

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

ZARAGOZA

“Efecto de mutantes en las proteasas ClpXP y Lon de *Escherichia coli* enterohemorrágica sobre la motilidad y la adherencia a células Vero”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGA

PRESENTA

Mónica Monserrat Hernández Ávila

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Miguel Ángel De la Cruz Villegas

ASESOR DE TESIS

Dr. Rubén Marroquín Segura

México, D. F. Junio 2016





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



Este trabajo se realizó en el laboratorio de Microbiología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP) de la Unidad de Medicina de Alta Especialidad (UMAE) del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMNSXXI) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

*“...Aquel día aprendí que los sueños son solamente para hacerse realidad, desde aquel día ya no duermo para descansar, ahora simplemente duermo para soñar”*

*Walt Disney*

## AGRADECIMIENTOS

*A la Universidad Nacional Autónoma de México, por abrirme sus puertas desde el bachillerato, por todas y cada una de las oportunidades que me ha brindado desde entonces, ya que gracias a todas ellas podré servir a la sociedad y desempeñar con ética mi profesión. Me siento muy orgullosa y afortunada de pertenecer a la máxima casa de estudios del país.*

*A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, mi segundo hogar. Gracias por la excelente formación académica que me brindó a lo largo de 5 años, por enseñarme que 5 años te cambian en todos los sentidos y por mostrarme que sin ciertas personas no lo habría logrado. Jamás me arrepentiré de haberla elegido para realizar mi formación profesional.*

*Al Dr. Miguel Ángel de la Cruz Villegas, a quien estimo y respeto sinceramente, por haberme abierto las puertas de su laboratorio e integrarme a su equipo de trabajo, porque desde el primer día que estuve ahí, depositó en mí su confianza y me dio todas las herramientas para poder desarrollar este trabajo y por moldearlo día a día, por compartir conmigo un poco de lo mucho que sabe, por apoyarme y comprenderme, porque además de todo, lo considero una excelente persona y ser humano. Gracias por todo.*

*Al Dr. Rubén Marroquín Segura por haber aceptado ser mi asesor de tesis, por su amabilidad, su paciencia, sus consejos para mejorar mi trabajo y por el tiempo que dedicó a revisar este. Le agradezco además por sus excelentes clases de inmunología, por haber sido uno de los mejores profesores que me brindó la facultad y por su gran calidad humana, de corazón, gracias por todo.*

*A la M. en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez, por sus atinadas correcciones que sin duda elevaron la calidad de mi trabajo, por su amabilidad, paciencia y disposición, muchas gracias.*

*A la Q.F.B. Alicia Cabrera Aguilar y a la M. en C. Rosa Elba Galván Duarte, gracias a ambas por sus consejos y correcciones para mejorar mi trabajo, por el tiempo que dedicaron a la revisión del mismo, por su ayuda, amabilidad y asesoría. Gracias por formar parte de la culminación de mi carrera.*

*Al M. en C. Miguel Ángel Ares Jiménez. Gracias por día tras día compartir conmigo sus conocimientos, por sus consejos y enseñanzas que me hicieron mejorar en todos los sentidos; agradezco infinitamente su paciencia y buen trato conmigo, sé que además de ser excelente en lo que hace, es una magnífica persona a quien aprecio sinceramente.*

*A la Dra. Margarita Camorlinga Ponce, por otorgarme las células Vero, con las que pude realizar mi trabajo, gracias por la disposición que mostró en cada momento en que le solicité las mismas. Agradezco también a sus alumnos: Laura Hernández, Emmanuel Aguilar y Jorge Miguel; por el apoyo que me brindaron para que pudiera trabajar con las células.*

*A Judith Abundes, Graciela Pegueros y a mis compañeros de laboratorio: Laura Barrera, Isaac Badillo, Jesús Luna, Adriana Ramírez, Jannet Reyes y Jessica Martínez, gracias a cada uno de ustedes por hacer de mi estancia en el laboratorio algo agradable, por su bonita amistad, su compañerismo, por las pláticas, los momentos graciosos y por compartir conmigo todo este tiempo, en verdad los aprecio y les deseo lo mejor en cada paso que den por la vida en todos los sentidos*

*A todos y cada uno de mis profesores, por la excelente formación que me brindaron en cada etapa de mi vida escolar.*

***“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”***

## DEDICATORIAS

*A Dios, por haberme prestado vida y salud para llegar hasta este momento, porque desde que era muy chica me mostró mi vocación, por haber puesto en mi camino tantas maravillosas personas y oportunidades para que pudiera lograr este sueño; porque sólo él sabe cuánto valoro me haya permitido llegar hasta aquí.*

*A mis padres, Rosa Ávila y Sergio Hernández, a quienes amo con todo mi corazón. A ti mamá, gracias por darme más de lo que merezco, por apoyarme y alentarme siempre, has sido quien siempre ha creído en mí, incluso cuando muchas veces yo deje de hacerlo; por ser esa mano amiga que está ahí siempre que la necesito, por todo tu amor y tu confianza a lo largo de estos años y por siempre ser quien me entiende, escucha y guía. A ti papá, gracias por haber sido como fuiste conmigo, porque sin tu ayuda, tus regaños y tus consejos, yo jamás habría podido siquiera soñar con ser una profesionalista, gracias por hacer tuyo mi sueño, por dar cada paso conmigo, por confiar en mí, por el apoyo que me sigues brindando, por todos los sacrificios que tú y mi mamá han hecho para que mis hermanos y yo tengamos todo, gracias.*

*A mis hermanos, los mejores compañeros de vida que me ha dado Dios:*

*A ti Sergio, gracias por todos los momentos buenos y malos que hemos compartido, por todas las cosas graciosas que haces y dices que alegran mis días; por haberme prestado tu computadora para que pudiera escribir mi tesis. Sé que en unos años tú también serás un gran Q.F.B. y sabes que puedes contar conmigo toda la vida, ¡Te quiero mucho, mucho!*

*A ti Carlos, por ser tan noble y lindo conmigo, aunque a veces nos peleemos, sabes que te quiero muchísimo y que aquí estaré para ti siempre, así como tú lo estás para mí. Gracias por quererme y apoyarme, porque aunque todavía eres muy chico, siempre creíste en mí y me alentaste con tus palabras, espero ser un ejemplo para ti.*

*A mis abuelitos, Carmen Zamora y Benjamín Ávila. Han sido otros padres para mí, ¡los quiero tanto! Gracias por todo su amor, cariño y paciencia que a lo largo de toda mi vida me han regalado. Mi infancia fue maravillosa, y mucho de esto lo debo a ustedes.*

*Gracias por tantos hermosos momentos que hemos compartido, por el apoyo que me siguen brindando en todos los sentidos, porque sin importar las circunstancias siempre creen y confían en mí.*

*A mi abuelito, Filomeno Hernández Morales, gracias por el apoyo que me brindó, por sus consejos cargados de un gran sentido del humor, por el cariño y los momentos que hemos podido compartir, aprecio cada uno de ellos. ¡Lo quiero!*

*A mi hija Sarah Naomi, mi pequeña gran compañera. A ti princesa gracias por ser el gran motor de mi vida, desde que llegaste soy más feliz. Gracias por hacer de mí una mejor persona; tu presencia en mi vida me impulsó a querer ser mejor, me motivó aún más a terminar. Gracias porque cada noche en que yo escribía mi tesis, tú me acompañaste. Aunque aún eres muy pequeña, espero algún día te sientas orgullosa de mí, y quiero que sepas que en el mundo no hay mayor título para mí, que el poder ser llamada tu madre. ¡Te amo!*

*A ti mi pequeñito (a) aún no llegas y ya te amo con locura.*

*A mis tíos: Guadalupe, Benjamín y Eduardo Ávila, así como también a mis tías Maribel Vargas y Angélica Valentín, por el apoyo que cada uno me ha brindado a lo largo de mi vida, de diferentes maneras y en diferentes momentos, pero agradezco de todo corazón por todo ello y por su cariño, que saben es reciproco.*

*Al resto de mi familia, gracias también por compartir un pedacito de cada uno de ustedes conmigo, por hacer de cada momento de mi vida algo memorable.*

*A ti Cristian Arce, gracias por tu tiempo, apoyo y paciencia; por ser mi amigo, mi compañero de equipo y de vida en esta etapa. Gracias por los momentos buenos y malos, ya que de todos ellos he aprendido algo. No me arrepiento de nada de lo que he vivido contigo; gracias por todo, pero sobre todo por el regalo más hermoso que nos ha dado Dios y que tendremos la dicha de compartir toda la vida. ¡tqm!*



*A Betzabé Lucio, por los favores tan grandes que me has hecho, sobre todo por dejarme escribir en tu computadora mi protocolo de tesis. Gracias por querer tanto a mi hija; sabes que puedes contar conmigo si me necesitas. Deseo en unos años verte convertida en toda una Q.F.B.*

*A mi segunda familia, mis maravillosos amigos:*

*Gabriela Vázquez, Laura Aceves, Elena Matías, Itzel Morales, Elizabeth Gutiérrez y Zuleyca Torres, a ustedes por su gran amistad desde el CCH, porque han compartido conmigo buenos y malos momentos, aunque los años pasan y ahora somos un poco más mayores y con otras responsabilidades, ustedes siguen en mi vida y eso no tengo como pagarlo. Gracias por sus consejos, su cariño, su paciencia conmigo, por quererme y soportarme tantos años, por su confianza, apoyo y lealtad. ¡Las quiero muchísimo!*

*A Jazmín Camacho, Abihú Martínez, Esperanza Olivares, Itzel Gámez, Daniela Pantoja, Paula Merino, Casandra Vergara, Sandra Castillo y Esteffy Rosales. En ustedes encontré en la FES una verdadera amistad, hemos pasado por muchas cosas, unas buenas y otras malas, pero de alguna manera siguen presentes en mi vida. Gracias por haberme soportado tantos y tantos semestres y seguirme aguantando, por tantas risas que me han regalado todo este tiempo, por su seriedad cuando ha sido necesaria, por ser tan buenos conmigo, por sus consejos, su ayuda, su apoyo, su cariño y su gran e invaluable amistad. ¡Los quiero de verdad!*

*Para ti también Iron ¡Te quiero!*

*A la memoria de: Elvira Bravo, Héctor Hernández y Mónica Méndez Toledo, quienes aún viven en mi corazón.*

***“Gracias a todos y cada uno de ustedes, por haberme acompañado durante todo este tiempo, sin su presencia en mi vida, esto jamás habría sido lo mismo. Cada momento que hemos compartido lo guardo como un tesoro en mi corazón ¡Los quiero a todos!”***

## ÍNDICE

1. Introducción.....	1
2. Marco teórico.....	2
2.1 Enterobacterias.....	2
2.2 <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ).....	4
2.2.1 Cuadros clínicos.....	5
2.2.2 Patotipos.....	6
2.3 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC).....	11
2.3.1 Factores de virulencia de EHEC.....	14
2.3.1.1 Isla de Patogenicidad LEE.....	14
2.3.1.2 Toxina Shiga (Stx).....	20
2.4 Motilidad bacteriana.....	21
2.5 Proteosoma.....	24
2.5.1 Proteasas en <i>E. coli</i> .....	25
2.5.1.1 Proteasa ClpXP.....	25
2.5.1.2 Proteasa Lon.....	26
3. Planteamiento del problema.....	29
4. Hipótesis.....	30
5. Objetivos.....	31
5.1 Objetivo General.....	31
5.2 Objetivo Particular.....	31
6. Diseño Experimental.....	32

6.1 Tipo de estudio.....	32
6.2 Población de Estudio.....	32
6.3 Criterios de Inclusión.....	32
6.4 Criterios de Exclusión.....	32
6.5 Criterios de Eliminación.....	32
6.6 Variables.....	32
6.7 Material y métodos.....	33
6.8 Diagrama de Flujo.....	46
7. Resultados.....	47
8. Análisis de Resultados.....	53
9. Conclusiones.....	57
10. Perspectivas.....	58
11. Referencias.....	59

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Estructura del género *Enterobacteriaceae*.

**Figura 2.** Contribución de los elementos móviles genéticos a la evolución de *E. coli* patogénicas.

**Figura 3.** Esquema patogénico de las *E. coli* diarreogénicas.

**Figura 4.** Resumen de la infección por EHEC.

**Figura 5.** Modelo de una isla de patogenicidad bacteriana.

**Figura 6.** Diagrama ilustrativo de la organización genética de LEE.

**Figura 7.** Regulación central de la isla LEE.

**Figura 8.** Estructura del SST3.

**Figura 9.** Partes y fijación de un flagelo de una bacteria gramnegativa.

**Figura 10.** Modelo esquemático del flagelo externo de *E. coli*.

**Figura 11.** Generación de mutantes por el método de interrupción por un solo paso.

**Figura 12.** Caracterización de las mutantes por PCR.

**Figura 13.** Cinética de crecimiento en medio LB.

**Figura 14.** Cinética de crecimiento en medio DMEM high glucose.

**Figura 15.** Adherencia de las cepas mutantes.

**Figura 16.** Motilidad bacteriana.

## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
A/E	Adherencia y borrado
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Trifosfato de Adenosina
Aw	Actividad de agua
CH	Colitis Hemorrágica
Cm	Cloranfenicol
DA	Adherencia difusa
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difusoadherente
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DO	Densidad óptica
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
Gb3	Globotriasoceramida
GrIA	Regulador global de la activación <i>ler</i>
GrIR	Regulador global de la represión <i>ler</i>
HGT	Transferencia horizontal de genes

IC	Índice competitivo
IM	Membrana bacteriana interna
Km	Kanamicina
LB	Luria Bertani
Ler	Regulador maestro Ler
LEE	Locus de eliminación de enterocitos
LPS	Lipopolisacáridos
LT	Toxina lábil al calor
MNEC	<i>Escherichia coli</i> asociada a meningitis/sepsis
NCs	Complejos de aguja
nm	Nanometros
OM	Membrana bacteriana externa
ORFs	Marcos de lectura abierta
PAIs	Islas de patogenicidad
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la Polimerasa
PGN	Peptidoglicano
rRNA	Ácido ribonucleico ribosomal
SST3	Sistema de Secreción Tipo 3
SNC	Sistema Nervioso Central
ST	Toxina estable al calor
Stx	Toxina Shiga

SUH	Síndrome Urémico Hemolítico
TAE	Solución que contiene Tris, acetato y EDTA.
Tir	Receptor translocado de intimina
Tn	Transposones
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogénica
UV	Ultravioleta
Wt	Wild type

## **1. INTRODUCCIÓN**

*Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) es uno de los patotipos de *E. coli* que son capaces de colonizar el tracto gastrointestinal. Las cepas de EHEC son muy frecuentes en enfermedades gastrointestinales en países desarrollados, y en vías de desarrollo, la infección por este patógeno puede conducir a una enfermedad potencialmente mortal, el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), una tríada de manifestaciones clínicas, que incluyen anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal y otros problemas sistémicos como el deterioro del Sistema Nervioso Central (SNC).

