediada por GrlA. Sin embargo, a diferencia del promotor de *ler* y *E1013*, en el subgrupo de genes *nle* analizados se encuentra un segundo motivo ATGT-2 próximo la caja -35 (Figura 9).

A partir de esta observación, surge la interrogante si el motivo ATGT-2 tiene algún papel en la regulación de *nleH1*. Para abordar esta pregunta, se construyó una fusión transcripcional de la región reguladora de *nleH1* al gen reportero *cat*, en la cual se sustituyó la última base del motivo ATGT-2 por una adenina (ATGA); esta fusión se denominó pKKnleH1-19 (Figura 11). Dicha modificación se generó con base en la observación de que este cambio en el ATGT-1 provocó una marcada disminución en la expresión dependiente de *ler* y *nleH1* (Islam *et al.*, 2011, González-Lara, F., Tesis de maestría en proceso).

La actividad de la fusión pKKnleH1-19 fue evaluada en las cepas EPEC WT, Δ *grlA*, Δ *grlR* y Δ *grlRA* crecidas en DMEM y LB a 37°C en agitación. Se incluyeron como control la fusión pKKnleH1-3, la cual contiene la región mínima reguladora de *nleH1*, y la fusión pKKnleH1-14 que tiene el cambio T por A en la cuarta base de la secuencia ATGT-1 (González-Lara, F., Tesis de maestría en proceso).

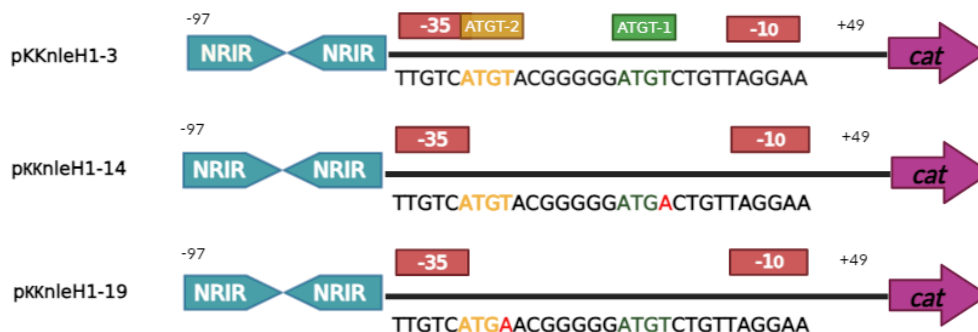


Figura 10. Representación esquemática de las fusiones transcripcionales pKKnleH1-3, pKKnleH1-14 y pKKnleH1-19. Ver texto y Tabla 2.

Observamos que la expresión de *nleH1* no responde de igual manera que los genes codificados en el LEE en las condiciones de inducción y represión, ya que EPEC WT conteniendo la fusión pKKnleH1-3 muestra niveles similares de expresión en ambos medios (Figura 12). Esto sugiere que el DMEM no es el medio óptimo para inducir la expresión de *nleH1* o que su expresión no es reprimida en LB como sucede para los genes del LEE. Por su parte, la expresión de la fusión pKKnleH1-3 en la cepa EPEC Δ *grlA* sólo disminuye un poco en DMEM, mientras que en LB la expresión es similar a la cepa silvestre. Por otro lado, la expresión de la fusión pKKnleH1-3 en EPEC Δ *grlR* aumenta en LB, probablemente porque en ausencia de GrIR hay más GrIA libre para activar a sus genes diana, lo que concuerda con lo observado por González-Lara (Tesis de maestría en proceso), pero se mantiene en los mismos niveles de expresión que EPEC WT en DMEM.

Las cepas conteniendo la fusión pKKnleH1-19 se comportaron de forma similar a las que contienen la fusión pKKnleH1-3 en DMEM, sugiriendo que el ATGT-2 no es importante para la regulación de la expresión de *nleH1*. Por su parte, la actividad de la fusión pKKnleH1-14 disminuyó drásticamente en las cuatro cepas de estudio (Figura 12), confirmando la relevancia del ATGT-1 en la regulación de *nleH1*.

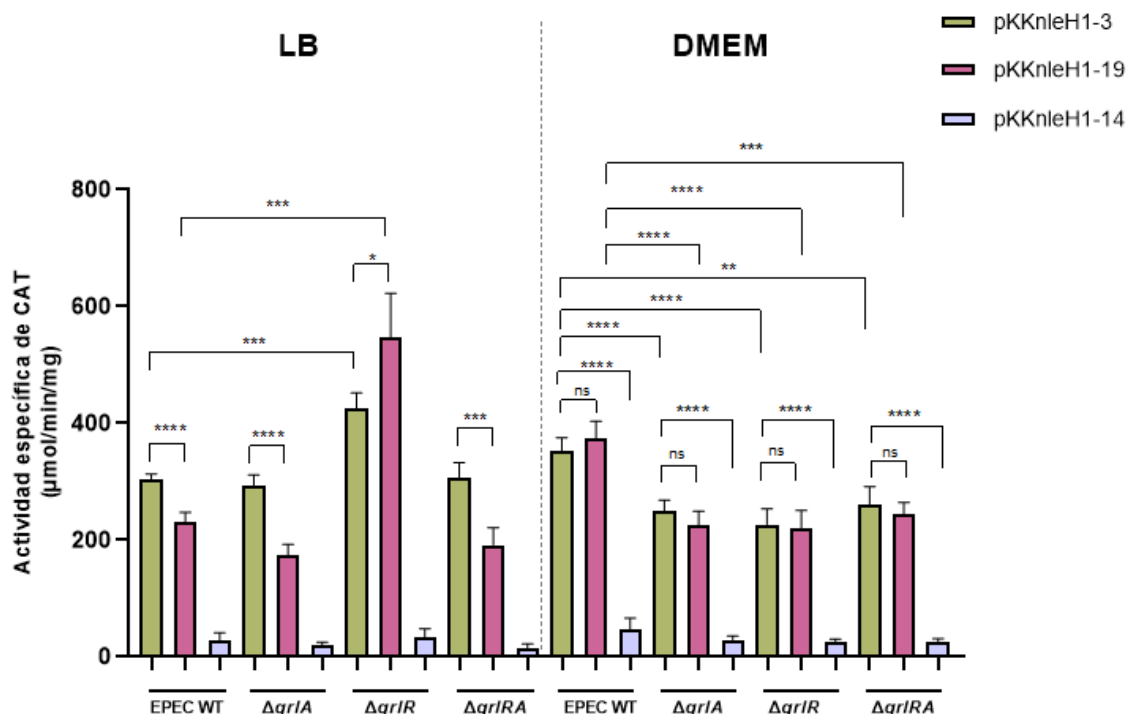


Figura 11. El motivo ATGT-2 no es importante para la expresión de *nleH1*. Actividad específica de CAT obtenida a partir de cultivos de EPEC WT, $\Delta grlA$, $\Delta grlR$ y $\Delta grlRA$ conteniendo las fusiones pKKnleH1-3, pKKnleH1-14 y pKKnleH1-19. Las cepas fueron crecidas en 5 ml de LB o DMEM por 8 h a 37°C. Se muestra el resultado de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error indican las desviaciones estándar. Se indican valores estadísticamente diferentes (ns = no significativo, *p-valor < 0,1; **p-valor < 0,01; ***p-valor < 0,001, ****p-valor < 0,0001) por la prueba t-student.

Para continuar, con la caracterización de la regulación de la expresión de *nleH1*, evaluamos el efecto de la sobreexpresión de GrlA en un sistema heterólogo. Para ello, se transformó a la cepa *E. coli* MC4100 conteniendo las diferentes fusiones con el vector pMPM-T3 o su derivado el plásmido pTEPGrlA1, el cual contiene el gen *grlA* bajo el control del promotor *lac*. A partir de cultivos en LB de las cepas resultantes, se determinó la actividad de CAT, en donde la fusión pKKnleH1-3 y pKKnleH1-19 presentaron actividad basal del promotor en presencia del vector pMPM-T3. En cambio, en presencia del plásmido pTEP-GrlA1 la expresión de ambas fusiones aumentó considerablemente, confirmando el efecto positivo que tiene GrlA en la regulación de *nleH1* (Figura 13). En contraste, la fusión pKKnleH1-14 solo presentó actividad cuando se sobre expresa GrlA; pero alrededor de cinco veces menos que para las otras dos fusiones; mientras que en la cepa con el vector vacío (pMPM-T3) los niveles de expresión fueron prácticamente nulos, resaltando la importancia del motivo ATGT-1 en la actividad basal del promotor de *nleH1* independientemente de la participación de GrlA (González-Lara, F., Tesis de maestría en proceso). Por lo tanto, los resultados obtenidos en estos experimentos señalan que, bajo estas condiciones, el motivo ATGT-2 no participa en la regulación de *nleH1*. A su vez, confirman que GrlA puede activar a este promotor cuando el motivo ATGT-1 está presente; sin embargo, también evidencia que esta secuencia juega un papel relevante por sí sola en la actividad del promotor.

