



INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS H-NS Y LER SOBRE LA REGIÓN REGULADORA Y ESTRUCTURAL DEL GEN *lpfA1* DEL OPERÓN LPF DE *E. coli* O157:H7

Rojas López M.¹, Martínez Laguna Y.^{1,2}, Martínez de la Peña C.², Torres A. G.³, Arenas-Hernández M. M. P.^{1,2}
Posgrado en Microbiología¹. Lab. Bioquímica y Genética Microbiana². Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas del ICUAP, BUAP. Apartado postal 1622. The University of Texas Medical Branch Galveston³. maarena@siu.buap.mx; altorres@utmb.edu

Palabras clave: LPF, H-NS, Ler

Introducción. *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 causa diarrea sanguinolenta y Síndrome Urémico Hemolítico (SUH). Se ha reportado que la fimbria polar larga 1 (LPF1) es uno de los factores de adherencia de EHEC a las células del epitelio intestinal y su producción está modulada por parámetros ambientales de tal manera que alcanza su máxima expresión a una temperatura de 37°C, pH 6.5, en medio de cultivo de tejidos con osmolaridad moderada y en fase de crecimiento tardía (1,2). Esta expresión es dependiente de dos promotores putativos (P1 y P2) dependientes de σ^{70} localizados río arriba de *lpfA1*, primer gen del operón *lpf1* (2,3). La producción y adherencia mediada por LPF1 también se encuentra bajo un estricto control transcripcional dependiente de la proteína H-NS, regulador global, que afecta en forma negativa a la región reguladora de *lpfA1* (*lpfA1p*) como un "silenciador" y de la proteína Ler, regulador específico que actúa como "anti-silenciador" en la expresión de los genes que codifican para la fimbria LPF1 de EHEC (3,4). Este estudio tuvo como objetivo determinar la región o regiones mínimas de interacción de H-NS y Ler dentro de *lpfA1p1* y *lpfA*.

Metodología. Se llevaron a cabo ensayos tipo EMSA, con concentraciones de 50 ng y 500 ng de DNA, de 7 diferentes fragmentos de *lpfA1p* y *lpfA1*, obtenidos por PCR, mezclados con 12.5 ng-200 ng de proteína purificada Ler-His₆ o H-NS-His₆. La mezcla de DNA-Proteína se corrió en geles PAGE al 6%. Se usaron como controles negativos la región estructural de *ler* y el gen RNA16S, y como control positivo la región reguladora del gen *ler*. Para la predicción de regiones curvadas de DNA, se usaron los programas DNASTAR (Lasergene), DNA Curvature Analysis by Christoph Gohlke (DNAGC) (<http://www.lfd.uci.edu/~gohlke/curve/>) y Cn3.

Resultados y discusión. La región mínima de interacción de *lpfA1p*_{271pb} descrita en estudios anteriores [3] posee 68% de A/T, corridas de A/T de hasta 19pb, y zonas de curvatura, esto nos sugirió que el mecanismo de regulación de silenciamiento y antisilenciamiento propuesta [3,5], puede estar ligada a regiones ricas en A/T adicionales y de curvatura. Se trabajaron con fragmentos internos de *lpfA1p* y de la región estructural de *lpfA1*, estos fragmentos internos a *lpfA1p* mantenían un porcentaje de A/T por arriba de 76.8%. A través del análisis de curvatura se observó que esta región *lpfA1*₂₇₁ presenta zonas de curvatura que coinciden con las corridas largas de A/T. Por medio de ensayos tipo EMSA

se localizaron dos Presuntas Zonas de Silenciamiento (PZS) de H-NS que se ubicaron en una región entre las coordenadas -197 pb a -53 pb (incluyendo a P1 y P2) dentro de *lpfA1p* (PZS1) y de 282 pb a 545pb río abajo del ATG (PZS2); también se delimitaron Zonas de Interacción Moderada (ZIM) de H-NS sobre una región de -54pb de *lpfA1p* a +9pb del gen *lpfA1*. Se observó que Ler interactúa sobre *lpfA1p* delimitando dos Presuntas Zonas de Anti-Silenciamiento (PZas) entre -197 y -167 pb antes del ATG (no incluye P1 o P2) (PZas1) y -54 pb y +9 pb (que solo incluye P1) (PZas2) ambas se sobreponen en PZS1. A diferencia de los fragmentos de *lpfA1p*, los fragmentos estructurales de *lpfA1*, que abarcan una región entre 24 pb y 545 pb río abajo el ATG, que tienen un bajo contenido de A/T (<52%) y aunque se sugería que no fueran zonas de pegado de H-NS, PZS2 se localiza en esta zona.

Conclusiones. En conjunto estos datos sugieren que: i) La regulación de la expresión de LPF1 de EHEC mediada por H-NS y Ler requiere de regiones ricas en A/T, altos índices de curvatura y/o curvaturas constantes. ii) Hay regiones dentro de *lpfA1p* y *lpfA1*, que son reconocidas por estas proteínas con diferente afinidad. iii) Existe una alta posibilidad de que el mecanismo de silenciamiento de H-NS sea a través de la formación de puentes y asas impidiendo el pegado de la RNAPol y así el proceso de la transcripción de *lpfA1*. iv) El mecanismo de antisilenciamiento de Ler podría involucrar un cambio en la topología del DNA al unirse a sitios únicos, impidiendo que H-NS se una a *lpfA1* y/o una competencia por los sitios de unión de H-NS a *lpfA1p*. Los mecanismos de antisilenciamiento de Ler no son mutuamente excluyentes [5]

Bibliografía. 1. Torres, A.G., J.A. Girón, N.T. Perna, V. Burland, F. R. Blattner, F. Avelino-Flores, J.B. Kaper. 2002. Infect. Immun. 70: 5416-5427. 2. Torres, A.G., L. Milflores-Flores, J.G. Garcia-Gallegos, S.D. Patel, A. Best, R.M. La Ragione, Y. Martinez-Laguna, M.J. Woodward. 2007. Int J Med Microbiol 297:177-85. 3. Torres, A.G., G.N. López-Sánchez, L. Milflores-Flores, S.D. Patel, M. Rojas-López, C.F. Martínez de la Peña, M.M.P. Arenas-Hernández, Y. Martínez-Laguna. 2007. J. Bacteriol. 189: 5916- 5928. 4. Torres A. G.; T. M. Slater; S. D. Patel; V. L. Popov and M. M. P. Arenas-Hernández. 2008. Contribution of the Ler- and H-NS-regulated Long Polar Fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 during binding to tissue cultured cells. Infect.Immun. Vol 76 (11): 5062-5071 5. Fang, C. F.; S. Rimsky. 2008. New insights into transcriptional regulation by H-NS. Current Opinion in Microbiology. 11:113-120