EHEC presenta diversos factores de virulencia, dentro de los cuales, existen dos absolutamente primordiales: el Sistema de Secreción Tipo III (SST3) y la toxina Shiga (Stx); sin embargo además de lo anterior, existen otros componentes que regulan la virulencia de la bacteria, tal es el caso de las proteasas bacterianas. El sistema de proteosoma bacteriano de EHEC está compuesto de diversas proteasas, dentro de las cuales destacan principalmente dos dependientes de ATP: ClpXP y Lon. Diversas investigaciones tanto en *E. coli*, como en otras bacterias, sugieren que la presencia de estas proteasas, está involucrada en la patogenicidad de EHEC al actuar sobre reguladores específicos de la virulencia bacteriana, modificando así, la capacidad de infectar al huésped. Este estudio tuvo como principal propósito analizar el papel de estas dos proteasas sobre dos características importantes para la patogenicidad de EHEC: la adherencia y la motilidad, por medio del análisis de mutantes en ClpXP y Lon, y de este modo también, poder compararlas con la cepa silvestre de EHEC O157:H7, para finalmente abrir un panorama más amplio sobre el papel de las mismas en la patogenicidad de esta bacteria.



## **2. MARCO TEORICO**

### **2.1 Enterobacterias**

La familia *Enterobacteriaceae* constituye un grupo grande y heterogéneo de bacterias gramnegativas, se encuentran como saprofitos en el intestino del hombre, el cual es su hábitat natural; se encuentran además en el suelo, el agua, la vegetación, así como también en la flora intestinal de muchos animales. Esta familia está formada por bacilos gramnegativos de 1.0 a 6.0  $\mu\text{m}$ , algunos poseen movilidad por flagelos peritricos, son aerobios y anaerobios facultativos, muchos de ellos forman cápsula, la mayoría producen fimbrias y pilis, ninguno fabrica esporas, son fermentadores de glucosa con producción de ácido y algunos también con producción de gas. Todos son oxidasa negativos, algunos reducen los nitratos a nitritos y son catalasa positiva. Entre 25 y 30 especies son clínicamente significativas. <sup>1, 2</sup>

Su envoltura celular se caracteriza por una estructura multilaminar. La membrana interna (o citoplasmática) consiste en una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. La capa siguiente, consiste en un peptidoglicano delgado junto con un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas. La membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS) (en la parte más externa, son un importante factor de virulencia de estas bacterias), lipoproteínas (que están fijadas al peptidoglicano), proteínas porinas multiméricas (que facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos betalactámicos) y otras proteínas de la membrana externa. Entre estas proteínas hay algunos organelos complejos que irradian hacia el

exterior: los flagelos, estructuras que se utilizan para la locomoción y que provienen de una estructura basal localizada en la membrana interna; las fimbrias que son apéndices pilosos más cortos, rectos y delgados, oscilan entre los 2-4 nm de diámetro, están compuestas por una proteína llamada pilina y tienen una importante función como adhesina; y los pilis sexuales, estructuras presentes en las bacterias que contienen plásmidos conjugativos y que las bacterias utilizan para mediar la transferencia conjugativa de ADN del plásmido. En la Figura 1, se puede identificar la estructura general de las enterobacterias, en esta podemos ubicar su flagelo, la pared celular, la membrana citoplasmática, los pilis, así como otros componentes fundamentales propios del género *Enterobacteriaceae*.<sup>2,3</sup>

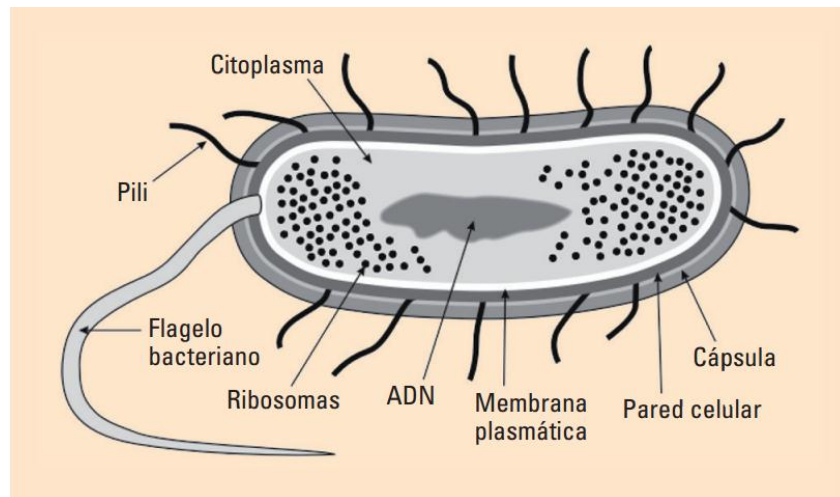


Figura 1. Estructura del género *Enterobacteriaceae*.<sup>2</sup>

En las enterobacterias podemos distinguir los antígenos O, que se encuentran en la pared de la bacteria, estos en su mayoría son polisacáridos, o bien, proteínas. Los antígenos H son de naturaleza proteica y se encuentran en los flagelos de las bacterias que poseen

estos organelos; y los antígenos K que se encuentran en la cápsula de aquellas bacterias que pueden formar macrocápsula, microcápsula o cápsula mucilaginosa, generalmente estos antígenos están formados por polisacáridos. <sup>1</sup>

## **2.2 *Escherichia coli* (*E. coli*)**

El miembro más representativo de la familia *Enterobacteriaceae* es *Escherichia coli* (*E. coli*). *E. coli* es la bacteria predominante de la flora bacteriana del colón humano. El organismo típicamente coloniza el tracto gastrointestinal del niño dentro de las primeras horas de vida y, después de esto, se establece un beneficio mutuo para el hospedero y la bacteria; sin embargo, *E. coli* también posee la capacidad de causar una amplia variedad de enfermedades, tanto gastrointestinales como extraintestinales; esto debido a su capacidad de ser un patógeno altamente diverso y adaptado. <sup>1, 4, 5</sup>

Theodor Escherich fue el primero en reportar el aislamiento y caracterización de *E. coli*, de las heces de niños, que inicialmente nombró *Bacterium coli commune* en 1885; pero no fue sino hasta 1954 que el nombre de *E. coli* fue totalmente reconocido, desde luego en honor a su descubridor. <sup>5, 6</sup>

Este bacilo gramnegativo, posee una sola cadena espiral de ADN, es oxidasa negativo, móvil con flagelos peritricos y es capaz de crecer tanto aeróbica como anaeróticamente, preferentemente a 37°C. La mayoría produce fimbrias y pilis, muchas cepas producen microcápsula, muy pocas elaboran macrocápsula, y no producen esporas. En las pruebas bioquímicas es positiva al indol, lisina descarboxilasa, realiza fermentación partir de glucosa; además es lactosa positiva. Se aísla fácilmente a partir de muestras fecales en medios selectivos. El cambio en el pH debido a la fermentación de la lactosa se puede

utilizar para diferenciar entre las cepas fermentadoras de lactosa y las que no lo son. Las colonias positivas a la fermentación de la lactosa en medios tales como agar MacConkey son rojas o rosadas. <sup>1, 7</sup>

Tiene información genética en los plásmidos, que son los responsables por la producción de toxinas y la resistencia a los antimicrobianos. El genoma de *E. coli* contiene alrededor de 4500 genes. <sup>1</sup>

### **2.2.1 Cuadros clínicos**

A pesar de ser una bacteria de la flora intestinal humana, hay cepas patógenas para el ser humano, incluso en huéspedes débiles o inmunosuprimidos, algunas cepas no patógenas puede llegar a causar infecciones. Las infecciones debidas a *E. coli* pueden limitarse a las mucosas o pueden diseminarse a través del cuerpo. Al colonizar tejidos extraintestinales *E. coli* produce procesos inflamatorios piógenos similares a otras bacterias, y en ocasiones, de mayor intensidad; además es una de las bacterias que más produce infecciones en heridas dentro de los hospitales. Puede infectar las vías respiratorias y meninges, como consecuencia de una invasión a circulación sanguínea; las septicemias por *E. coli* son muy preocupantes por la gravedad de su pronóstico. Se puede instalar en hígado, vías respiratorias u otros órganos; y cuando hay una perforación intestinal, son responsables de la peritonitis consecutiva a esta lesión. Se estima que las infecciones en vías urinarias son producidas por *E. coli* en más del 70% de los casos. <sup>1, 4, 7, 8</sup>

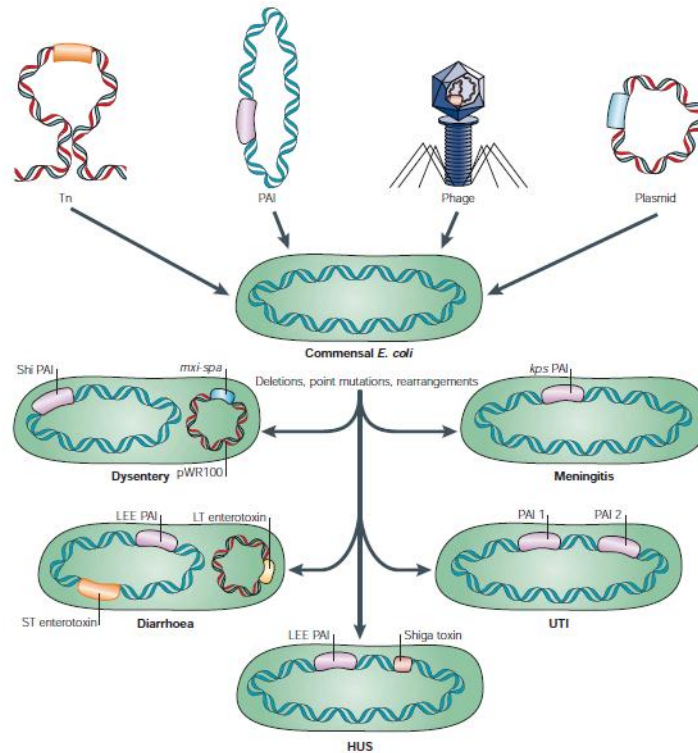
Son 3 los síndromes generales resultado de la infección con cepas patógenas de *E. coli*:

1. Infecciones en las vías urinarias.
2. Sepsis/Meningitis.
3. Enfermedades diarreicas/entéricas.

### **2.2.2 Patotipos**

Hay varios clones altamente adaptados de *E. coli* que han adquirido atributos de virulencia específicos, lo que les confiere una mayor capacidad de adaptación a nuevos nichos, permitiéndoles producir un amplio espectro de enfermedad, esto gracias a la pérdida y ganancia de genes. Estos atributos de virulencia se codifican con frecuencia en elementos genéticos que pueden movilizarse en diferentes cepas para crear nuevas combinaciones de factores de virulencia. Sólo las combinaciones más exitosas de los factores de virulencia han persistido para convertirse en "patotipos" específicos de *E. coli* que son capaces de causar enfermedad en personas sanas. <sup>5</sup>

El ADN puede movilizarse a través de mecanismos como la conjugación, la transformación y la transducción, codificado por elementos móviles genéticos, tales como transposones, islas de patogenicidad, fagos y plásmidos, dando así lugar a la transferencia horizontal de genes (HGT), confiriéndoles de este modo, los ya mencionados factores de virulencia y otorgándoles diferentes fenotipos. La Figura 2 nos representa de manera más fácil, este proceso donde a partir de una cepa comensal de *E. coli*, se generan nuevos patotipos de la bacteria, por medio de la movilización de ADN.