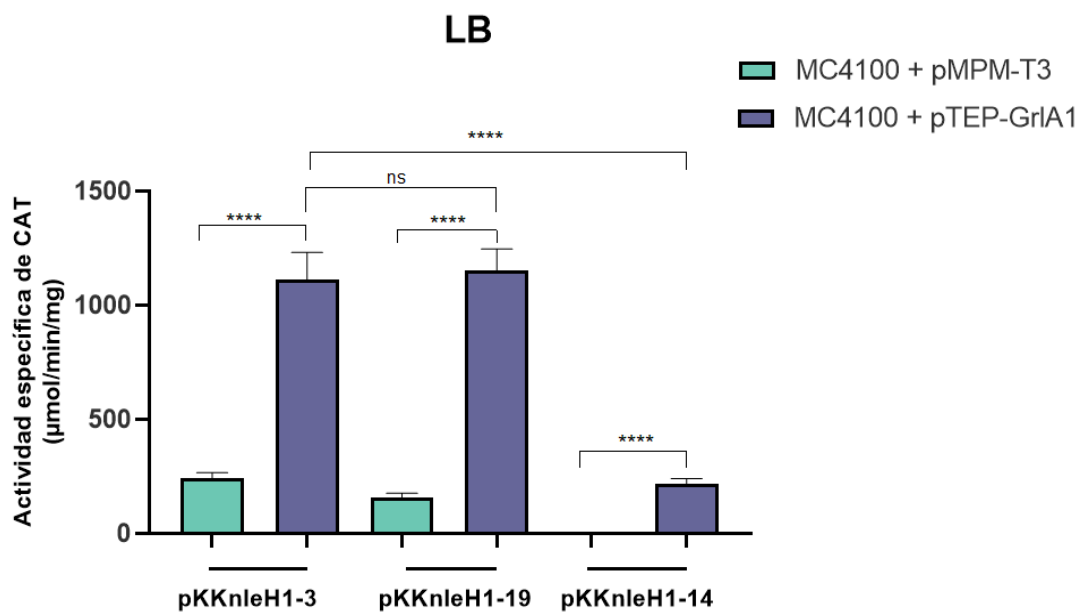


Figura 12. El ATGT-2 no está involucrado en la regulación de *nleH1* en *E. coli* K12. Actividad específica de CAT obtenida a partir de cultivos de *E. coli* MC4100 que lleva el vector vacío pMPPM-T3 o su derivado pTEP-GrlA1, conteniendo las fusiones pKKnleH1-3, pKKnleH1-14 y pKKnleH1-19. Las cepas fueron crecidas en 5 ml de LB por 8 h a 37°C. Se muestra el resultado de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error indican las desviaciones estándar. Se indican valores estadísticamente diferentes (ns = no significativo, ****p-valor < 0,0001) por la prueba t-student.

7.2 Una región espaciadora de 17 pb mejora la expresión de *nleH1* pero no la vuelve independiente de GrlA.

De acuerdo con Islam *et al.* (2011), GrlA reorienta la región espaciadora de 18 pb del promotor de *ler* para promover un reconocimiento más eficiente por parte de la RNA polimerasa. Para dilucidar si GrlA pudiese estar compensando la extensión subóptima del espaciador en *nleH1*, se diseñaron fusiones transcripcionales *nleH1-cat* en las que se alteró la región espaciadora para hacerla más corta. Se construyeron dos fusiones con una región espaciadora de 17 pb, dando lugar a pKKnleH1-17 y pKKnleH1-18. Para construir la primera fusión se eliminó el nucleótido de la posición -26 (entre el sitio GBS y la caja -35), y para la segunda fusión se eliminó el nucleótido de la posición -15 (entre el sitio GBS y la caja -10). Adicionalmente, se construyeron otras dos fusiones transcripcionales de 16 pb, llamadas pKKnleH1-20 y pKKnleH1-21, para la primera fusión se eliminaron las

bases -26 y -27 con un cambio en el nucleótido de la posición -23, y para la segunda fusión se eliminaron los nucleótidos de la posición -26 y -25 (Figura 14).

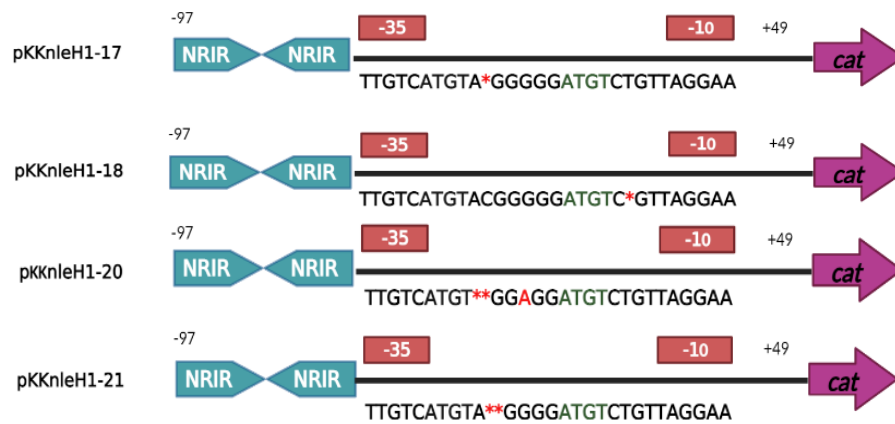


Figura 13. Representación esquemática de las fusiones transcripcionales pKKnleH1-17, pKKnleH1-18, pKKnleH1-20, pKKnleH1-21. Ver texto y Tabla 2.

La actividad de dichas fusiones fue evaluada en las cepas EPEC WT y EPEC mutante en *gria* crecidas en DMEM a 37°C en agitación; como control se empleó la fusión silvestre pKKnleH1-3. Los resultados obtenidos muestran que la expresión del promotor de *nleH1* mejora en ambas cepas cuando se elimina un base contigua a la caja -35, dando como resultado una región espaciadora de 17 pb (pKKnleH1-17), como se reportó para *ler* (Islam *et al.*, 2011). Sorpresivamente, para la fusión pKKnleH1-18, la cual también posee una región espaciadora de 17 pb, la actividad fue prácticamente nula, al igual que para las fusiones en las que se eliminaron dos bases, creando un espaciador de 16 pb (pKKnleH1-20 y pKKnleH1-21) (Figura 15). En su conjunto, estos resultados revelan que no sólo se trata del número de bases que componen la región espaciadora, sino que sugieren que la posición del ATGT-1 con respecto a la caja -10 es crítica para el funcionamiento de la RNA polimerasa. A su vez, mientras que la eliminación de una base entre la caja -35 y el ATGT-1 mejorar la expresión, la eliminación de dos bases la anula, indicando que el desfaseamiento de la caja -35, o incluso del NRIR, con respecto al ATGT-1 o la caja -10, también afecta la funcionalidad del promotor independientemente del efecto de *Gria*.

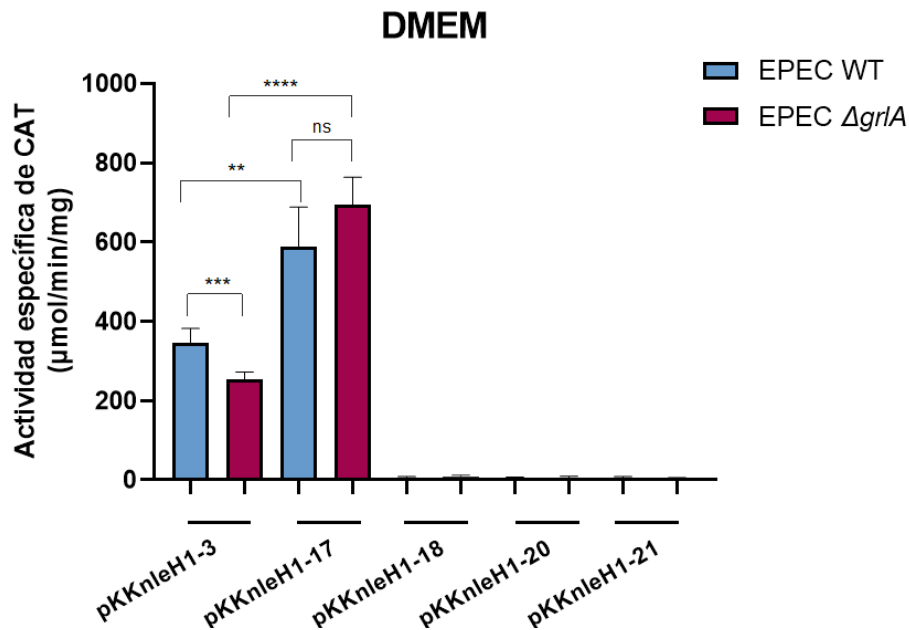


Figura 14. La expresión de *nleH1* es afectada cuando se modifica el tamaño de la región espaciadora entre las cajas -10 y -35. Actividad específica de CAT obtenida a partir de cultivos de EPEC WT, Δ grlA, conteniendo las fusiones pKKnleH1-3, pKKnleH1-17, pKKnleH1-18, pKKnleH1-20 y pKKnleH1-21. Las cepas fueron crecidas en 5 ml de DMEM por 8 h a 37°C. Se muestra el resultado de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error indican las desviaciones estándar. Se indican valores estadísticamente diferentes (ns= no significativo; **p-valor < 0,01; ***p-valor < 0,001, ****p-valor < 0,0001).

Para respaldar el resultado anterior y profundizar en su análisis, y teniendo en cuenta que la activación mediada por GrIA tiene un efecto más evidente en *E. coli* MC4100, se determinó la actividad de CAT de las fusiones pKKnleH1-17 a pKKnleH1-21 y el control pKKnleH1-3 en esta cepa conteniendo el plásmido pMPM-T3 (vector vacío) o pTEPGrlA1 (+GrIA), a partir de muestras de cultivos crecidos en LB a 37°C en agitación. Como se observa en la Figura 16, la sobreexpresión de GrIA en *E. coli* MC4100 incrementa únicamente la expresión de la fusión pKKnleH1-17, respecto a la cepa con el vector vacío, mientras que el resto de las fusiones se mantienen inactivas. Este resultado muestra que el efecto positivo de GrIA es independiente de si la región espaciadora es o no de la extensión óptima de 17 pb. Con respecto a lo que ocurre en la fusión pKKnleH1-18, la cual, a pesar de contener un espaciador considerado óptimo, resulta curioso que la actividad basal sea completamente nula, mismo caso que ocurre con las fusiones con una secuencia espaciadora aún más corta. Además, los resultados obtenidos exponen

nuevamente la interrogante acerca de las condiciones favorables para la expresión de *nleH1*; puesto que, si bien la actividad aumenta cuando se corrige la región espaciadora (pKKnleH1-17), en DMEM es difícil ver el efecto activador de GrIA.

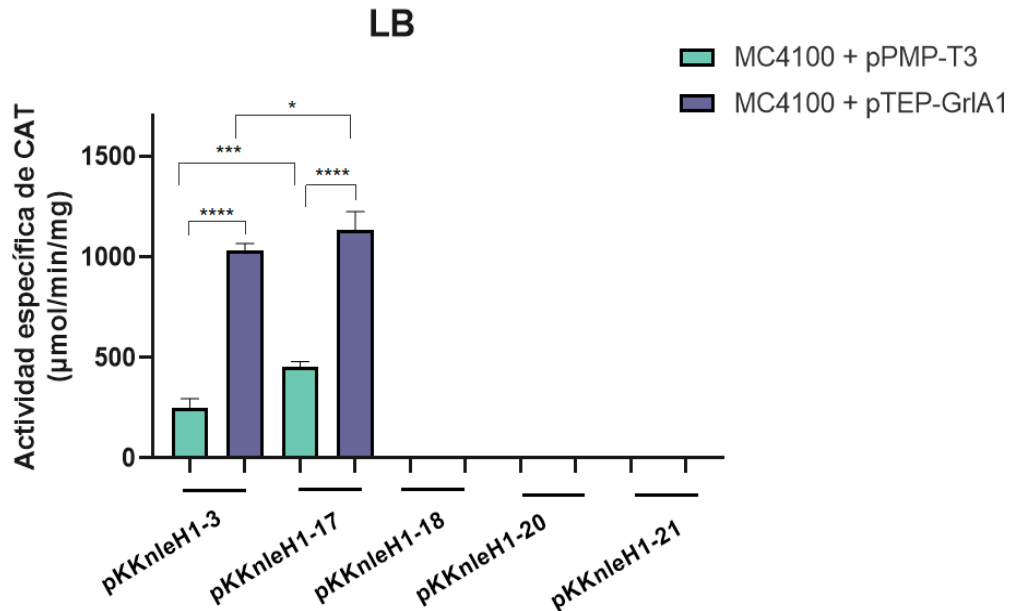


Figura 15. La expresión de *nleH1* mediada por GrIA es independiente de la extensión de la región espaciadora. Actividad específica de CAT obtenida a partir de cultivos de *E. coli* MC4100 + pPMP-T3 o pTEP-GrIA1, conteniendo las fusiones de pKKnleH1-3, pKKnleH1-17, pKKnleH1-18, pKKnleH1-20 y pKKnleH1-21. Las cepas fueron crecidas en 5 ml de LB por 8 h a 37°C. Se muestra el resultado de tres experimentos independientes realizados por duplicado. Las barras de error indican las desviaciones estándar. Se indican valores estadísticamente diferentes (*p-valor < 0,1; ***p-valor < 0,001, ****p-valor < 0,0001) por la prueba t-student.

7.3 Expresión de NleH1 bajo la influencia de reguladores específicos de los genes de virulencia de EPEC.

Con el propósito de evaluar el papel que juegan los reguladores involucrados en la regulación de la isla LEE directamente en la expresión del producto de *nleH1*. Se fusionó a su extremo 3', la secuencia que codifica para el epítotope 3XFLAG en el cromosoma de EPEC WT y sus mutantes isogénicas $\Delta grIA$, $\Delta grIR$, $\Delta grIRA$, Δler y $\Delta perC$. Las cepas resultantes se cultivaron en LB y DMEM, y a partir de muestras obtenidas de lisados celulares se determinó la expresión de NleH1-FLAG mediante *western blot*.

En un principio, fue complicado detectar a NleH1, posiblemente porque sus niveles de expresión eran bajos, por lo que para favorecer su expresión, se transformó el plásmido pTEPGrlA1 en la cepa EPEC WT con el gen etiquetado con 3XFLAG. Como control se empleó a EPEC WT que expresa la proteína NleA-FLAG también a partir del gen cromosomal, el cual es otro efector Nle regulado directamente por Ler e indirectamente por GrlA (García-Angulo *et al.*, 2012). Con estas cepas se observó que cuando GrlA es sobreexpresado, se incrementan los niveles de expresión tanto de NleH1 como de NleA (Figura 17). Estos datos respaldan el importante papel que desempeña GrlA en la regulación de genes codificados fuera de la isla LEE.

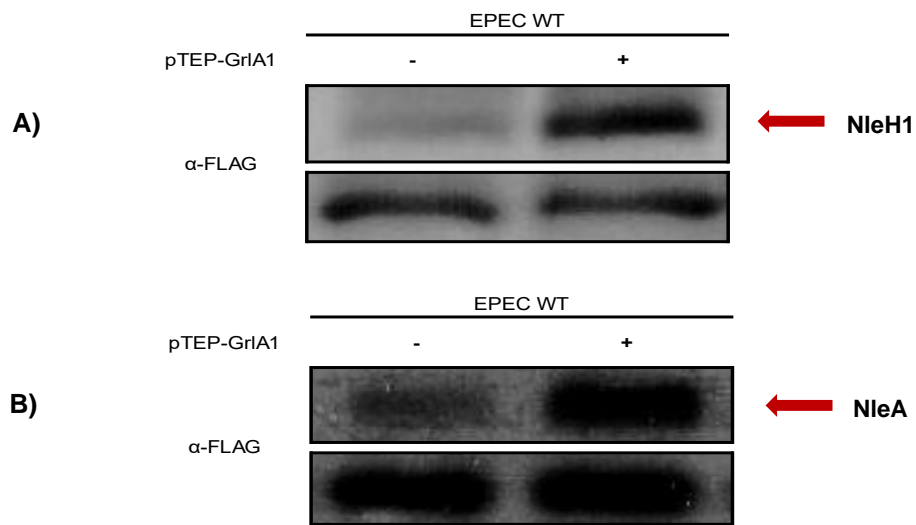


Figura 16. Detección de NleH1-FLAG y NleA-FLAG por *western blot*. El gen *nleH1* (A) y *nleA* (B) cromosómicamente etiquetados con tres copias del epítipo FLAG en la cepa EPEC WT. Las cepas fueron cultivadas en 5 ml de DMEM por 8 h a 37°C en agitación. Se utilizó el anticuerpo anti-FLAG y como control de carga se tomó una banda inespecífica reconocida por el mismo anticuerpo. Se indican aquellas cepas que también portaron el plásmido pTEP-GrlA1.

Para evaluar el efecto de los reguladores GrIR, Ler y PerC en la expresión de NleH1, considerando que es una proteína que se expresa poco, se decidió partir de pastillas colectadas de 10 ml de cultivo para preparar las muestras para el experimento de *western blot*. Además, se utilizó como control un anticuerpo específico que permite detectar la expresión de EscJ, una proteína estructural del SST3 codificada en el operón *LEE2* y regulada por el circuito Ler-GrlA-GrIR (Friedberg *et al.*, 1999).

En condiciones de represión (crecimiento en LB), NleH1-FLAG se detectó únicamente en la mutante $\Delta grIR$, mientras que EscJ se detectó en la cepa silvestre y en la mutante $\Delta grIR$, en esta última con mayor expresión. Lo que concuerda con la hipótesis de que al estar ausente GrIR, más GrIA libre se encuentra disponible para activar a sus genes blanco (Figura 18).

Por otro lado, en condiciones de inducción, se detectó NleH1-FLAG en la cepa silvestre, con un claro aumento en las mutantes $\Delta grIA$ y $\Delta grIRA$, mientras que, en la cepa $\Delta grIR$, los niveles de expresión de NleH1 disminuyeron. Estos resultados indican que en DMEM no se requiere de GrIA para inducir la expresión de NleH1, por el contrario, la ausencia de GrIR parece afectar la expresión de esta proteína. En otras palabras, parece que en esta condición el activador GrIA actúa como represor, mientras que el represor GrIR actúa como activador. De manera interesante, este fenómeno también se observa en la expresión de EscJ.

En el caso de la mutante Δler no se detectó ni a NleH1-FLAG ni a EscJ ya que, en ausencia del regulador maestro de la isla LEE no habrá expresión sin importar la condición de crecimiento. En cambio en la cepa $\Delta perC$ sí se detectó a EscJ, lo que consolida la noción de que los reguladores GrIA y PerC activan a *ler* por mecanismos diferentes (Bustamante *et al.*, (2011)); por el contrario, la expresión de NleH1-FLAG en este fondo genético casi se abate, sugiriendo que, a pesar de lo reportado previamente por González-Lara (Tesis de maestría en proceso), PerC podría estar involucrado en la regulación de *nleH1* (Figura 18).

Cabe señalar que parte de estos resultados son inesperados con base en los antecedentes y que hasta el momento no nos fue posible determinar si se trata de un comportamiento atípico debido a un aspecto técnico que involucre, por ejemplo, los reactivos utilizados para preparar el medio, o una característica inherente a las cepas, de las cuales se confirmó por secuenciación que las mutaciones fueran las correctas. Sin embargo, los resultados obtenidos dejan claro que la regulación de la isla LEE y de los genes *nle* es compleja y responde a estímulos específicos para activarse, los cuales pueden ser complicados de replicar *in vitro*.