**Figura 2. Contribución de los elementos móviles genéticos a la evolución de *E. coli* patogénicas.** Los factores de virulencia de *E. coli* pueden ser codificados por diversos elementos móviles genéticos, tales como, transposones (Tn), plásmidos, bacteriófagos e islas de patogenicidad (PAIs). Se ha propuesto que a partir de una *E. coli* comensal se han originado varios patotipos debido a la adquisición de factores de virulencia por transferencia horizontal codificados por estos elementos móviles.<sup>4</sup>

Estas cepas patogénicas de *E. coli* poseen factores específicos de adherencia que les permite colonizar sitios que la bacteria normalmente no habita, por ejemplo el intestino delgado o la uretra. Con mayor frecuencia estas adhesinas forman estructuras morfológicas distintas llamadas fimbrias (mencionadas anteriormente). Las adhesinas de estas cepas patogénicas de *E. coli* pueden también incluir otras proteínas de membrana, como la intimina u otras no fimbriales.<sup>4, 5</sup>

Hay categorías bien descritas de patotipos de *E. coli*:

- a) *E. coli* enteropatógena (EPEC): este patotipo se caracteriza por presentar un patrón de adherencia localizada a células HEp-2, asociada a la presencia de un plásmido. Es una de las principales causas de diarreas en particular en niños de seis meses hasta los dos años de edad. El cuadro clínico se manifiesta con una diarrea aguda de leve a grave, con vómito y fiebre. EPEC produce una lesión llamada A/E (de adherencia y borrado), ésta induce una alteración en las microvellosidades intestinales.<sup>9, 10</sup>
- b) *E. coli* enterotoxigénica (ETEC): es un patógeno que se transmite por agua y alimentos contaminados, infectando el intestino delgado humano provocando diarrea. ETEC se adhiere al epitelio por medio de factores de colonización y secreta dos enterotoxinas, la toxina lábil al calor (LT) y/o la toxina estable al calor (ST). ETEC es un organismo versátil capaz de sobrevivir y crecer en diferentes entornos.<sup>11</sup>
- c) *E. coli* enteroagregativa (EAEC): esta bacteria presenta un patrón de adherencia agregativo a células HEp-2 en cultivo. Esta adherencia se caracteriza por la formación de agregados bacterianos, con apariencia de ladrillos apilados (stacked brick), la cual está mediada por fimbrias. Es también una causa frecuente de diarrea del viajero y de diarrea crónica en países en vías de desarrollo.<sup>9</sup>
- d) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC): provoca infecciones en la mucosa del colón, inicia con una diarrea acuosa, que posteriormente progresa a diarrea con sangre y moco. Esta cepa está relacionada más con brotes que con casos aislados, en los

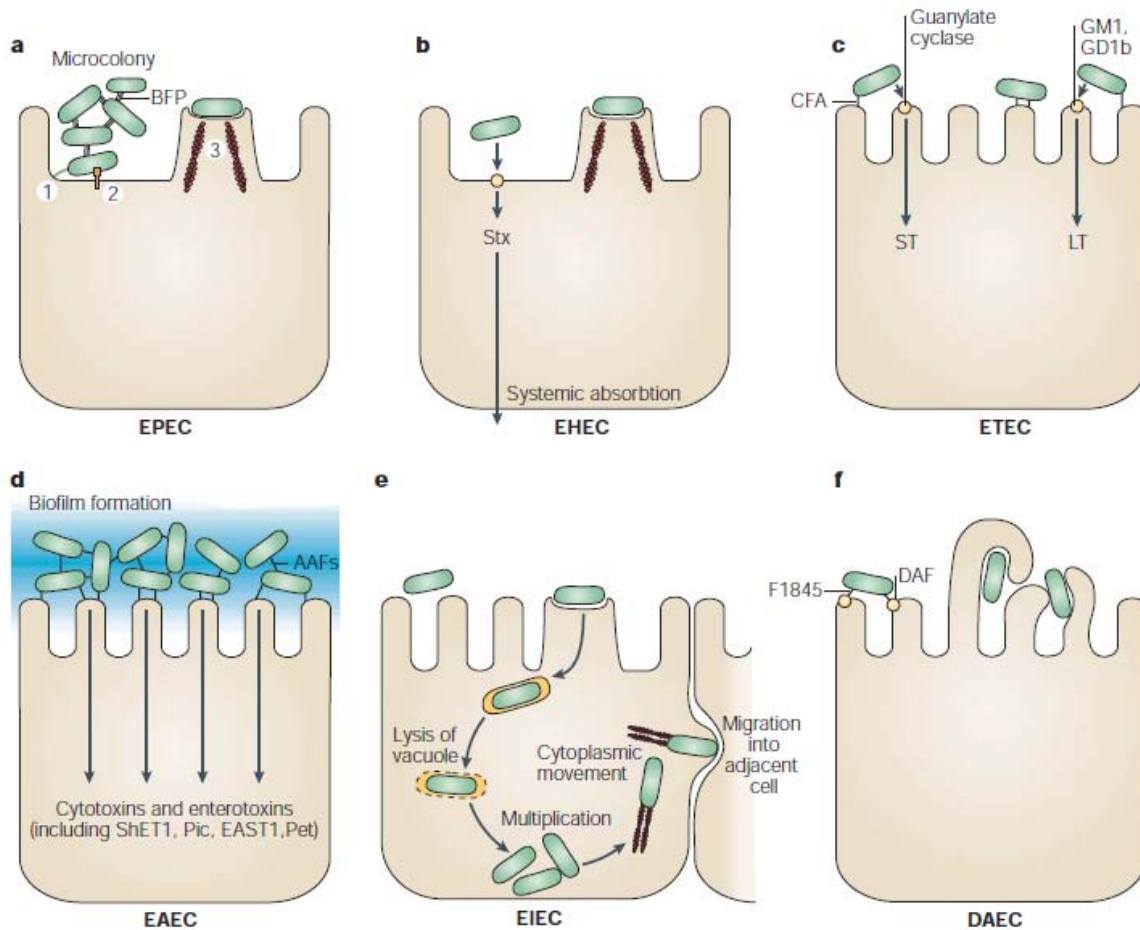
cuales el medio de transmisión puede ser por ingestión de alimentos y agua contaminados.<sup>9, 12</sup>

- e) *E. coli* difusoadherente (DAEC): este patotipo de *E. coli* describe a las cepas diarreógenicas que se adhieren a las células pero que no caen en los patrones comunes de adherencia, como la lesión localizada A/E. DAEC ha sido clásicamente definido por su adherencia difusa (DA) a células epiteliales cultivadas HEp-2, donde se produce la adherencia bacteriana sobre toda la superficie de la célula en un patrón disperso.<sup>5</sup>
- f) *E. coli* uropatogénica (UPEC): es el agente bacteriano predominante responsable de hasta el 50% y el 75-95% de las infecciones urinarias nosocomiales y adquirida en la comunidad, respectivamente. Este patotipo causa una variedad de efectos nocivos, incluyendo la morbilidad, aumento de los costos de la asistencia sanitaria, e incluso mortalidad.<sup>13</sup>
- g) *E. coli* asociada a meningitis/sepsis (MNEC): tienen la capacidad de sobrevivir en la sangre e invadir meninges de los lactantes para causar meningitis. *E. coli* asociada a la meningitis neonatal es una de las infecciones más comunes que poseen una alta mortalidad y morbilidad (10-30%) durante el período neonatal.<sup>14</sup>
- h) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC): es el patotipo causante de la diarrea aguda y sanguinolenta, así como la colitis hemorrágica (HC) y el síndrome urémico hemorrágica (SUH).<sup>15</sup>

En la Figura 3 se esquematiza de manera general, la patogénesis de los patotipos diarreogénicos de *E. coli*, en esta podemos diferenciar la manera en el que cada uno desencadena el proceso patogénico, con su célula diana correspondiente. La



patogénesis de MNEC y UPEC no se encuentra aún del todo bien descrita, es por ello que no están esquematizadas en la figura.



**Figura 3. Esquema patológico de las *E. coli* diarrogénicas.** Las seis categorías reconocidas de *E. coli* diarrogénicas tienen cada una características únicas en su interacción con las células eucariotas. Aquí, la interacción de cada patotipo con una célula diana típica es esquemáticamente representada. <sup>4</sup>

### 2.3 *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

*Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) es uno de los miembros del grupo de *E. coli* patogénicas que son capaces de colonizar el tracto gastrointestinal. Las cepas de EHEC son de las más frecuentes en enfermedades gastrointestinales en los países desarrollados, y en vías de desarrollo. Sin embargo no se conoció la importancia de este patotipo hasta 1982, cuando se le relacionó al serotipo O157:H7 con un brote de enfermedad en Estados Unidos debido a la carne mal cocida de hamburguesas de una cadena de comida rápida, de este modo el microorganismo fue asociado con dos trastornos cuya etiología se desconocía hasta ese momento: la colitis hemorrágica (CH) y el Síndrome Urémico Hemolítico (SUH); aunque la infección debida a este microorganismo tanto en humanos como en animales puede remontarse a los años 70's. *E. coli* O157:H7 fue el primero de los serotipos productores de la toxina Shiga, del que se supo producía enfermedad humana; se denomina así porque expresa el antígeno somático (O) 157 identificado y el séptimo antígeno flagelar (H). La prevalencia de este patógeno ha crecido desde su primera descripción y a pesar de los esfuerzos por tener mejores medidas de control, permanece como un problema de salud grave.<sup>16, 17</sup>

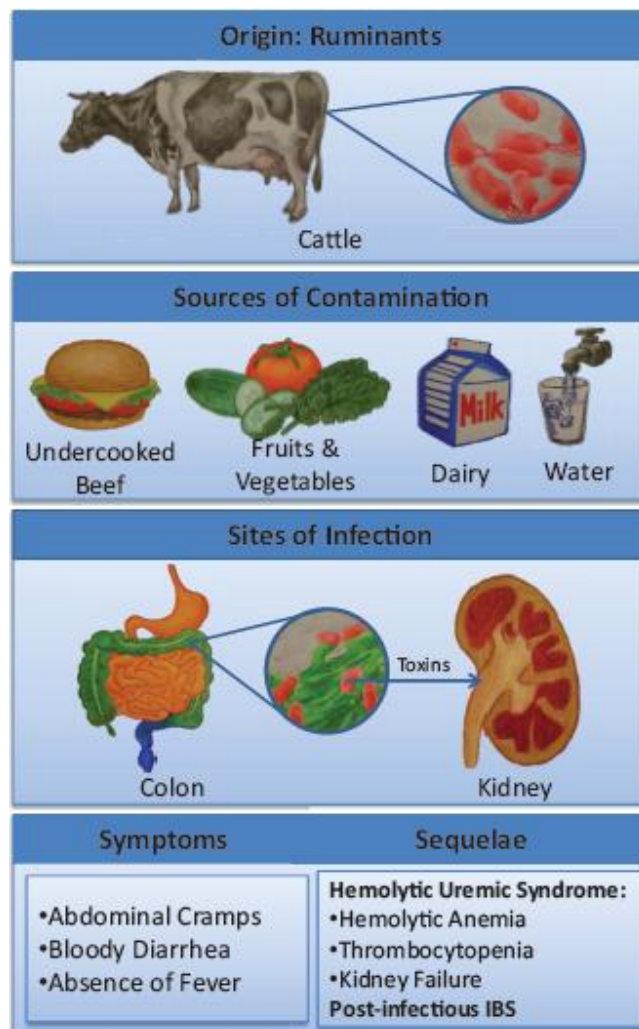
La transmisión de EHEC es fecal-oral y la dosis infecciosa es muy baja. Los rumiantes como el ganado vacuno son su principal reservorio, y la exposición a la materia fecal representa una fuente importante de enfermedad humana. EHEC también se ha aislado de otros animales, que incluye a los cerdos, ovejas, ciervos, jabalíes, conejos, pájaros, perros, roedores e insectos. La carne y los productos lácteos a menudo se contaminan y sirven como fuente de infección en brotes de

este patógeno. Se han descrito muchos vehículos para la transmisión por medio de los alimentos, incluyendo la carne de res (carne molida, carne asada, bisteck, el salami, etc.), productos como la sidra de manzana sin pasteurizar o el jugo, el melón, las uvas, la lechuga, las coles, las judías, las espinacas, etc., y productos lácteos (leche cruda, queso, mantequilla, etc.); la transmisión persona-persona y a través del agua también han sido reportadas. Además de la dosis baja, la capacidad de EHEC para crecer en un amplio rango de temperatura y de sobrevivir tanto a la congelación como a condiciones ácidas, facilita la infección. EHEC puede crecer entre 7°C y 50°C, con una temperatura óptima de 37°C; y respecto al pH, puede crecer hasta en un pH de 4.4, y en alimentos con actividad de agua (Aw) mínima de 0.95. Se destruye cocinando alimentos hasta que todas las partes alcancen una temperatura de 70°C o más.<sup>5, 17, 18</sup>

Muchos de los individuos afectados permanecen asintomáticos, sin embargo otros presentan calambres abdominales y diarrea, que puede progresar a diarrea sanguinolenta (colitis hemorrágica). También puede haber fiebre y vómitos. El periodo de incubación varía entre tres y ocho días, con una mediana de tres a cuatro días. La mayoría de los pacientes se recuperan en el término de diez días, pero en algunos casos (sobre todo en niños y ancianos) la infección puede conducir al SUH una enfermedad potencialmente mortal, que es una tríada de manifestaciones clínicas, que incluyen anemia hemolítica, trombocitopenia y falla renal y otros problemas sistémicos como el deterioro del Sistema Nervioso Central (SNC). A pesar de la importancia de EHEC como agente infeccioso y del incremento en las tasas de infección, aún no hay tratamiento para combatir la enfermedad. En general,

la terapia con antibióticos está contraindicada, ya que pueden promover la expresión de la toxina del fago lisogenado que típicamente tiene los genes Stx.<sup>17, 19</sup>

En la Figura 4, se esquematiza de manera sencilla el reservorio de EHEC, los potenciales vehículos de transmisión de la bacteria, los sitios donde coloniza y produce la infección, así como sus síntomas y consecuencias.