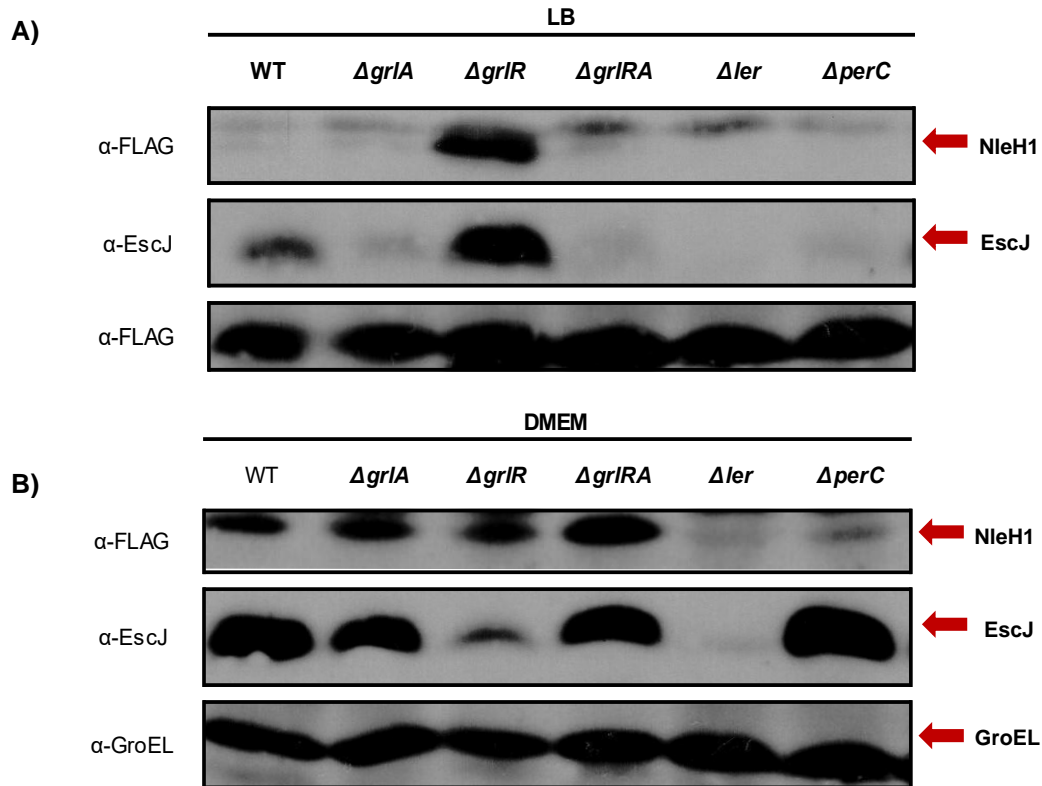


Figura 17. Expresión de NieH1 bajo el control de reguladores específicos de la isla LEE. Las cepas EPEC WT y sus derivados $\Delta grlA$, $\Delta grlR$, $\Delta grlRA$, Δler y $\Delta perC$ que portan el gen *nleH1* cromosómicamente etiquetado con 3XFLAG se cultivaron en LB (A) y DMEM (B). Muestras colectadas en fase estacionaria fueron utilizadas para realizar el experimento de *western blot* con anticuerpos anti-FLAG y anti-EscJ. GroEL se detectó como control de carga en las muestras en DMEM utilizando anti-GroEL, mientras que para las muestras en LB se empleó una banda inespecífica detectada con anti-FLAG.

8. Discusión

La adquisición de genes que codifican para los factores de virulencia que dieron lugar a la evolución de los patógenos A/E, impuso la necesidad de desarrollar mecanismos de regulación que permitieran controlar espaciotemporalmente su expresión en respuesta a las señales ambientales. Dichas señales determinan el momento y nicho en el que EPEC requiere disponer de las herramientas necesarias para modular rutas de señalización en el hospedero que les permiten evadir mecanismos de defensa, reorganizar el citoesqueleto, adherirse de manera íntima y aprovechar el entorno para colonizar y propagarse exitosamente.

La isla de patogenicidad LEE contiene la mayoría de los genes que son necesarios para el fenotipo A/E. Dentro de la isla, destaca la presencia de los reguladores Ler, GrIA y GrIR, los cuales se encargan de regular no sólo la expresión del LEE, sino también de genes codificados fuera de esta isla (Furniss *et al.*, 2018). Lo que significa que, a pesar de ser elementos adquiridos de manera horizontal, la regulación de su expresión se ha adaptado e integrado tanto a redes de regulación globales pre-existentes en la cepa receptora, como específicas de los patógenos A/E.

Así mismo, los genes *nle* que, como su nombre lo indica, se encuentran localizados fuera del LEE, codifican para proteínas efectoras que son sustrato del SST3. Por lo que, no sorprende que su expresión esté corregulada con la transcripción de la isla de patogenicidad LEE para garantizar una regulación eficiente y coordinada, como ocurre con el efector NleA (García-Angulo *et al.*, 2012).

Curiosamente, algunos efectores Nle, a pesar de no compartir homología a nivel estructural, funcional o de secuencia primaria, se encuentran codificados por genes cuya región reguladora está altamente conservada. Tal es el caso del gen *nleH1*, el cual codifica para el efector NleH1 que juega un papel importante en la inhibición de las vías de señalización tanto proinflamatoria como de la muerte celular (Pollock *et al.*, 2022). El gen *nleH1* forma parte de un subgrupo de genes *nle* que poseen una región reguladora con elementos muy interesantes, como lo son: una región en *cis*

llamada NRIR, una caja -10 alejada del consenso por la presencia de G o C, una secuencia ATGT-1 río arriba de la caja -10 y una región espaciadora de 18 pb (Figura 7).

Por las características conservadas de este subgrupo de genes *nle*, *nleH1* se ha convertido en un modelo de estudio para aportar conocimiento novedoso sobre la regulación genética, así como para entender si la expresión de un subgrupo de efectores está controlada por un mecanismo específico que permite que sean translocados en respuesta a una señal particular o en una etapa de la infección diferente a la que determina la expresión del resto de efectores codificados en la isla LEE o en otros genes *nle*.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permitieron confirmar que los reguladores de la isla LEE participan en la regulación del gen *nleH1*. GrlA actúa como regulador positivo, ya que la expresión de *nleH1* se reduce, aunque no dramáticamente, en la mutante en *grlA* en DMEM. Estas observaciones son consistentes con los datos obtenidos en la mutante en *grlR* en LB, donde la expresión de *nleH1* se incrementa probablemente debido a que en ausencia de GrlR no se impide la actividad de GrlA como activador (Figura 11). Sin embargo, la participación de GrlA en la regulación de *nleH1* es más evidente cuando este regulador es sobreexpresado en *E. coli* K12, aumentando significativamente la transcripción del promotor de *nleH1* en comparación con los niveles obtenidos con el vector vacío (Figura 12), incluso superando los niveles obtenidos en EPEC silvestre. Este resultado posiblemente se debe a que en *E. coli* K12 no se encuentran presentes todos los reguladores que pueden estar involucrados en la expresión de *nleH1* haciendo más notorio el efecto de GrlA.

Resulta interesante que el efecto de las mutantes $\Delta grlA$ y $\Delta grlR$ no sea tan evidente en DMEM, lo cual posiblemente se deba a que este medio, si bien activa la expresión de la isla LEE, puede no ser el óptimo para inducir la expresión de *nleH1*. En el laboratorio se han probado otras condiciones que favorecen la expresión de los genes de virulencia de EPEC, como el medio mínimo N (MM-N) con glicerol, el cual promueve en gran medida la transcripción de la fusión *sepZ-11* que contiene el

promotor del operón *LEE2* (Morales-Ibarra, 2019. Tesis de maestría). En consecuencia, sería interesante evaluar diferentes condiciones para la expresión de *nleH1* y, de esta manera, encontrar la condición óptima donde se pueda estudiar la función de GrlA y de otros reguladores.

Cabe destacar que en *nleH1* y otros genes *nle* se encuentra el elemento regulador NRIR (Figura 8), el cual es necesario para potenciar la activación del promotor; sin embargo, no es necesario en la regulación mediada por GrlA (González-Lara, F., Tesis de maestría en proceso). Se propone que a través de la interacción con un regulador adicional posiblemente conservado en *E. coli* K12, el NRIR podría estar optimizando la regulación positiva de este subgrupo de genes *nle* en una etapa de la infección donde son requeridos (García-Angulo *et al.*, 2012). Por lo tanto, al tratarse de dos mecanismos de regulación independientes, condiciones diferentes podrían favorecer que, en menor o mayor medida, actúe uno o el otro. Por tal motivo, es posible que la expresión de *nleH1* en ausencia de GrlA, pero en presencia del elemento NRIR, no se haya visto afectada drásticamente en DMEM.

Previamente se demostró que el motivo ATGT-1 es importante para la activación de *ler* mediada por GrlA, ya que al cambiar la segunda T por A provocó una marcada caída en la actividad del promotor mediada por la regulación de GrlA (Islam *et al.*, 2011). De manera interesante, lo mismo ocurre en *nleH1*, y por medio de ensayos EMSA se confirmó que la mutación en el motivo ATGT-1 afecta la unión de GrlA con el DNA (Figura 10) (González-Lara, F., Tesis de maestría en proceso). Proponiendo que el motivo ATGT-1, o al menos la T en esa posición, participa en favorecer las interacciones que dan lugar a la transcripción de estos genes.

En este contexto, resultó interesante evaluar al motivo ATGT-2 ubicado también en la región espaciadora del promotor de *nleH1*, mediante la modificación de la segunda T por A. Los resultados indicaron que los niveles de expresión de *nleH1* no se vieron afectados por esta mutación, sugiriendo que bajo estas condiciones el motivo ATGT-2, o al menos la base modificada, no es importante para la regulación de la transcripción de *nleH1* mediada por GrlA (fusión pKKnleH1-19, Fig.12 y 13) y que la unión de GrlA al motivo ATGT-1 es muy específica y dependiente de la

posición y el contexto, ya que en esta región podría haber otros elementos que favorece la interacción proteína-DNA. No obstante, queda por evaluar si la expresión del promotor se vería afectada al modificar un nucleótido diferente del motivo ATGT-2.

Un elemento que influye en la topología de las partes constituyentes de un promotor es la región espaciadora entre los elementos -10 y -35, la cual presenta una extensión flexible que oscila entre 16-19 pb (Ruff *et al.*, 2015). La región espaciadora más conservada en promotores dependientes de σ^{70} tiene una extensión de 17 pb, y es considerada estructuralmente “ideal” para favorecer las interacciones RNA polimerasa-promotor (Jensen & Galburt, 2021). Debido a la naturaleza helicoidal del DNA, la extensión variable de las regiones espaciadoras está asociada a diferentes orientaciones relativas de las cajas -35 y -10, lo que modula la unión de la RNA polimerasa, así como la respuesta del promotor al superenrollamiento del DNA (Forquet *et al.*, 2022; Klein *et al.*, 2021).

Aunque la mayoría de los promotores en la naturaleza tienen secuencias para cada elemento que son subóptimas o alejadas de sus respectivos consensos, nos preguntamos si la extensión en la región espaciadora del promotor de *nleH1* es una característica que define la fuerza del promotor y si sus deficiencias son compensadas mediante la unión de GrlA. Curiosamente, observamos dos escenarios completamente opuestos entre sí cuando se eliminó un nucleótido de posiciones distintas de la región espaciadora con respecto al motivo ATGT-1 para obtener una extensión óptima de 17 pb. Por un lado, la expresión de *nleH1* aumentó significativamente en EPEC respecto a la expresión obtenida con una región espaciadora silvestre, incluso en ausencia de GrlA, cuando se eliminó una base entre la caja -35 y el ATGT-1 (fusión pKKnleH1-17 vs pKKnleH1-3, Fig. 15); por el contrario, la activación de *nleH1* se abatió completamente, con o sin GrlA, cuando la base eliminada es una base presente entre el ATGT-1 y la caja -10 (fusión pKKnleH1-18, Fig. 15 y 16).

Este último resultado es contrastante con los datos reportados por Islam *et al.* (2011), en donde la actividad del promotor P1 de *LEE1* aumenta considerablemente

con deleciones de una sola base, antes y después del ATGT, en las posiciones -30 o -15 de la región espaciadora, aun en ausencia de GrIA. No obstante, la eliminación del nucleótido en la posición -15 del promotor del LEE1, el cual coincide con la posición de la base eliminada para la fusión pKKnleH1-18, no incrementa a los mismos niveles la expresión de este promotor que cuando se elimina la base adyacente al hexámero -35. Este efecto diferencial concuerda parcialmente con lo observado en este trabajo, ya que el efecto obtenido con la fusión pKKnleH1-18 es bastante más drástico.

Investigaciones previas sugieren que la composición de la secuencia de la región espaciadora también influye en la fuerza del promotor (Forquet *et al.*, 2022; Klein *et al.*, 2021). Como se observa en la Figura 9, el nucleótido de la posición -15, que corresponde a una T, se encuentra altamente conservado en los promotores del subgrupo de genes *nle*, así como en *ler* y *E1013*. En el caso de la región reguladora de *ler*, río abajo de la posición -15, se encuentra una región rica en timinas, por lo que la eliminación de la T -15 permite que otra T se ubique en la misma posición en relación con el motivo ATGT-1. Mientras que en *nleH1*, al igual que para el resto de los genes *nle*, la base contigua a la T-15 es una guanina. Esta diferencia sugiere que la T-15 es igualmente importante que la segunda T del ATGT-1 y que es parte de este motivo participando de manera muy significativa en la interacción o el reconocimiento por la RNA polimerasa. Por consiguiente, el efecto optimizador que tendría reducir la extensión de la región espaciadora es perjudicado por el cambio de una base pirimídica por una púrica al alterar la topología del DNA en esa región o un motivo que reconoce la RNA polimerasa. Además, no podemos ignorar que la T conservada en esa posición pudiera también estar involucrada en la unión de GrIA.

Resulta igualmente interesante la observación de que reducir aún más la región espaciadora a 16 pb inactiva el promotor de *nleH1* (fusiones pKKnleH1-20 y pKKnleH1-21 (Fig. 15 y 16), lo cual es consistente con lo observado para la región espaciadora del promotor de *ler* cuya expresión también disminuye considerablemente cuando su espaciador se reduce a 16 pb (Islam *et al.*, 2011).

Por tanto, los cambios en los niveles de expresión de *nleH1* a causa de la alteración de la región espaciadora, resaltan la importancia de este elemento en la regulación transcripcional. No obstante, otro elemento a considerar es que la caja -10 de estos promotores no coincide con el consenso TATAAT; sin embargo, también se ha observado que el mejoramiento de la caja -10 del promotor de *nleH1*, mejora considerablemente su expresión aún en ausencia de GrIA (González-Lara, F., Tesis de maestría en proceso). Con base en lo anterior, sería interesante evaluar si se restaura la actividad de las fusiones pKKnleH1-18, 20 y 21 cuando se modifica su caja -10 para acercarla al consenso.

La propuesta sugerida por Islam *et al.* (2011) es que GrIA actúa como un activador de cambio conformacional en sus promotores blanco, donde el espacio entre los hexámeros -10 y -35 es mayor que los 17 pb óptimos para permitir la interacción de la RNA polimerasa. Sin embargo, en este estudio observamos que, aunque una extensión de 17 pb mejora significativamente la expresión de *nleH1*, con excepción de cuando se modifica la posición -15, la presencia de GrIA en multicopia sigue teniendo un efecto positivo significativo sobre su actividad (pKKnleH1-3 vs pKKnleH1-17, Fig. 16). Por tanto, el efecto regulador de GrIA sobre *nleH1* es independiente de la extensión de la región espaciadora.

Aún no es clara la función que desempeña GrIA al unirse a la región reguladora para promover la activación del promotor de *nleH1*. De acuerdo con la información conocida hasta el momento, se propone que la segunda T del motivo ATGT-1 es necesaria para que la RNA polimerasa forme un complejo productivo con el promotor. En este escenario, GrIA podría fortalecer dicha interacción tal vez no sólo contactando al DNA, sino también a la RNA polimerasa para potenciar su capacidad para transitar a la formación del complejo abierto en un contexto donde la caja -10 está alejada del consenso (González-Lara, F., Tesis de maestría en proceso). Sin embargo, queda por determinar si GrIA interactúa también con alguna de las subunidades de la RNA polimerasa actuando como una subunidad transitoria para favorecer la formación del complejo abierto de la transcripción.

Además, nuestras observaciones permiten sugerir que la T conservada en la posición -15 tiene un papel importante en la transcripción de *nleH1*, la cual podría participar en la unión de GrIA a la región espaciadora o en la interacción con la RNA polimerasa. De acuerdo con esta propuesta, la secuencia TCTGT (ubicada de la segunda T del motivo ATGT-1 a la caja -10) es muy similar al consenso de la secuencia -10 extendida (TGTGn), la cual establece contactos con el dominio 3 de la subunidad sigma (σ_3), y en algunos promotores este elemento puede promover la asociación de la RNA polimerasa con el promotor y compensar una caja-10 débil para dar lugar a la formación del complejo abierto (Jensen *et al.*, 2021). A través de un análisis de datos transcriptómicos y bibliotecas de promotores sintéticos estandarizados, se encontró que motivos 5'-TG-3' dentro de la región espaciadora tiene una influencia importante en la actividad del promotor a través del incremento de la afinidad de unión con la RNA polimerasa (Klein *et al.*, 2021).

Es importante resaltar que la regulación de la expresión de *nleH1* varía entre patógenos A/E. De acuerdo con estudios previos, se observó que en EPEC, Ler no regula la transcripción de genes *nle* que contienen NRIR como: *nleB2*, *nleG* y *nleH1* (García-Angulo *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2006); sin embargo, en este estudio NleH1-FLAG apenas se detectó en la cepa Δler , sugiriendo que es requerido para su expresión (Figura 18). Mediante un análisis de microarreglos de DNA se encontró que en EPEC varios genes efectores *nle* están regulados por Ler pero con niveles comparables de activación, incluidos *nleA*, *nleI/G*, *nleF*, *nleB*, *nleH1* y *nleH2* (Bingle *et al.*, 2014).

Así también, en EHEC se demostró que la expresión de *nleH1* y *nleH2* es dependiente del regulón Ler-GrIA, aunque en diferentes grados respecto a *tir* (Holmes *et al.*, 2012). Por otra parte, en *C. rodentium* se encontró que *nleH* se transcribe de manera independiente de Ler y GrIA; no obstante, NleH-HA (gen *nleH* etiquetado con el epítipo de hemaglutinina) fue indetectable en muestras de células completas y en sobrenadante de cultivos de las cepas Δler y $\Delta grIA$ (García-Angulo *et al.*, 2008). Estos datos sugieren que Ler influye indirectamente en la transcripción de *nleH1* a través de GrIA. Además, si bien los genes *nle* comparten elementos de

regulación con los genes codificados en el LEE, la regulación no es necesariamente igual o al mismo nivel.

En cuanto a que el promotor de *nleH1* no es activado por PerC (González-Lara, Tesis de maestría en proceso), aquí observamos cantidades mínimas de NleH1-FLAG en la cepa EPEC mutante en *perC*. Con base en la conservación funcional entre los promotores de *nleH1* y *ler*, y la estrecha conexión entre la isla LEE y el pEAF mediada principalmente por PerC, no se descarta que este regulador participe de forma indirecta en la regulación de *nleH1*, quizá a través de la regulación mediada por el elemento NRIR, de la cual se sabe poco.

Por otro lado, los experimentos de *western blot*, permitieron confirmar que la regulación de NleH1 está bajo el control del circuito regulador GrlA-GrlR, ya que NleH1 requiere de GrlA para su expresión, como sucede con NleA (Figura 17).

A pesar de que en medio DMEM los reguladores GrlA y GrlR parecen tener efectos contrarios a lo previamente descrito, es preciso señalar la importancia de la regulación a nivel post-transcripcional y post-traducciona. Ya que los niveles de expresión de los genes no necesariamente se reflejan en los de la proteína. En *C. rodentium* se observó que la regulación mediada por Ler y GrlA en la expresión de la isla LEE influye post-traducciona. Particularmente, a través de la chaperona CesT, codificada en la isla LEE, la cual es requerida para la secreción de NleH, por lo que en su ausencia el efector se vuelve inestable y es degradado por la proteasa Lon (García-Angulo *et al.*, 2008).

La diversidad de los mecanismos de regulación en los factores virulencia quizás refleje su adquisición en eventos diferentes e independientes de la evolución, y es interesante como éstos se han ido integrando para corregular su expresión en respuesta a una señal ambiental específica o durante una etapa particular de la infección (García-Angulo *et al.*, 2012).