**Figura 4. Resumen de la infección por EHEC.** Incluye la fuente de la infección, las rutas potenciales de contaminación humana, los sitios de infección, los principales síntomas y complicaciones a corto plazo.<sup>19</sup>  
\*Síndrome del intestino irritable (IBS por sus siglas en inglés)

### **2.3.1 Factores de Virulencia de EHEC**

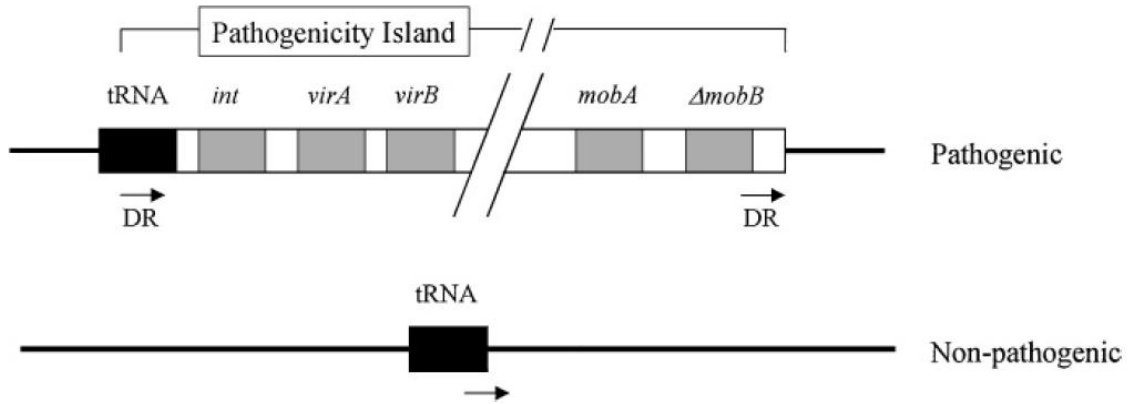
La patogénesis de EHEC O157:H7 se atribuye a los efectos de múltiples determinantes de virulencia, incluyendo la toxina Shiga, la isla de patogenicidad LEE y el plásmido pO157, entre otros. <sup>19</sup>

#### **2.3.1.1 Isla de Patogenicidad LEE**

Los genomas microbianos consisten principalmente en secuencias básicas, que codifican para funciones específicas, estas secuencias centrales incluyen genes ribosomales de ARN específicos y los genes que codifican proteínas metabólicas clave, tales como ATPasas. Además del núcleo del genoma, fueron descubiertas secuencias que difieren del resto del genoma en su contenido y que se han adquirido a través de la HGT. Por ejemplo, la cantidad total de ADN horizontalmente transferida en la *E.coli* K-12 se ha calculado que es de aproximadamente 17%. Estas regiones, que han sido designados islas genómicas, codifican para funciones accesorias tales como actividades adicionales metabólicas, resistencia a antibióticos, o propiedades que intervienen en la aptitud microbiana, simbiosis, o patogénesis. <sup>20</sup>

Las islas de patogenicidad (PAIs) en *E. coli* patógena fueron las primeras en ser descritas. Pronto se descubrió que las bacterias patógenas de las especies distintas de *E. coli*, tanto grampositivas como gramnegativas, contienen en sus genomas segmentos de ADN que comparten entre sí muchas características. Las PAIs poseen la mayoría, si no todas, genes que codifican uno o más factores de virulencia

y ocupan regiones genómicas relativamente grandes, cubriendo regiones de ADN de  $\geq 10$ -200 kb. El modelo general de una PAI, se observa en la Figura 5. <sup>20</sup>

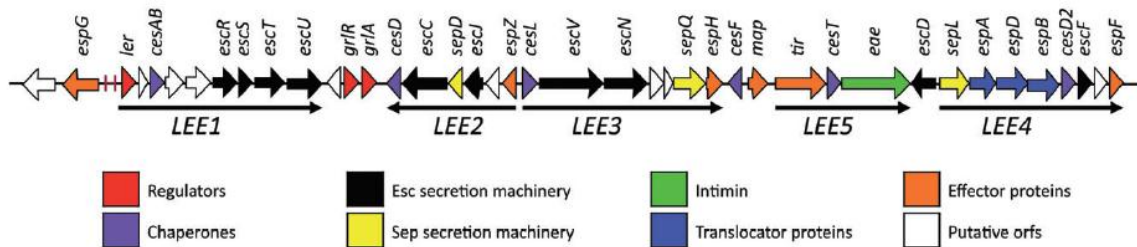


**Figura 5. Modelo de una isla de patogenicidad bacteriana.** La línea delgada en color negro representa las regiones del núcleo del genoma; el cuadro representa los genes y las flechas indican la presencia de repeticiones directas en los extremos de la isla de patogenicidad. <sup>20</sup>

Son muchos los patógenos bacterianos que poseen una isla de patogenicidad. EPEC, EHEC, *Citrobacter rodentium*, y *Escherichia albertii* tienen algo en común, todos estos patógenos tienen insertada en su genoma una PAI (Pathogenicity Islands, por sus siglas en inglés), llamada Locus de eliminación de enterocitos (LEE, por sus siglas en inglés). LEE es una isla de patogenicidad de 35.6 kb que posee los genes responsables de causar unas lesiones específicas llamadas de adhesión/borrado (A/E, por sus siglas en inglés); esta es una lesión característica que implica la adherencia íntima de las bacterias a los enterocitos, y que mediante una compleja cascada de señalización conduce a la destrucción de las microvellosidades de los enterocitos, y la pérdida de iones, lo que ocasiona diarrea severa. <sup>21, 22</sup>

La isla LEE se compone de 41 marcos de lectura abierta (ORFs) y cinco operones principales que codifican los genes para un sistema de secreción tipo 3 (SST3), proteínas secretadas, una adhesina llamada intimina, y su receptor llamado receptor translocado de intimina (Tir). LEE se somete a diferentes niveles de regulación, incluyendo los reguladores transcripcionales y posttranscripcionales, localizados ambos tanto fuera como dentro de la isla de patogenicidad.<sup>20, 23</sup>

Los 41 ORFs se organizan dentro de 5 operones principales de LEE, se enumeran del LEE1 al LEE5, como se aprecia en la Figura 6, estos presentan diversas funciones específicas. Los operones LEE1, LEE2 y LEE3 codifican los componentes del SST3; LEE4 codifica para la proteína EspA, el monómero que se polimeriza para formar el filamento necesario para la formación de la aguja que sirve para inyección de moléculas efectoras dentro del citoplasma de la célula huésped; EspB y EspD, que forman un poro en la membrana de la célula huésped; todas estas proteínas se les denomina con el nombre proteínas Esp. Finalmente LEE5 codifica la intimina y su receptor Tir, necesario para la unión con las células del epitelio intestinal.<sup>24, 25</sup>



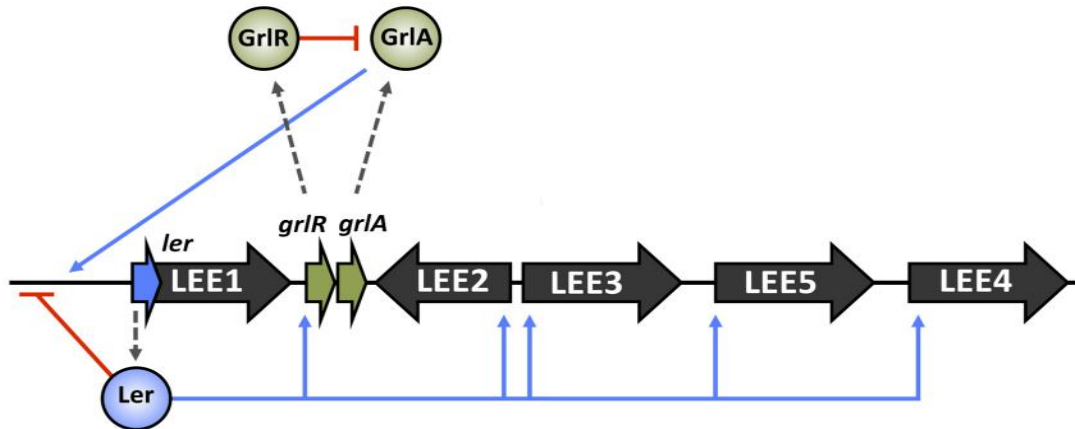
**Figura 6. Diagrama ilustrativo de la organización genética de LEE.** Se muestran los 5 operones principales de LEE y las proteínas, efectores, chaperones, etc, para los cuáles codifica cada uno.<sup>25</sup>

LEE es controlada a través de complicadas cascadas regulatorias que involucran la interacción entre bacterias, huésped y factores ambientales y la regulación de la expresión de genes de LEE es compleja, depende de las condiciones ambientales y diversos reguladores. Ler es el principal regulador de la isla de patogenicidad LEE, es una proteína de ~ 15 kDa y un activador de los operones de la misma. La importancia de Ler para la virulencia se demostró por medio de un mutante de delección en EHEC cepa 86-24; esta mutante se veía afectada en su capacidad de secretar efectores y formar las lesiones A/E en las células huésped, además de que había falla en la secreción de proteínas tipo 3, de ahí la importancia de Ler en la expresión de los factores de virulencia. Se ha identificado además un regulador positivo de la expresión *ler*, llamado GrIA (regulador global de la activación *ler*), y un represor negativo de *ler*, GrIR (regulador global de la represión *ler*). GrIA desempeña un papel clave en la regulación de *ler* y por lo tanto en la expresión de genes LEE. En mutantes en *grIA* se observó que la transcripción de LEE1, LEE2 y LEE5 fue disminuida y en mutantes en *grIR* la transcripción de LEE1 fue levemente elevada, lo que sugiere un papel como activador y represor de los genes de transcripción de LEE para GrIA y GrIR respectivamente. GrIA forma una realimentación positiva con Ler para mantener la activación constante de la LEE bajo condiciones positivas, mientras que GrIR fue postulado como el inhibidor de la activación de *ler* mediada por GrIA, con el fin de controlar estrechamente la expresión LEE; esta compleja regulación se aprecia mejor en la Figura 7. <sup>21, 26</sup>

Recientemente, la estructuración de GrIR y un complejo GrIR/GrIA ha sido resuelta y se ha propuesto un mecanismo de regulación de Ler por este sistema. GrIR forma



una estructura dimérica que se une a GrIA, y así estabiliza e inhibe la activación de la transcripción del operón LEE1. Esto complementa otros hallazgos que sugieren que bajo ciertas condiciones, que favorecen la expresión LEE, GrIR se escinde por la proteasa ClpXP, liberando GrIA y permitiendo la activación transcripcional *ler*.<sup>26</sup>

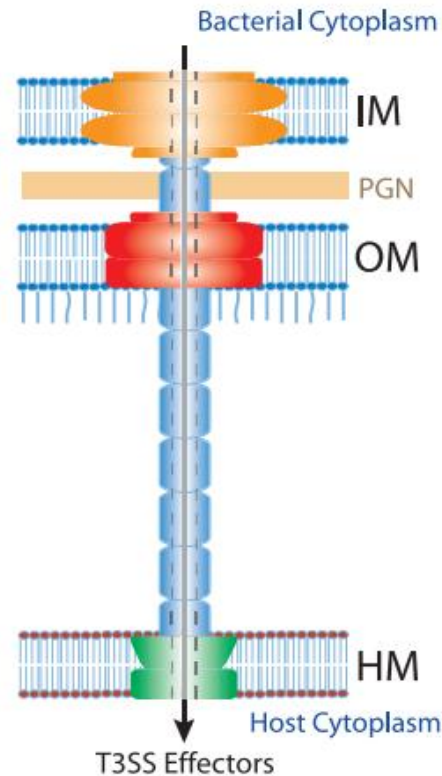


**Figura 7. Regulación central de la isla LEE.** Los operones LEE 1-5 se indican en negro con los activadores maestros ORFs *ler* y *grlA*, resaltados en azul y verde respectivamente. Las flechas grises punteadas, corresponden a productos de la traducción de estos genes. Las líneas azules, representan los puntos de entrada de la regulación transcripcional positiva, mientras que las flechas rojas indican una regulación negativa.<sup>26</sup>

El SST3, cuyos componentes son codificados por los operones LEE1-LEE3, es uno de los sistemas de secreción de proteínas más conocidos actualmente. Es una estructura compleja compuesta de varias subunidades, que a su vez se componen de aproximadamente 20 proteínas bacterianas. A través de este sistema de secreción/inyección de proteínas, los patógenos translocan sus factores de virulencia (efectores) directamente en las células huésped, lo que permite la infección por desestabilización de los mecanismos de defensa de las células.