Todavía queda mucho por entender sobre la regulación de *nleH1* y, por tanto, de los otros genes *nle* que poseen el NRIR y el motivo ATGT-1; sin embargo, los resultados de este trabajo, en su conjunto, nos permiten proponer el siguiente

modelo de regulación del gen *nleH1*, el cual integra la regulación mediada por GrIA y por el elemento NRIR, mecanismos independientes pero que en su conjunto promueven la transcripción de *nleH1* (Figura 19).

Estos resultados contribuyen a sentar las bases para seguir entendiendo cómo interactúan los elementos reguladores que convergen en estos promotores, y principalmente cuál es el papel importante que desempeña GrIA para regular positivamente su expresión.

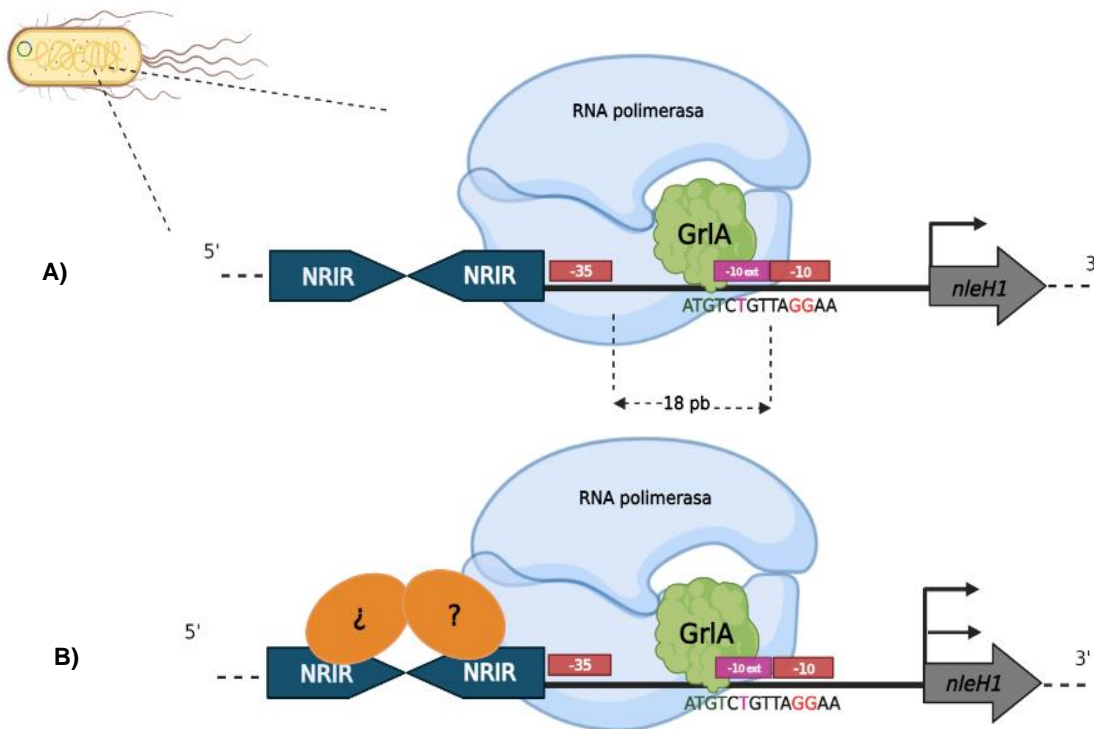


Figura 19. Modelo propuesto del mecanismo de regulación de *nleH1*. **A)** GrIA se une directamente a la región espaciadora del promotor, siendo el motivo ATGT-1 de importancia para este reconocimiento. Tanto el motivo ATGT-1 y la unión de GrIA promueven cooperativamente el reconocimiento de la RNA polimerasa y compensan la presencia de una caja -10 débil facilitando la formación del complejo abierto y el inicio de la transcripción de *nleH1*. Durante este proceso la caja -10 ext desempeña un importante papel. **B)** La región NRIR podría ser un sitio de reconocimiento para un regulador (en naranja), probablemente un dímero, que actúa en sinergia con la RNA polimerasa, pero no con GrIA, para aumentar los niveles de transcripción del gen. Se indican los elementos y características de la región reguladora de *nleH1* como las cajas -35 y -10, en la caja -10 extendida se resalta la participación de la T de la posición -15, la RNA polimerasa y proteínas activadoras. Modificado de González-Lara, F. (Tesis de maestría en proceso).

9. Conclusiones

- La expresión de *nleH1* está bajo el control del circuito GrlA-GrlR.
- El efecto positivo de GrlA en la regulación de *nleH1* es evidente cuando este regulador es sobreexpresado en *E. coli* K12.
- La región ATGT-2 próxima a la caja -35 del promotor no participa en la regulación transcripcional de *nleH1* bajo las condiciones analizadas.
- La activación mediada por GrlA en la transcripción de *nleH1* es independiente de la extensión subóptima de la región espaciadora.
- La T conservada en la posición -15, la cual podría formar parte de la secuencia -10 extendida, tiene un papel importante en la transcripción de *nleH1*.
- La proteína efectora NleH1 se expresa muy poco, y se requiere de alternativas para su visualización.
- Los reguladores PerC y Ler podrían participar indirectamente en la regulación de *nleH1*.

10. Perspectivas

- Encontrar las condiciones óptimas para la expresión del gen *nleH1*.
- Evaluar la expresión de *nleH1* dependiente de GrIA cuando la región espaciadora es óptima y la caja -10 del promotor es cercana al consenso.
- Evaluar la actividad de las fusiones *nleH1-cat* con la región espaciadora de 16 pb y la caja -10 del promotor corregida.
- Generar una nueva fusión transcripcional *nleH1-cat* en la cual se haya eliminado un nucleótido entre el sitio GBS y la caja -10, diferente a la probada en este trabajo, con la finalidad de evaluar si el fenotipo observado en la activación mediada por GrIA es diferente.
- Estudiar la regulación post-transcripcional de *nleH1*.
- Evaluar la interacción directa entre el GrIA y la RNA polimerasa.

11. Bibliografía

- Ahmed, N., Dobrindt, U., Hacker, J., & Hasnain, S. E. (2008). Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics, epidemiology and intervention. *Nature Reviews. Microbiology*, 6(5), 387–394. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1889>
- Angulo-Zamudio, U. A., Gutiérrez-Jiménez, J., Monroy-Higuera, L., Flores-Villaseñor, H., Leon-Sicairos, N., Velazquez-Roman, J., Vidal, J. E., Tapia-Pastrana, G., & Canizalez-Roman, A. (2021). Non-diarrheagenic and diarrheagenic *E. coli* carrying supplementary virulence genes (SVG) are associated with diarrhea in children from Mexico. *Microbial Pathogenesis*, 157(104994), 104994. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104994>
- Baruch, K., Gur-Arie, L., Nadler, C., Koby, S., Yerushalmi, G., Ben-Neriah, Y., Yogev, O., Shaulian, E., Guttman, C., Zarivach, R., & Rosenshine, I. (2011). Metalloprotease type III effectors that specifically cleave JNK and NF- κ B: NleD and NleC clip JNK and p65, respectively. *The EMBO Journal*, 30(1), 221–231. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.297>
- Berdichevsky, T., Friedberg, D., Nadler, C., Rokney, A., Oppenheim, A., & Rosenshine, I. (2005). Ler is a negative autoregulator of the *LEE1* operon in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187(1), 349–357. <https://doi.org/10.1128/jb.187.1.349-357.2005>
- Bhatt, S., Romeo, T., & Kalman, D. (2011). Honing the message: post-transcriptional and post-translational control in attaching and effacing pathogens. *Trends in Microbiology*, 19(5), 217–224. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2011.01.004>
- Bingle, L. E. H., Constantinidou, C., Shaw, R. K., Islam, M. S., Patel, M., Snyder, L. A. S., Lee, D. J., Penn, C. W., Busby, S. J. W., & Pallen, M. J. (2014). Microarray analysis of the Ler regulon in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains. *PloS One*, 9(1), e80160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080160>
- Blank, T. E., Jean-Philippe, N., & Donnenberg, M. S. (2002). Enteropatogenic *Escherichia coli*. En M.S. Donnenberg (Ed.), *Escherichia coli: Virulence Mechanisms of a Versatile Pathogen* (pp. 977–980). Academic Press.
- Blasche, S., Mörtl, M., Steuber, H., Siszler, G., Nisa, S., Schwarz, F., Lavrik, I., Gronewold, T. M. A., Maskos, K., Donnenberg, M. S., Ullmann, D., Uetz, P., & Kögl, M. (2013). The *E. coli* effector protein NleF is a caspase inhibitor. *PloS One*, 8(3), e58937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058937>
- Brown, N. L., Stoyanov, J. V., Kidd, S. P., & Hobman, J. L. (2003). The MerR family of transcriptional regulators. *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2–3), 145–163. [https://doi.org/10.1016/s0168-6445\(03\)00051-2](https://doi.org/10.1016/s0168-6445(03)00051-2)
- Bustamante, V. H., Santana, F. J., Calva, E., & Puente, J. L. (2001). Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Molecular Microbiology*, 39(3), 664–678. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02209.x>
- Bustamante, V. H., Villalba, M. I., García-Angulo, V. A., Vázquez, A., Martínez, L. C., Jiménez, R., & Puente, J. L. (2011). PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*: Regulation of the LEE genes by PerC and GrlA. *Molecular Microbiology*, 82(2), 398–415. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07819.x>