Diversos SST3 son muy similares en sus estructuras, y su apariencia similar a una jeringa en las imágenes de microscopio electrónico de transmisión, les ha llevado a ser llamados complejos de aguja (NCs). El núcleo del dispositivo de inyección SST3 es un complejo en forma de aguja que consta de una base multi-anillo y una aguja saliente. Las dos partes están conectadas por una aguja externa, que sobresale de la superficie bacteriana. La base multi-anillo se compone de un par de anillos interior y exterior que atraviesan la membrana bacteriana interna (IM) y membrana externa (OM), y los dos anillos están conectados por una estructura en forma de barra que pasa a través de la IM y OM. La aguja saliente tiene una estructura lineal que tiene un cilindro hueco que contiene un canal central estrecho ( $\sim 28 \text{ \AA}$  de diámetro), especializado en el transporte de proteínas de secreción. El canal central se extiende desde la parte inferior de la estructura de anillo a la parte superior de la punta de la aguja. Toda esta compleja estructura del SST3 se observa en la Figura 8. <sup>27, 28, 29, 30, 31</sup>

La intimina es una adhesina de membrana de 94-97 kDa producida por todas las cepas EHEC y los patógenos relacionados A/E y se codifica por el gen *eaE*. Comparte homología con una invasina de *Yersinia*, una proteína que promueve la invasión de células eucariotas. La intimina es la encargada de mediar las lesiones A/E, a través de la unión de esta proteína de membrana con su receptor, llamado Tir, que se encuentra en la membrana de la célula huésped; y es el único factor de colonización intestinal para EHEC identificado hasta ahora; ambos codificados por LEE. <sup>23, 32</sup>



**Figura 8. Estructura del SST3.** El aparato T3SS consiste en anillos que proporcionan un camino continuo a través de la IM y la OM de la bacteria, incluyendo la capa de peptidoglicano (PGN). Una estructura en forma de aguja se asocia con el anillo de membrana externa y se proyecta desde la superficie bacteriana.

30

### 2.3.1.2 Toxina Shiga

*Shigella dysenteriae* y la toxina Shiga (Stx) se identificaron en el siglo 19 por los Drs. Neisser y Shiga y Conradi. Aproximadamente 80 años más tarde se encontró la misma toxina en un grupo de aislados de *E. coli*, se determinó que estas bacterias causaron diarrea con sangre y secuelas graves.<sup>33</sup>

Stx es el principal factor de virulencia en la patogénesis de la enfermedad debida a EHEC, conduciendo a la muerte y a muchos otros síntomas en pacientes infectados. Esta potente citotoxina pertenece a la familia Stx que contiene dos grupos

principales, llamados Stx1 y Stx2. La toxina consiste en una subunidad A y en cinco subunidades idénticas B; una sola cepa de EHEC puede expresar solo Stx1, solo Stx2 o ambas, incluso múltiples formas de Stx2 (StxZc, StxZv, StxZe, etc). La subunidad B es un pentámero que se une específicamente a un receptor glucolipídico específico de la superficie celular, llamado globotriasoceramida o Gb<sub>3</sub>. La subunidad A es translocada dentro del citoplasma de las células del huésped, de este modo inhibe la síntesis de proteínas en las células del hospedero, por medio de una actividad como N-glicosidasa que remueve un solo residuo de adenina del 28S rRNA de la unidad ribosomal 60S. La perturbación resultante de la síntesis de proteínas conduce a la muerte de las células endoteliales renales, epiteliales intestinales, Vero o HeLa, o cualquier otra célula que posea el receptor Gb<sub>3</sub>.<sup>7, 17, 23, 34</sup>

Además de la Stx y la PAI LEE, existen otros factores de virulencia como un plásmido de 93 kb (~ 60MDa) llamado pO157 que se encuentra en todos los aislados de *E. coli* O157:H7, este codifica una enterohemolisina, una adhesina conocida como ToxB y un Sistema de secreción tipo II.<sup>7, 17, 23</sup>

## **2.4 Motilidad bacteriana**

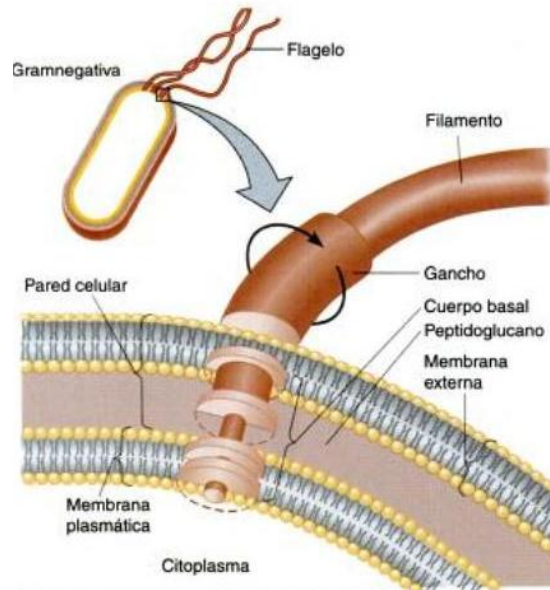
Muchas bacterias requieren motilidad para su crecimiento y supervivencia, aunque también es esencial para la infectividad de muchos patógenos. Aunque existen otros tipos de motilidad (por ejemplo, la motilidad de deslizamiento), el movimiento de traslación mediada por flagelos, es el mecanismo más común en las bacterias. La estructura y función de los flagelos bacterianos han sido ampliamente estudiados

en modelos de *Salmonella enterica* y *E. coli*. De aproximadamente 50 genes implicados en la expresión y el ensamblaje del flagelo, prácticamente 20 producen los componentes integrales de este. Como se observa en la Figura 9, el flagelo consiste de tres partes: el cuerpo basal o motor, el gancho, y el filamento flagelar de forma helicoidal y se monta desde el interior al exterior de la célula de una manera altamente organizada. La flagelina es la principal proteína estructural de los filamentos flagelares; que comprende cuatro dominios conectados de forma lineal.

35, 36, 37

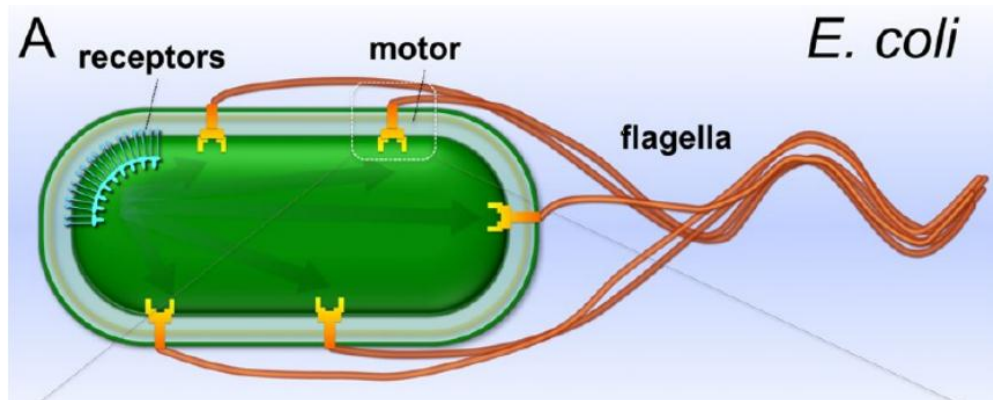
El cuerpo basal está compuesto por un pequeño bastón central insertado en una serie de anillos. Las bacterias gramnegativas contienen dos pares de anillos; el par de anillos externo está anclado a diversas porciones de la pared celular, mientras que el par de anillos interno está anclado a la membrana plasmática. El gancho es el encargado de conectar el cuerpo basal con el filamento, el gancho está compuesto de una proteína diferente a la flagelina; y finalmente el filamento que es la porción más larga, posee diámetro constante y está compuesto de flagelina. <sup>3</sup>

En las bacterias que poseen flagelos, estos pueden adoptar cuatro disposiciones distintas, lo que determina que las bacterias se clasifiquen en: monotricas que son aquellas que poseen un solo flagelo polar; anfitricas las que presentan un flagelo en cada extremo; lofotricas las bacterias que presentan dos o más flagelos (una especie de mechón) en uno o ambos extremos y peritricas las que presentan flagelación distribuida en toda su superficie. <sup>3</sup>



**Figura 9. Partes y fijación de un flagelo de una bacteria gramnegativa.** El diagrama ilustra las distintas porciones y la fijación de los flagelos en las bacterias gramnegativas. <sup>3</sup>

La síntesis flagelar en *E. coli* es un proceso intrincadamente programado que comienza con la expresión del operón maestro, *flhDC*, que codifica los factores de transcripción y FlhD y FlhC. Estos factores forman homodímeros que se combinan para formar un complejo FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub> heterohexámero que activa la transcripción de los genes necesarios para la construcción y la regulación del aparato flagelar básico, incluyendo el factor sigma (28) FliA, que se requiere para la expresión de otros genes flagelares y sensoriales implicados en la motilidad y la quimiotaxis. Son más de 50 genes que comprenden el regulón flagelar FlhDC-dependiente. En la Figura 10 se presenta el modelo esquemático flagelar de *E. coli*. <sup>38</sup>



**Figura 10. Modelo esquemático del flagelo externo de *E. coli*.** Representación gráfica de los flagelos peritricos de *E. coli*.<sup>9</sup>

## 2.5 Proteosoma

Los proteosomas se encuentran en arqueas, algunas bacterias y eucariontes y funcionan como una especie de control de calidad de proteínas a través de la degradación de proteínas mal plegadas o dañadas de alguna manera. Los proteosomas pueden desempeñar también un papel regulador a través de la degradación selectiva de las proteínas responsables de la replicación del ADN, la división celular, la transcripción y una variedad de otros procesos celulares centrales. Estas funciones se llevan a cabo por medio de proteólisis, una reacción química que rompe enlaces peptídicos; las enzimas encargadas de estas reacciones se denominan proteasas.<sup>39</sup>

A pesar de que la estructura global, enzimológica y bioquímica de los proteosomas procariotas y eucariotas está estrechamente relacionados, el mecanismo de cómo las proteínas son objeto de degradación por los proteosomas se presume que son muy diferentes entre estos dos grupos. Esta diferencia se debió a la aparente falta

de un equivalente procariota a la ubiquitina, una pequeña proteína que puede modificar covalentemente los restos de lisina de las proteínas y dirigirse a ellos para la degradación por los proteosomas en células eucariotas. En las bacterias, la degradación regulada de proteínas se lleva a cabo por una serie de proteasas dependientes de ATP como ClpAP, ClpXP, Lon, HslUV, y FtsH. Estas proteasas bacterianas comparten un diseño estructural común con el proteosoma de células eucariontes y cumple funciones equivalentes. <sup>40</sup>

### **2.5.1 Proteasas en *E. coli***

La proteólisis en *E. coli* sirve para eliminar de la célula proteínas anormales y malformadas y para limitar el tiempo y las cantidades de la disponibilidad de proteínas reguladoras críticas. La mayor proteólisis intracelular se inicia por proteasas dependientes de la energía, incluyendo Lon, ClpX y HflB. <sup>41</sup>

#### **2.5.1.1 Proteasa ClpXP**

La proteasa ClpXP está integrada de un componente ClpP y del componente ClpX, que une proteínas substrato, las desnaturaliza y transloca los polipeptidos desplegados dentro de la cámara de degradación ClpP. ClpXP es la proteasa responsable de degradar ciertas proteínas reguladoras claves, tales como RpoS, que es un factor sigma de fase estacionaria específica para la RNA polimerasa. La expresión de SST3 está codificada en LEE, y se ha demostrado que es controlado por varios reguladores; en la búsqueda de genes reguladores adicionales, diversos estudios han demostrado que la proteasa ClpXP tiene un efecto regulador positivo



sobre la expresión de LEE actuando sobre la expresión del regulador negativo de LEE, GrIR. <sup>42, 43</sup>

Por otra parte, en *E. coli*, la biogénesis flagelar depende estrictamente del regulador maestro flhDC. Algunos estudios demuestran que en EHEC, el regulón flagelar es controlado por la proteasa ClpXP, a través de dos vías: la primera, por el control transcripcional del regulador maestro FlhD/FlhC y a través del control transcripcional del operón flhDC; se ha demostrado en algunos estudios que la degradación de FlhD y FlhC por ClpXP es responsable de la regulación negativa de la expresión flagelar. <sup>44, 45</sup>

### **2.5.1.2 Proteasa Lon**

La proteasa Lon es una serina proteasa citoplásmica que se compone de anillos hexaméricos de cadenas de un solo péptido, pertenece a la superfamilia de las enzimas AAA<sup>+</sup> (ATPasas asociados con diversas actividades celulares), éstas contienen el dominio peptidasa, un dominio AAA<sup>+</sup> y un dominio que muestra actividad chaperona. Lon degrada las proteínas naturalmente inestables que están involucradas en una gran variedad de procesos biológicos. También juega un papel importante en el control de calidad de las proteínas mediante la degradación de proteínas malplegadas que de otra manera se acumularían. La acumulación es impedida por la acción sinérgica de chaperones (sistema DnaK) y proteasas, principalmente Lon. Entre las proteínas que degrada Lon se encuentran la proteína N de lambda; el regulador de la división celular SulA; el regulador positivo de la síntesis de la cápsula, RcsA; y la proteína del sistema adicción factor F CcdA. Las

mutantes en Lon de *E. coli*, aunque viables, son extremadamente sensibles a cualquier daño en el ADN, debido a la estabilización del inhibidor de la división celular, SulA. <sup>41, 44, 46, 47</sup>

Pese a que no hay estudios de los efectos de la presencia de Lon en EHEC, hay algunos acerca de otras bacterias, que también son gramnegativas. Muchos de estos microorganismos nadan en particular utilizando las estructuras flagelares. La síntesis de flagelos en *E. coli* y especies relacionadas se basa en el activador maestro FlhDC que regula positivamente la expresión de las dos clases de genes del regulón flagelar. La expresión el factor sigma (28) FliA que regula la expresión de tres clases de genes, y está bajo el control de FlhDC. Curiosamente, ambos reguladores son controlados por la proteólisis dependiente de ATP. La proteína FlhDC de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium y *Proteus mirabilis* es degradada por ClpXP y Lon, respectivamente, lo que sugiere que el regulador FlhDC de *E. coli* también tiene esta propiedad. FliA de *E. coli* parece ser condicionalmente inestable, está protegido de la degradación por Lon mediante la interacción con su factor anti-sigma FlgM. FlgM se secreta junto con las subunidades de flagelina. Por tanto, la proteólisis dependiente de ATP controla la síntesis de flagelos en diferentes bacterias. Curiosamente, tampoco existen estudios concretos sobre el efecto de la ausencia o la presencia de la proteasa Lon en *E. coli*, sin embargo estudios han demostrado que Lon participa en la virulencia, en cierta medida, al permitir la plena expresión de diversas proteínas efectoras. En *Yersinia*, se observó que la falta de Lon se asoció con una menor expresión de las proteínas de secreción de tipo III y se redujo la virulencia; en contraste, un mutante

en Lon en *P. syringae* exhibió un aumento en la secreción SST3, lo cual es consistente con un incremento en la virulencia.<sup>46, 47, 48</sup>

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), es uno de los patotipos de *E. coli* más representativos, ya que es la responsable de importantes brotes de enfermedad, ocurridos desde su descubrimiento en 1982. Se sabe que la infección con EHEC, puede ir desde una simple diarrea, hasta el llamado Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), una condición que puede llegar a tener fatales consecuencias en el individuo afectado y cuyo desarrollo es promovido, por uno de los factores de virulencia más destacados para este patógeno, la toxina Shiga (Stx), que, junto con el Sistema de Secreción Tipo III (SST3), conforman los aspectos más importantes de virulencia para EHEC. Sin embargo, hay muchos otros factores que regulan, positiva o negativamente la capacidad de virulencia de EHEC; entre estos se encuentra el sistema de proteosoma bacteriano. Las proteasas ClpXP y Lon son parte de este proteosoma, y han sido objeto de estudio, no sólo en *E. coli*, sino también en otros patógenos, respecto a algunos aspectos inherentes a las bacterias, tales como la motilidad y la adherencia bacteriana. El estudio del efecto de las proteasas ClpXP y Lon sobre la motilidad y la adherencia de EHEC O157:H7, es de suma importancia para establecer la relación con estudios previos y abrir el panorama respecto al papel del proteosoma bacteriano sobre la patogenicidad de EHEC.

#### **4. HIPÓTESIS**

Si las proteasas ClpXP y Lon afectan la expresión de factores de virulencia de EHEC, la ausencia de éstas regularán diferencialmente la adherencia y la motilidad bacteriana comparada con la cepa silvestre EDL933 de EHEC O157:H7.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo General**

- Analizar el papel de las proteasas ClpXP y Lon en los fenotipos de crecimiento, adherencia y motilidad de la cepa de EHEC EDL933.

### **5.2 Objetivo Específicos**

- Caracterizar por PCR las mutaciones en las proteasas ClpXP y Lon realizadas en la cepa silvestre de EHEC EDL933.
- Analizar el efecto de las mutantes en las proteasas ClpXP y Lon sobre el crecimiento bacteriano de la cepa silvestre de EHEC EDL933.
- Evaluar el efecto de las mutantes en las proteasas ClpXP y Lon en la adherencia a células Vero comparada a la cepa silvestre de EHEC EDL933.
- Determinar si las proteasas ClpXP y Lon influyen sobre la motilidad bacteriana de la cepa silvestre de EHEC EDL933.

## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL

### 6.1 Tipo de estudio

- Prospectivo-Experimental-Longitudinal-Comparativo.

### 6.2 Población de estudio

- Cepas EHEC EDL933 serotipo O157:H7 y cepas mutantes: EHEC  $\Delta clpXP$ , EHEC  $\Delta lon$  y EHEC  $\Delta clpXP lon$ .

### 6.3 Criterios de inclusión

- Cepas EHEC: cepa silvestre EDL933, EHEC  $\Delta clpXP$ , EHEC  $\Delta lon$  EHEC y  $\Delta clpXP lon$ .

### 6.4 Criterios de exclusión

- Cepas no EHEC.
- Cepas EHEC que no sean serotipo O157:H7.
- Cepas EHEC serotipo O157:H7 no mutadas en las proteasas ClpXP y Lon.

### 6.5 Criterios de eliminación

- Cepas contaminadas.

### 6.6 Variables

- Independientes: crecimiento bacteriano, monocapa de células, temperatura, tiempo.
- Dependientes: crecimiento bacteriano, motilidad, adherencia.

## **6.7 Material y métodos**

### **MATERIAL**

- Mechero Fisher
- Cajas Petri estériles de plástico
- Gradilla para tubos Eppendorf
- Botellas para cultivo celular de poliestireno Costar® de 75 cm<sup>2</sup> áreas
- Placas de 24 pozos estériles especiales para cultivo celular Costar®
- Papel Parafilm
- Vasos de precipitado de 100 mL Pyrex®
- Probeta de 100 mL
- Matraz Erlenmeyer de 250 mL Pyrex®
- Tubos Eppendorf de 1.5 y 2.0 mL
- Frascos de 250 mL Kimax®
- Celdas para espectrofotómetro
- Moldes para gel de electroforesis
- Peines para gel de electroforesis de 8 pozos
- Tubos Corning® de 50 mL
- Tubos Falcon de 15 mL
- Puntas para micropipetas (10, 200 y 1000 µL)
- Micropipetas HIRSCHMANN® labopette® de 0.1-3 µL, 2-20 µL, 20-200 µL y 100-1000 µL de capacidad
- Tubos para PCR de 0.2 mL
- Celdas para electroporación.



EQUIPO	MARCA
Potenciómetro	Sper Scientific
Espectrofotómetro	Pharmacia Biotech Ultrospec 2000 UV/Visible
Balanza	Mettler Toledo
Termociclador	Eppendorf™ flexid Mastercycler® nexus GSX1
Incubadora Orbital	Prendo INO 650-M
Vortex	Fisher Scientific Vortex Genie 2™
Parrilla de agitación y calentamiento	Cimarec®
Microscopio	ZEISS
Centrifuga	Dragon Lab
Concentrador (Speedvac)	Eppendorf™
Thermoblock	Eppendorf™
Nanodrop	NanoDrop® ND-100 Spectrophotometer
Incubadora	Forma Scientific
Campana de flujo laminar	NUAIRE
Electroporador	BioRad

## REACTIVOS

- Hidróxido de sodio
- Ácido Clorhídrico
- Agar
- Triptona
- Extracto de levadura
- Cloruro de Sodio
- Agua destilada
- Medio 199
- Tripsina
- Agarosa
- PBS 1X estéril
- PBS 1X estéril con 0.1% de triton
- Buffer TAE 1X
- Medio DMEM High y low glucose Gibco®
- Etanol absoluto
- Etanol al 70%
- Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamílico (25:24:1)
- Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1)
- Cloruro de guanidinio 6M
- Buffers para potenciometro pH 4, 7 y 10
- Kit para PCR Invitrogen Thermo Fisher®, que contenía:
  - Buffer
  - Mg<sup>++</sup>
  - Enzima Taq
  - dNTPs

### Antibióticos

Para el estudio se emplearon las siguientes cepas, para el crecimiento de estas fue necesario suplementar el medio con Cloranfenicol (Cm) y Kanamicina (Km), cuya concentración fue de 30  $\mu\text{g/mL}$  y 50  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. En la siguiente tabla se muestra la relación de cada cepa y su antibiótico correspondiente:

Cepa	Antibiótico
wt (silvestre)	-----
$\Delta clpXP$	Cm
$\Delta lon$	Km
$\Delta clpXP lon$	Cm

### Medios de cultivo

#### Medio LB

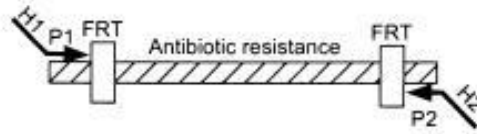
Para 500 mL de medio fue necesario pesar: 5 g de triptona, 2.5 g de extracto de levadura y 5 g de cloruro de sodio, que se disolvieron con 450 mL de agua destilada en agitación. Se ajustó el pH a 7.0 y posteriormente se llevó al volumen final de 500 mL con agua destilada, para finalmente esterilizar el medio. Para el agar LB solo se agregó agar bacteriológico al medio a una concentración final de 1.5%.

## **Generación de mutantes**

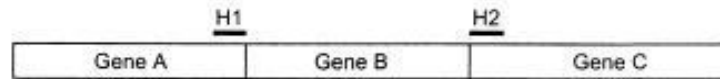
La generación de las mutantes en los genes *clpXP* y *lon* en EHEC se llevó a cabo por medio el método de interrupción genética en un solo paso.<sup>49</sup> Usando la cepa silvestre de EHEC EDL933 se inactivaron los genes *clpXP*, *lon* y *clpXPlon* presentes en el cromosoma bacteriano, reemplazando su secuencia nucleotídica por genes de resistencia a cloranfenicol (para *clpXP* y *clpXPlon*) y kanamicina (para *lon*), generados por medio de PCR utilizando oligonucleótidos que contienen secuencias homólogas de los genes a mutar. Debido a esto, el PCR (que contenía el gen de resistencia a antibiótico) se recombinó en los genes a mutar de interés por medio de la recombinasa Lambda-Red ( $\lambda$ -Red) codificada en el plásmido pKD46.

Se prepararon células electrocompetentes de la cepa de EHEC EDL933 que lleva el plásmido pKD46 induciendo la recombinasa  $\lambda$ -Red con L-arabinosa al 1%. Las bacterias fueron transformadas por electroporación con el producto de PCR que amplificó la resistencia al antibiótico, posteriormente recuperadas en medio LB e incubadas a 30°C por 3 horas. A continuación, se muestra un esquema de la mutagénesis de interrupción por un solo paso empleando productos de PCR:

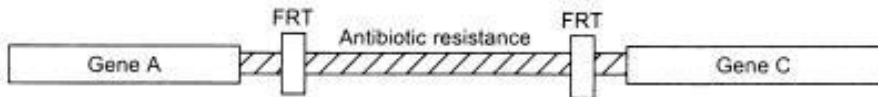
Step 1. PCR amplify FRT-flanked resistance gene



Step 2. Transform strain expressing  $\lambda$  Red recombinase



Step 3. Select antibiotic-resistant transformants



**Figura 11. Generación de mutantes por el método de interrupción por un solo paso.** Proceso mutagénico, donde H1 y H2 son las regiones de homología del gen, y P1 y P2 a las regiones de homología con el plásmido pKD46. <sup>49</sup>

### Electroporación

A partir de un inóculo crecido toda la noche, se realizó una dilución 1:25, colocando 200  $\mu$ L de cepa en 5 mL de medio LB y esperando hasta una fase logarítmica de crecimiento, después de 2.5 horas a 37°C, en agitación constante (150 rpm).

Se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos. A partir de entonces, todas las manipulaciones fueron realizadas a 4°C. Se efectuaron 3 lavados con agua estéril fría agregando 5 mL aproximadamente, centrifugando y eliminando el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida y se transfirieron 80  $\mu$ L de la resuspensión a tubos Eppendorf estériles, adicionando 3  $\mu$ L de plásmido o PCR, se transfirieron los 83  $\mu$ L de la solución con una pipeta a las celdas de electroporación

en hielo. Se utilizó el electroporador de la marca BioRad, empleando los siguientes parámetros:

<b>Parámetros de Electroporación</b>	
Modo	<i>E coli</i> 2.5 kV
Capacitancia	µF
Resistencia	200 Ω
Voltaje de la descarga	2500

Una vez efectuada la electroporación se resuspendió en 1 mL de medio LB estéril y se pasó a tubos Eppendorf estériles, incubándolos con agitación a 500 rpm por 3 horas a 30°C. Posteriormente, se plaquearon en placas de agar LB con el antibiótico correspondiente, incubando toda la noche a 42°C, y finalmente se seleccionaron colonias aisladas, corroborando la inserción del gen de resistencia por medio de PCR.

### **Extracción de ADN bacteriano**

La extracción del DNA genómico se realizó de acuerdo a la metodología descrita por González-y-Merchand y colaboradores.<sup>50</sup> Para lo anterior, 10 mL de las cepas de EHEC en fase logarítmica se centrifugaron a 2500 x g durante 10 min; se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 2 mL de regulador de lisis (Cloruro de Guanidinio 6 M, Tween 80 al 10%, EDTA 0.5 M y 2-β-Mercaptoetanol 14.7 M).

Posteriormente, la suspensión fue transferida a tubos de 2 mL con tapón de rosca. Inmediatamente después se sometieron los tubos a tres ciclos de choque térmico, cada uno de 10 minutos a -70°C en un ultracongelador y 10 minutos a 65°C en un baño María. Posteriormente, se adicionó un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y las mezclas fueron agitadas suavemente en el vortex, para después centrifugar a 16000 x g a temperatura ambiente durante 5 minutos.

La fase acuosa fue recuperada y se le agregaron dos volúmenes de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vortex para después proceder a centrifugar nuevamente bajo las mismas condiciones.

La fase acuosa fue recuperada nuevamente y se precipitó el ADN con dos volúmenes de etanol absoluto; inmediatamente después los tubos fueron colocados a una temperatura de -20°C durante 24 horas para favorecer la precipitación. Los tubos fueron centrifugados nuevamente durante 15 minutos a 16000 x g a temperatura ambiente, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µL de etanol al 70%, después el exceso de etanol fue eliminado secando el ADN en el secador "DNA110 Speed Vac". La muestra se resuspendió en un volumen apropiado de agua destilada estéril dependiendo del tamaño de la pastilla obtenida. El ADN fue cuantificado por espectrofotometría utilizando el Nano Drop-1000 (ND-1000), determinando su calidad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%; finalmente se almacenó a -20°C hasta su uso.