- Cadena-Guinto, E. (2016). Regulación de los genes *E2348C_1012* y *E2348C_103* por los reguladores GrlA y GrlR en *Escherichia coli* enteropatógena. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de México. <https://hdl.handle.net/20.500.14330/TES01000752621>
- Chattopadhyay, S., & Sokurenko, E. V. (2013). Evolution of pathogenic *Escherichia coli*. En M. S. Donnenberg (Ed.), *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis* (pp. 45–64). Academic Press.
- Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews. Microbiology*, *8*(1), 26–38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, *26*(4), 822–880. <https://doi.org/10.1128/cmr.00022-13>
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(12), 6640–6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>
- Davis, M. C., Kesthely, C. A., Franklin, E. A., & MacLellan, S. R. (2017). The essential activities of the bacterial sigma factor. *Canadian Journal of Microbiology*, *63*(2), 89–99. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0576>
- De Masi, L. G., Sturey, C. D., Lieberman, J. A., & Donnenberg, M. S. (2013). The type 2 secretion and type 4 pilus systems of *Escherichia coli*. En *Escherichia coli* (pp. 387–416). Elsevier.
- Dean, P., & Kenny, B. (2009). The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Current Opinion in Microbiology*, *12*(1), 101–109. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.11.006>
- Donnenberg, M. S., & Kaper, J. B. (1992). Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, *60*(10), 3953–3961. <https://doi.org/10.1128/iai.60.10.3953-3961.1992>
- Elliott, S. J., Wainwright, L. A., McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Deng, Y., Lai, L.-C., McNamara, B. P., Donnenberg, M. S., & Kaper, J. B. (2002). The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69: The locus of enterocyte effacement. *Molecular Microbiology*, *28*(1), 1–4. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00783.x>
- Forquet, R., Nasser, W., Reverchon, S., & Meyer, S. (2022). Quantitative contribution of the spacer length in the supercoiling-sensitivity of bacterial promoters. *Nucleic Acids Research*, *50*(13), 7287–7297. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac579>
- Friedberg, D., Umanski, T., Fang, Y., & Rosenshine, I. (1999). Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, *34*(5), 941–952. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01655.x>
- Furniss, R. C. D., & Clements, A. (2018). Regulation of the locus of enterocyte effacement in Attaching and effacing pathogens. *Journal of Bacteriology*, *200*(2). <https://doi.org/10.1128/jb.00336-17>
- Gao, X., Wan, F., Mateo, K., Callegari, E., Wang, D., Deng, W., Puente, J., Li, F., Chaussee, M. S., Finlay, B. B., Lenardo, M. J., & Hardwidge, P. R. (2009). Bacterial effector binding to ribosomal protein S3 subverts NF-κB function. *PLoS Pathogens*, *5*(12), e1000708. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000708>

- García-Angulo, V. A., Martínez-Santos, V. I., Villaseñor, T., Santana, F. J., Huerta-Saquero, A., Martínez, L. C., Jiménez, R., Lara-Ochoa, C., Téllez-Sosa, J., Bustamante, V. H., & Puente, J. L. (2012). A distinct regulatory sequence is essential for the expression of a subset of *nle* genes in attaching and effacing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *194*(20), 5589–5603. <https://doi.org/10.1128/jb.00190-12>
- Garmendia, J., Frankel, G., & Crepin, V. F. (2005). Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections: Translocation, Translocation, Translocation. *Infection and Immunity*, *73*(5), 2573–2585. <https://doi.org/10.1128/iai.73.5.2573-2585.2005>
- Gaytán, M. O., Martínez-Santos, V. I., Soto, E., & González-Pedrajo, B. (2016). Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00129>
- Girón, J. A., Ho, A. S. Y., & Schoolnik, G. K. (1991). An Inducible Bundle-Forming Pilus of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science (New York, N.Y.)*, *254*(5032), 710–713. <https://doi.org/10.1126/science.1683004>
- Gómez-Duarte, O. G., & Kaper, J. B. (1995). A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, *63*(5), 1767–1776. <https://doi.org/10.1128/iai.63.5.1767-1776.1995>
- González-Lara, F. *Análisis de la regulación mediada por GrlA y el elemento regulador NRIR del gen *nleH1* de *Escherichia coli* enteropatógena*. Tesis de Maestría en proceso. Universidad Autónoma de México.
- Gruenheid, S., DeVinney, R., Bladt, F., Goosney, D., Gelkop, S., Gish, G. D., Pawson, T., & Finlay, B. B. (2001). Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nature Cell Biology*, *3*(9), 856–859. <https://doi.org/10.1038/ncb0901-856>
- Hemrajani, C., Berger, C. N., Robinson, K. S., Marchès, O., Mousnier, A., & Frankel, G. (2010). NleH effectors interact with Bax inhibitor-1 to block apoptosis during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(7), 3129–3134. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911609106>
- Holmes, A., Lindestam Arlehamn, C. S., Wang, D., Mitchell, T. J., Evans, T. J., & Roe, A. J. (2012). Expression and regulation of the *Escherichia coli* O157:H7 effector proteins NleH1 and NleH2. *PloS One*, *7*(3), e33408. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033408>
- Ibarra, J. A., García-Zacarias, C. M., Lara-Ochoa, C., Carabarin-Lima, A., Tecpanecatli-Xihuitl, J. S., Perez-Rueda, E., Martínez-Laguna, Y., & Puente, J. L. (2013). Further characterization of functional domains of PerA, role of amino and carboxy terminal domains in DNA binding. *PloS One*, *8*(2), e56977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056977>
- Iguchi, A., Thomson, N. R., Ogura, Y., Saunders, D., Ooka, T., Henderson, I. R., Harris, D., Asadulghani, M., Kurokawa, K., Dean, P., Kenny, B., Quail, M. A., Thurston, S., Dougan, G., Hayashi, T., Parkhill, J., & Frankel, G. (2009). Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *Journal of Bacteriology*, *191*(1), 347–354. <https://doi.org/10.1128/jb.01238-08>
- Iizumi, Y., Sagara, H., Kabe, Y., Azuma, M., Kume, K., Ogawa, M., Nagai, T., Gillespie, P. G., Sasakawa, C., & Handa, H. (2007). The enteropathogenic *E. coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. *Cell Host & Microbe*, *2*(6), 383–392. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.09.012>

- Islam, M. S., Bingle, L. E. H., Pallen, M. J., & Busby, S. J. W. (2011). Organization of the *LEE1* operon regulatory region of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and activation by GrlA. *Molecular Microbiology*, 79(2), 468–483. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07460.x>
- Iyoda, S., Koizumi, N., Satou, H., Lu, Y., Saitoh, T., Ohnishi, M., & Watanabe, H. (2006). The GrlR-GrlA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and LEE-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 188(16), 5682–5692. <https://doi.org/10.1128/jb.00352-06>
- Jang, J., Hur, H.-G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 570–581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>
- Jensen, D., & Galburt, E. A. (2021). The context-dependent influence of promoter sequence motifs on transcription initiation kinetics and regulation. *Journal of Bacteriology*, 203(8). <https://doi.org/10.1128/jb.00512-20>
- Jiménez, R., Cruz-Migoni, S. B., Huerta-Saquero, A., Bustamante, V. H., & Puente, J. L. (2010). Molecular characterization of GrlA, a specific positive regulator of *ler* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 192(18), 4627–4642. <https://doi.org/10.1128/jb.00307-10>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(2), 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- 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. *Molecular Microbiology*, 31(4), 1229–1241. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01265.x>
- Kim, J., Thanabalasuriar, A., Chaworth-Musters, T., Fromme, J. C., Frey, E. A., Lario, P. I., Metalnikov, P., Rizg, K., Thomas, N. A., Lee, S. F., Hartland, E. L., Hardwidge, P. R., Pawson, T., Strynadka, N. C., Finlay, B. B., Schekman, R., & Gruenheid, S. (2007). The bacterial virulence factor NleA inhibits cellular protein secretion by disrupting mammalian COPII function. *Cell Host & Microbe*, 2(3), 160–171. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.07.010>
- Klein, C. A., Teufel, M., Weile, C. J., & Sobetzko, P. (2021). The bacterial promoter spacer modulates promoter strength and timing by length, TG-motifs and DNA supercoiling sensitivity. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03817-4>
- Kralicek, S. E., Nguyen, M., Rhee, K.-J., Tapia, R., & Hecht, G. (2018). EPEC NleH1 is significantly more effective in reversing colitis and reducing mortality than NleH2 via differential effects on host signaling pathways. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 98(4), 477–488. <https://doi.org/10.1038/s41374-017-0016-1>
- Lara-Ochoa, C., Huerta-Saquero, A., Medrano-López, A., Deng, W., Finlay, B. B., Martínez-Laguna, Y., & Puente, J. L. (2023). GrlR, a negative regulator in enteropathogenic *E. coli*, also represses the expression of LEE virulence genes independently of its interaction with its cognate partner GrlA. *Frontiers in microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1063368>
- Li, M., Rosenshine, I., Yu, H. B., Nadler, C., Mills, E., Hew, C. L., & Leung, K. Y. (2006). Identification and characterization of NleI, a new non-LEE-encoded effector of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Microbes and Infection*, 8(14–15), 2890–2898. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.09.006>