## **Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)**

Con el fin de confirmar que los iniciadores amplificaban el producto esperado se realizaron las PCR de punto final empleando las siguientes condiciones de la mezcla de reacción: 0.25  $\mu\text{L}$  que corresponde a 1U de Taq polimerasa (Invitrogen), 2.5  $\mu\text{L}$  de amortiguador de PCR 10X (Tris-HCl 200 mM pH = 8.4; KCl 500 mM) (Invitrogen), 1.5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  a una concentración de 25 mM (Invitrogen), 0.5  $\mu\text{L}$  de dNTPs a una concentración de 10 mM (Invitrogen), 1.0  $\mu\text{L}$  de cada uno de los iniciadores a una concentración de 20  $\mu\text{M}$  (Invitrogen), 1.0  $\mu\text{L}$  de ADN genómico a una concentración de 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , llevando a un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  adicionando 17.5  $\mu\text{L}$  de agua estéril libre de nucleasas.

Los tubos con la mezcla de reacción fueron colocados en un termociclador Mastercycler® de Eppendorf; la amplificación consistió de un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C por 5 minutos, posteriormente 30 ciclos con las siguientes condiciones: 95°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos y 57°C por 1 minuto, finalmente un ciclo de extensión a 72°C por 10 minutos. Una vez terminada la reacción se comprobó la amplificación mediante un corrimiento electroforético a 100 V por 30 minutos en gel de agarosa al 0.1%, teñido con bromuro de etidio (0.83  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), colocando en cada pozo 5  $\mu\text{L}$  de producto de PCR y usando como regulador TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA).

## **Electroforesis**

Para corroborar la amplificación llevada a cabo previamente por medio de PCR, se preparó un gel de agarosa al 0.1% en buffer TAE 1X. La mezcla se calentó hasta la desaparición de sólidos (aproximadamente 45 s). La solución fue transferida al



molde para geles, donde ya se había colocado previamente el peine, dejando solidificar el gel. A la cámara de electroforesis le fue colocada cantidad suficiente de TAE 1X. De cada muestra fueron tomados 5  $\mu$ L de producto obtenido por PCR, mezclándose con 2  $\mu$ L de colorante DNA 6x, y se colocaron con precaución en cada uno de los pozos. También se colocaron 5  $\mu$ L de una escalera de DNA (marcador de peso molecular) de 1 kb, finalmente se conectó a la fuente de poder dejando correr el gel a 100 V por 30 minutos. Finalizado este tiempo se retiró el gel, dejándolo teñir por aproximadamente 3 minutos en bromuro de etidio, para posteriormente colocarlo en un recipiente con agua, por un tiempo aproximado de 10 minutos y en el transiluminador se observó el corrimiento del gel.

### **Cinéticas de crecimiento**

Se colocaron 5 mL de medio líquido LB en tubos Corning de 15 mL (5 tubos totales, uno control y los restantes para cada una de las cepas), con 5  $\mu$ L del antibiótico correspondiente a cada cepa. Después con una punta estéril se tomó la bacteria directamente de la bacteria preservada en glicerol al 20%, para colocarla en los tubos correspondientes a cada cepa y se incubaron los tubos toda la noche a 37°C en agitación.

De las cepas que crecieron el día anterior se tomó de cada una 800  $\mu$ L y estos fueron colocados en celdas para leer su densidad óptica (DO) en el espectrofotómetro, el cual se prendió con 5 minutos de anticipación. Cuando cada muestra estuvo lista en su celda, se leyeron a 600 nm, obteniendo así la DO, que permitió hacer un cálculo para ajustar la densidad óptica de cada muestra a 0.05,

en un volumen de 50 mL que corresponden a los 50 mL de medio contenidos en un frasco estéril de 200 mL de capacidad, y que es donde se colocaron las bacterias para su posterior incubación. La fórmula es la siguiente:

$$C_1 = 0.05$$

$$V_1 = 50 \text{ mL}$$

$C_2$  = densidad óptica obtenida de la lectura inicial de cada muestra

$V_2 = X$ , ya que es el volumen de muestra que tomaremos de cada cultivo bacteriano.

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$V_2 = (C_1 V_1) / C_2$$

Una vez obtenido el cálculo, se procedió a tomar el volumen correspondiente de cada cepa bacteriana, para colocarlas en su frasco correspondiente (que ya contenía los 50 mL de medio), se agitó y finalmente cada frasco fue llevado a incubación a 37°C con agitación por 8 horas, realizando una lectura de cada cepa cada hora en el espectrofotómetro a 600 nm, ajustando antes de cada lectura con un blanco. Las cinéticas se realizaron por triplicado, usando dos medios diferentes: LB y DMEM high glucose (4.5 g/L).

## **Ensayos de adherencia**

### *Cultivo celular de células Vero*

Para el crecimiento de las células vero (aisladas de células epiteliales renales de macaco) se utilizó el medio 199 en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5% (precalentado en baño María). Para despegar las células de la botella, 1 mL de tripsina fue agregado,

para así incubar a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 2 minutos. Transcurrido el tiempo se observaron las células al microscopio para verificar que no siguieran adheridas a la superficie. Finalmente se completó a 5 mL con medio 199 y en una placa de 24 pozos fueron colocados 0.5 mL por cada pozo, se colocó en incubación a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, para que las células pudieran adherirse a los pozos y formaran una monocapa celular. Al día siguiente se observó la confluencia de las células para verificar estuvieran en las condiciones adecuadas para poder trabajar con ellas (debían de encontrarse en un 80% de confluencia aproximadamente).

#### *Adherencia a células Vero (índice competitivo)*

Las células Vero fueron lavadas tres veces con buffer PBS 1X. Finalmente se agregó 1 mL de medio DMEM low glucose (1 g/L). Para la infección de las células se prepararon mezclas: bacteria wt/bacterias mutante. Dichas mezclas fueron realizadas en tubos Eppendorf de 1.5 mL, colocando 250 µL de la cepa wt y cada una de las mutantes que crecieron previamente toda la noche a 37°C en agitación. Se tomaron 10 µL de cada mezcla e inocularon en el pozo correspondiente por triplicado. La infección se llevó a cabo por 3 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se retiró el sobrenadante de las células y se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Finalmente, se agregó 1 mL de PBS 1X con tritón X-100 al 0.1% estéril, dejando a temperatura ambiente por 2 minutos. Después, cada uno de los pozos fue raspado (para despegar las células) con una punta estéril y el lisado fue transferido a tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se realizaron diluciones seriadas de tanto de las mezclas iniciales (lo que se inoculó) como de los lisados tratados con PBS tritón X-100 al 0.1% (450 µL de PBS 1x en tubos Eppendorf 1.5 mL + 50 µL de

las muestras). Una vez realizadas las diluciones, se inocularon 3 gotas de 20  $\mu$ L cada una en una placa de agar LB dividida en 6 partes (cada parte corresponde a una dilución). Se incubó a 37°C toda la noche y al día siguiente fueron contadas las colonias para la realización de los cálculos.

## **Ensayos de motilidad**

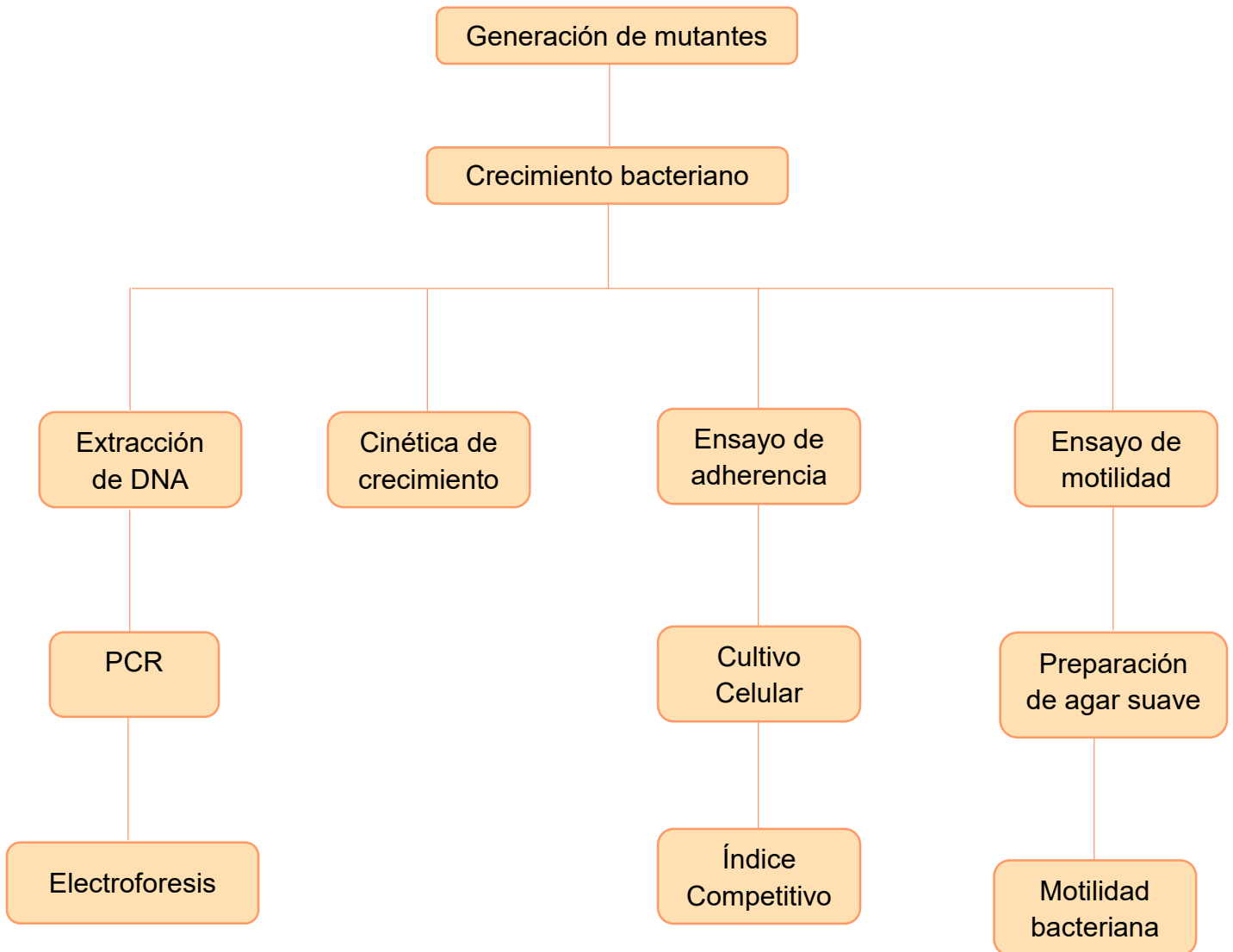
### *Preparación de agar suave*

Para determinar la motilidad bacteriana se preparó agar suave (0.5%). Para un volumen de 250 mL de agar fue necesario pesar 2.5 g de triptona, 1.25 g de extracto de levadura, 1.25 g de cloruro de sodio y 1.25 g de agar, que posteriormente se disolvieron con 200 mL de agua destilada en agitación. Posteriormente se midió el pH, realizando un ajuste del mismo a pH 7.0 (con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio según el caso), se llevó al volumen final de 250 mL con agua destilada y se esterilizó el medio. Una vez esterilizado fue vertido en cajas petris estériles, mismas que al estar solidificadas se guardaron a 4°C.

### *Motilidad bacteriana*

Se tomaron 5  $\mu$ L de las bacterias que crecieron la noche anterior en agitación a 37°C; con la pipeta se picó la caja de agar suave y de este modo fueron inoculados 5  $\mu$ L de cada cepa (cada cepa por duplicado, es decir dos cajas por cepa). Las cajas se incubaron por 6 horas a 37°C. Transcurrido este periodo de tiempo se calculó la motilidad bacteriana midiendo el diámetro de nado de las bacterias.