- Martinez-Laguna, Y., Calva, E., & Puente, J. L. (1999). Autoactivation and environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 33(1), 153–166. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01460.x>
- Matsuzawa, T., Kuwae, A., Yoshida, S., Sasakawa, C., & Abe, A. (2004). Enteropathogenic *Escherichia coli* activates the RhoA signaling pathway via the stimulation of GEF-H1. *The EMBO journal*, 23(17), 3570–3582. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600359>
- Mellies, J. L., Navarro-Garcia, F., Okeke, I., Frederickson, J., Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (2001). *espC* pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. *Infection and Immunity*, 69(1), 315–324. <https://doi.org/10.1128/iai.69.1.315-324.2001>
- Miyahara, A., Nakanishi, N., Ooka, T., Hayashi, T., Sugimoto, N., & Tobe, T. (2009). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector EspL2 induces actin microfilament aggregation through annexin 2 activation. *Cellular Microbiology*, 11(2), 337–350. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01256.x>
- Morales-Ibarra, E. (2019). Regulación del gen *E2348C_103* de *Escherichia coli* enteropatógena. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de México. <https://hdl.handle.net/20.500.14330/TES01000796990>
- Nadler, C., Baruch, K., Kobi, S., Mills, E., Haviv, G., Farago, M., Alkalay, I., Bartfeld, S., Meyer, T. F., Ben-Neriah, Y., & Rosenshine, I. (2010). The type III secretion effector NleE inhibits NF- κ B activation. *PLoS Pathogens*, 6(1), e1000743. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000743>
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(2), 403–403. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.2.403>
- Navarro-García, F., Canizalez-Roman, A., Sui, B. Q., Nataro, J. P., & Azamar, Y. (2004). The Serine protease motif of EspC from enteropathogenic *Escherichia coli* produces epithelial damage by a mechanism different from that of Pet toxin from enteroaggregative *E. coli*. *Infection and Immunity*, 72(6), 3609–3621. <https://doi.org/10.1128/iai.72.6.3609-3621.2004>
- Newton, H. J., Pearson, J. S., Badea, L., Kelly, M., Lucas, M., Holloway, G., Wagstaff, K. M., Dunstone, M. A., Sloan, J., Whisstock, J. C., Kaper, J. B., Robins-Browne, R. M., Jans, D. A., Frankel, G., Phillips, A. D., Coulson, B. S., & Hartland, E. L. (2010). The type III effectors NleE and NleB from enteropathogenic *E. coli* and OspZ from *Shigella* block nuclear translocation of NF- κ B p65. *PLoS Pathogens*, 6(5), e1000898. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000898>
- Nisa, S., Scanlon, K. M., & Donnenberg, M. S. (2013). Enteropathogenic *Escherichia coli*. En M. S. Donnenberg (Ed.), *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis* (pp. 75–119). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397048-0.00004-8>.
- O’Ryan, M., Prado, V., & Pickering, L. K. (2005). A millennium update on pediatric diarrheal illness in the developing world. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 16(2), 125–136. <https://doi.org/10.1053/j.spid.2005.12.008>
- Padavannil, A., Jobichen, C., Mills, E., Velazquez-Campoy, A., Li, M., Leung, K. Y., Mok, Y. K., Rosenshine, I., & Sivaraman, J. (2013). Structure of GrlR–GrlA complex that prevents GrlA activation of virulence genes. *Nature Communications*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms3546>
- Patzi-Vargas, S., Zaidi, M. B., Perez-Martinez, I., León-Cen, M., Michel-Ayala, A., Chaussabel, D., & Estrada-Garcia, T. (2015). Diarrheagenic *Escherichia coli* carrying supplementary virulence

- genes are an important cause of moderate to severe diarrhoeal disease in México. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(3), e0003510. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003510>
- Pearson, J. S., Giogha, C., Wong Fok Lung, T., & Hartland, E. L. (2016). The Genetics of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence. *Annual Review of Genetics*, 50(1), 493–513. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035138>
- Pearson, J. S., Riedmaier, P., Marchès, O., Frankel, G., & Hartland, E. L. (2011). A type III effector protease NleC from enteropathogenic *Escherichia coli* targets NF- κ B for degradation: NleC targets inflammatory signalling. *Molecular Microbiology*, 80(1), 219–230. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07568.x>
- Pham, T. H., Gao, X., Tsai, K., Olsen, R., Wan, F., & Hardwidge, P. R. (2012). Functional differences and interactions between the *Escherichia coli* type III secretion system effectors NleH1 and NleH2. *Infection and Immunity*, 80(6), 2133–2140. <https://doi.org/10.1128/iai.06358-11>
- Pinaud, L., Sansonetti, P. J., & Phalipon, A. (2018). Host cell targeting by enteropathogenic bacteria T3SS effectors. *Trends in Microbiology*, 26(4), 266–283. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.01.010>
- Platenkamp, A., & Mellies, J. L. (2018). Environment Controls LEE Regulation in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01694>
- Puente, J. L., Bieber, D., Ramer, S. W., Murray, W., & Schoolnik, G. K. (1996). The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Molecular Microbiology*, 20(1), 87–100. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02491.x>
- Royan, S. V., Jones, R. M., Koutsouris, A., Roxas, J. L., Falzari, K., Weflen, A. W., Kim, A., Bellmeyer, A., Turner, J. R., Neish, A. S., Rhee, K.-J., Viswanathan, V. K., & Hecht, G. A. (2010). Enteropathogenic *E. coli* non-LEE encoded effectors NleH1 and NleH2 attenuate NF- κ B activation: NleH1 and NleH2 attenuate NF- κ B activation. *Molecular Microbiology*, 78(5), 1232–1245. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07400.x>
- Ruchaud-Sparagano, M. H., Mühlen, S., Dean, P., & Kenny, B. (2011). The enteropathogenic *E. coli* (EPEC) tir effector inhibits NF- κ B activity by targeting TNF α receptor-associated factors. *PLoS Pathogens*, 7(12), e1002414. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002414>
- Ruff, E., Record, M., Jr., & Artsimovitch, I. (2015). Initial events in bacterial transcription initiation. *Biomolecules*, 5(2), 1035–1062. <https://doi.org/10.3390/biom5021035>
- Saitoh, T., Iyoda, S., Yamamoto, S., Lu, Y., Shimuta, K., Ohnishi, M., Terajima, J., & Watanabe, H. (2008). Transcription of the *ehx* enterohemolysin gene is positively regulated by GrlA, a global regulator encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 190(14), 4822–4830. <https://doi.org/10.1128/jb.00231-08>
- Saldaña, Z., Erdem, A. L., Schüller, S., Okeke, I. N., Lucas, M., Sivananthan, A., Phillips, A. D., Kaper, J. B., Puente, J. L., & Girón, J. A. (2009). The *Escherichia coli* Common Pilus and the Bundle-Forming Pilus Act in Concert during the Formation of Localized Adherence by Enteropathogenic *E. coli*. *Journal of Bacteriology*, 191(11), 3451–3461. <https://doi.org/10.1128/jb.01539-08>
- Serapio-Palacios, A., & Finlay, B. B. (2020). Dynamics of expression, secretion and translocation of type III effectors during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Current Opinion in Microbiology*, 54, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.12.001>

- Serapio-Palacios, A., & Navarro-Garcia, F. (2016). EspC, an autotransporter protein secreted by Enteropathogenic *Escherichia coli*, causes apoptosis and necrosis through caspase and calpain activation, including direct procaspase-3 cleavage. *MBio*, 7(3). <https://doi.org/10.1128/mbio.00479-16>
- Shames, S. R., Croxen, M. A., Deng, W., & Finlay, B. B. (2011). The type III system-secreted effector EspZ localizes to host mitochondria and interacts with the translocase of inner mitochondrial membrane 17b. *Infection and Immunity*, 79(12), 4784–4790. <https://doi.org/10.1128/iai.05761-11>
- Smith, J. L., & Fratamico, P. M. (2018). *Escherichia coli* Pathotypes. En *Pathogenic Escherichia coli: Evolution, Omics, Detection and Control*. Caister Academic Press.
- Sohel, I., Puente, J. L., Ramer, S. W., Bieber, D., Wu, C. Y., & Schoolnik, G. K. (1996). Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *Journal of Bacteriology*, 178(9), 2613–2628. <https://doi.org/10.1128/jb.178.9.2613-2628.1996>
- Tobe, T., Schoolnik, G. K., Sohel, I., Bustamante, V. H., & Puente, J. L. (1996). Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 21(5), 963–975. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1996.531415.x>
- Torres, A. G. (2006). Adhesins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Ecosal Plus*, 2(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.8.3.2.4>
- Tu, X., Nisan, I., Yona, C., Hanski, E., & Rosenshine, I. (2003). EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: EspH, a new effector of EPEC and EHEC. *Molecular Microbiology*, 47(3), 595–606. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03329.x>
- Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S., & Bossi, L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in Salmonella. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(26), 15264–15269. <https://doi.org/10.1073/pnas.261348198>
- Vidal, J. E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., & Navarro-García, F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Publica de Mexico*, 49(5). <https://doi.org/10.1590/s0036-36342007000500008>
- Vidal, J. E., & Navarro-García, F. (2008). EspC translocation into epithelial cells by Enteropathogenic *Escherichia coli* requires a concerted participation of type V and III secretion systems. *Cellular Microbiology*, 10(10), 1975–1986. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01181.x>
- Wan, F., Weaver, A., Gao, X., Bern, M., Hardwidge, P. R., & Lenardo, M. J. (2011). IKK β phosphorylation regulates RPS3 nuclear translocation and NF- κ B function during infection with *Escherichia coli* strain O157:H7. *Nature Immunology*, 12(4), 335–343. <https://doi.org/10.1038/ni.2007>
- WHO. (2017). *OMS | Diarrea*. WHO; World Health Organization.
- Wong, A. R. C., Pearson, J. S., Bright, M. D., Munera, D., Robinson, K. S., Lee, S. F., Frankel, G., & Hartland, E. L. (2011). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements: EHEC and EHEC T3SS effectors. *Molecular Microbiology*, 80(6), 1420–1438. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07661.x>

- Wu, B., Skarina, T., Yee, A., Jobin, M.-C., DiLeo, R., Semesi, A., Fares, C., Lemak, A., Coombes, B. K., Arrowsmith, C. H., Singer, A. U., & Savchenko, A. (2010). NleG type 3 effectors from enterohaemorrhagic *Escherichia coli* are U-box E3 ubiquitin ligases. *PLoS Pathogens*, 6(6), e1000960. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000960>
- Yen, H., Sugimoto, N., & Tobe, T. (2015). Enteropathogenic *Escherichia coli* uses NleA to inhibit NLRP3 inflammasome activation. *PLoS Pathogens*, 11(9), e1005121. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005121>
- Young, J. C., Clements, A., Lang, A. E., Garnett, J. A., Munera, D., Arbeloa, A., Pearson, J., Hartland, E. L., Matthews, S. J., Mousnier, A., Barry, D. J., Way, M., Schlosser, A., Aktories, K., & Frankel, G. (2014). The *Escherichia coli* effector EspJ blocks Src kinase activity via amidation and ADP ribosylation. *Nature Communications*, 5(1). <https://doi.org/10.1038/ncomms6887>