## 6.8 Diagrama de Flujo



## 7. RESULTADOS

### A. Caracterización de las mutantes por PCR

Para la caracterización de las mutantes se realizó una PCR, donde, usando oligonucleótidos específicos, se amplificaron los genes de resistencia a kanamicina o cloranfenicol. Se usaron como templados los ADN cromosomales de las cepas silvestre y mutantes  $\Delta clpXP$ ,  $\Delta lon$  y  $\Delta clpXP lon$ . La secuencia de los oligonucleótidos fue la siguiente:

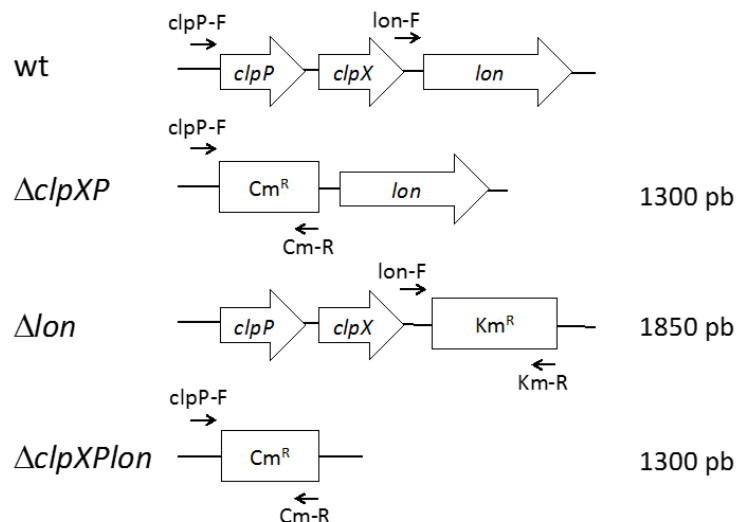
clpP-F: ATG TCA TAC AGC GGC GAA CG

lon-F: GTG TCA TCT GAT TAC CTG GC

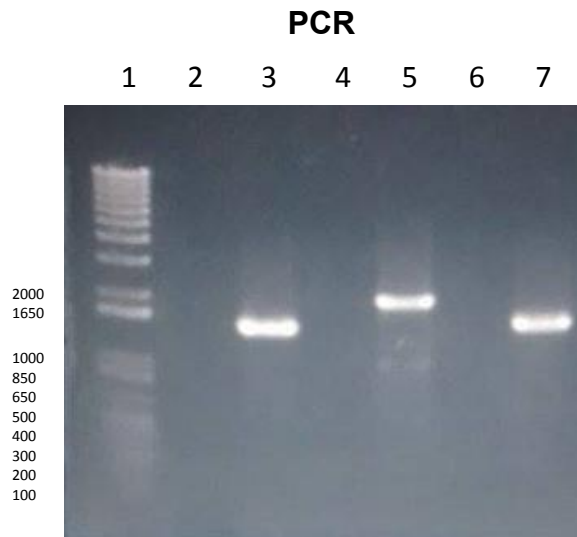
Cm-R: TTA TAC GCA AGG CGA CAA GG

Km-R: CAG TCA TAG CCG AAT AGC CT

Para la caracterización de las mutantes se usaron los pares siguientes de oligonucleótidos: clpP-F/Cm-R para la mutante sencilla  $\Delta clpXP$  y doble mutante  $\Delta clpXP lon$  y lonF/Km-R para la mutante sencilla  $\Delta lon$ . La representación de los oligonucleótidos se muestra a continuación:



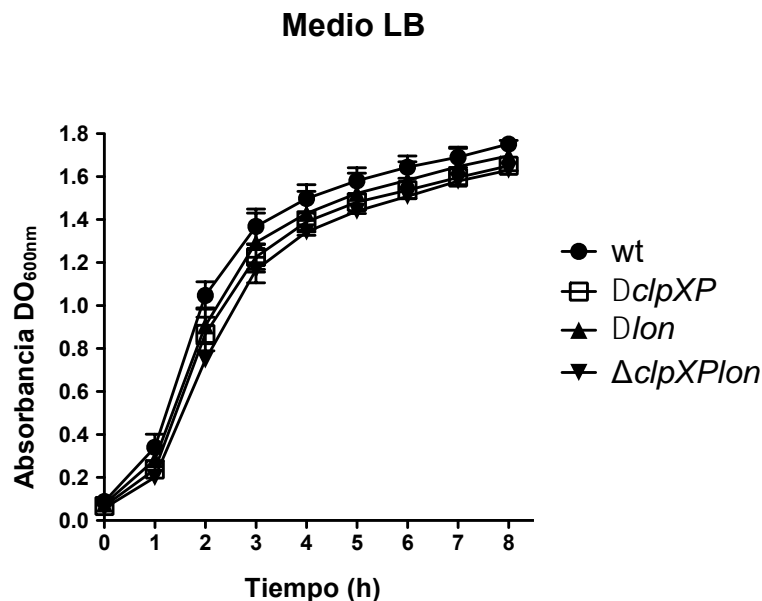
Usando el ADN de la cepa silvestre no observamos amplificación de PCR, ya que los oligonucleótidos Cm-R y Km-R, hibridan con secuencias de los casetes de resistencia a cloranfenicol y kanamicina, respectivamente. Como puede observarse en el gel de agarosa, los amplicones de las mutantes *clpXP* y *clpXPlon* fueron de aproximadamente 1300 pb. La mutante en *lon* generó un producto de PCR de 1850 pb que concuerda con el tamaño del casete de resistencia a kanamicina (el casete de kanamicina es más grande que el de cloranfenicol). Es interesante hacer notar que la doble mutante *clpXPlon* tuvo el mismo fenotipo mucoso que la mutante sencilla *lon*, lo que indica la ausencia del gen *lon*. Además de lo anterior, pruebas con otros oligonucleótidos, así como también la secuenciación de esta región confirmó la ausencia de los genes.



**Figura 12. Caracterización de las mutantes por PCR.** El marcador de peso molecular se encuentra en el carril 1. En los números 2, 4 y 6 es la cepa silvestre EDL933 con los pares de oligonucleótidos para caracterizar las mutantes  $\Delta clpXP$ ,  $\Delta lon$  y  $\Delta clpXPlon$ . No se observa amplicón en la cepa silvestre debido a la ausencia de casetes de resistencia a antibiótico. En el número 3 se encuentra la mutante  $\Delta clpXP$ , en el 5 la mutante  $\Delta lon$  y en el número 7 la mutante en  $\Delta clpXPlon$ .

## B. Cinética de crecimiento bacteriano

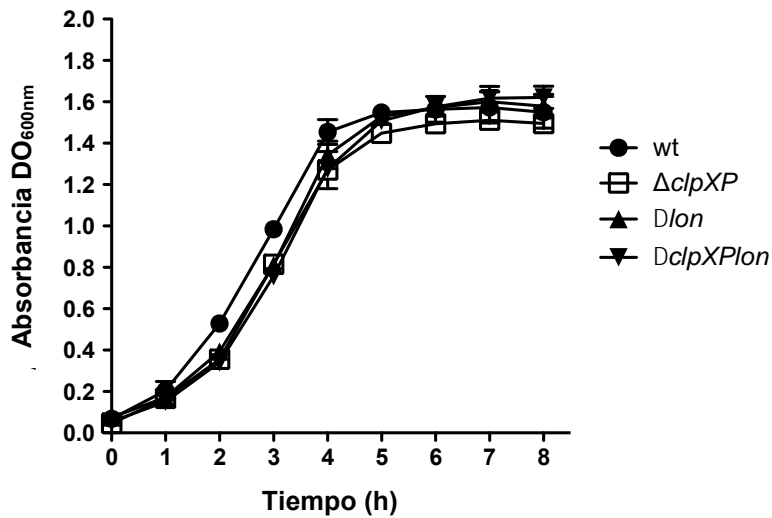
Para evaluar y comparar el crecimiento de las mutantes en las proteasas con la cepa silvestre, se emplearon dos medios de cultivo diferentes: LB y DMEM high glucose. El medio LB (Luria-Bertani) es usado para el desarrollo óptimo de la mayoría de las enterobacterias. El medio DMEM high glucose, se utiliza ampliamente para el crecimiento de diferentes células de mamíferos. En el caso de EHEC, este medio promueve la expresión de factores de virulencia mientras que el medio LB los reprime. En las siguientes gráficas se muestra la cinética de crecimiento de la cepa silvestre y las mutantes a lo largo de 8 horas, donde se realizó la lectura de su densidad óptica (DO) cada hora. Como se observa en ambos gráficos, el crecimiento bacteriano de las cepas mutantes en las proteasas ClpXP y Lon no se vio significativamente afectado por el medio de crecimiento.



**Figura 13. Cinética de crecimiento en medio LB.** Crecimiento de la cepa silvestre y las mutantes  $\Delta clpXP$ ,  $\Delta lon$  y  $\Delta clpXPlon$  a 37 °C por 8 horas.



## Medio DMEM high glucose

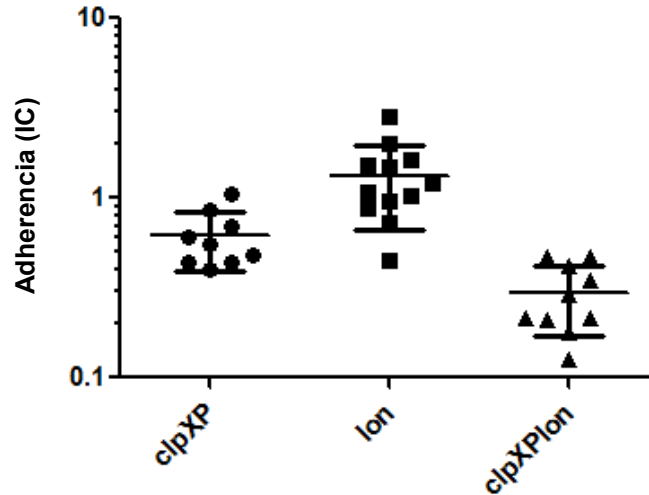


**Figura 14. Cinética de crecimiento en medio DMEM high glucose.** Crecimiento de la cepa silvestre y las mutantes  $\Delta clpXP$ ,  $\Delta lon$  y  $\Delta clpXPlon$  a 37°C por 8 horas.

### C. Ensayo de adherencia

La evaluación de la adherencia a células Vero, se realizó por medio de índice competitivo (IC), es decir, calculando la relación de las UFC/mL de adherencia entre la cepa mutante *versus* la cepa silvestre, ajustando ambas cepas de acuerdo al inóculo inicial de infección. Como se observa en la Figura 15, la mutante  $\Delta clpXP$  disminuyó su adherencia respecto a la cepa silvestre (IC=0.6). Para la mutante  $\Delta lon$  se observó un ligero aumento en la adherencia respecto a la cepa silvestre. Para la doble mutante  $\Delta clpXPlon$ , se notó un descenso considerable de la adherencia respecto a la cepa silvestre (IC=0.25), mostrando una valor menor que las otras dos mutantes sencillas.

### Adherencia de mutantes en proteasas a células Vero vs wt

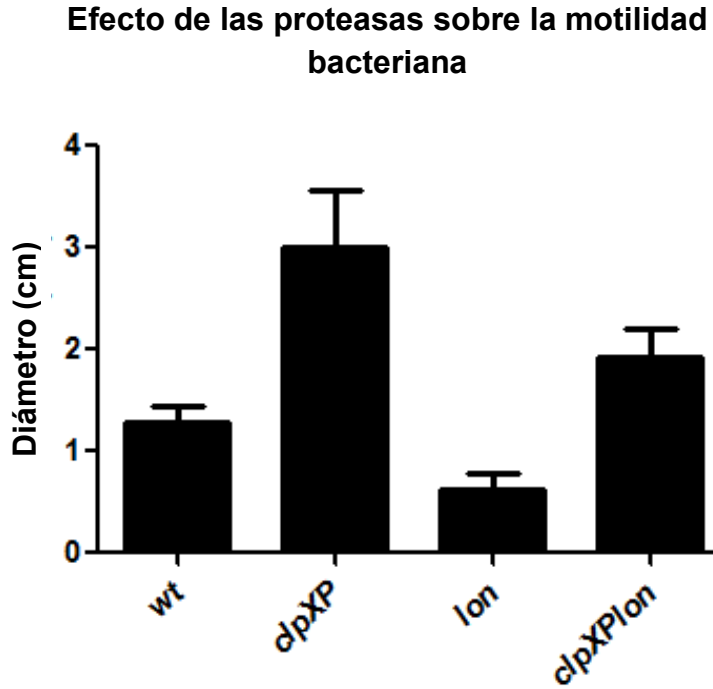


**Figura 15. Adherencia de las cepas mutantes.** Las cepas mutantes  $\Delta clpXP$ ,  $\Delta lon$  y  $\Delta clpXPlon$  fueron analizadas en su capacidad de adherirse a células Vero. La determinación se realizó por medio del conteo de las UFC/mL obtenidas en las diluciones seriadas de cada mezcla de cepas.

#### D. Ensayo de motilidad

En el ensayo de motilidad, se evaluó el nado de las bacterias a lo largo de 6 horas a 37°C en agar suave. Se midió el diámetro que recorrieron las bacterias en centímetros, realizándose por duplicado en cinco repeticiones en diferentes días. Se observó que la cepa silvestre tiene un diámetro de nado promedio de aproximadamente 1 cm, y esta es la referencia para hacer una comparación con respecto a las mutantes. Para la mutante  $\Delta clpXP$  se observó un importante incremento en la motilidad con relación a la cepa silvestre, mientras que en la mutante  $\Delta lon$  la motilidad bacteriana resultó afectada. Interesantemente, la doble

mutante  $\Delta clpXP lon$  tuvo un fenotipo intermedio, mostrando niveles de motilidad entre las cepas mutantes sencillas  $\Delta clpXP$  y  $\Delta lon$ .



**Figura 16. Motilidad bacteriana.** Se midió el diámetro en centímetros de la cepa silvestre y las mutantes en agar suave, después de 6 horas a 37°C.

## 8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

En el presente estudio se evaluó el efecto de las mutantes en las proteasas ClpXP y Lon en EHEC, sobre la motilidad y la adherencia a células Vero, además de si la presencia de estas mutaciones modificaban el crecimiento de las cepas con relación a la cepa silvestre EDL933.

A pesar que las cepas mutantes fueron generadas previamente y algunas ya están publicadas (como es el caso de la mutante  $\Delta lon$ ), caracterizamos y comprobamos las mutantes por medio de PCR (Figura 12).

Las proteasas ClpXP y Lon tienen funciones pleiotrópicas en bacterias. En el caso de bacterias como *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*, regulan tantos genes de virulencia como aquellos relacionados con la división celular y la motilidad. La ausencia de las proteasas ClpXP y Lon no afectó significativamente el crecimiento de EHEC, ya sea en medio LB o medio DMEM high glucose. Se notó solamente en general un mayor crecimiento en medio LB con respecto al medio DMEM, como puede observarse en las Figura 13 y la Figura 14.

Por otro parte, el comportamiento de la adherencia de las bacterias se evaluó por medio de un índice competitivo donde se determinó si las mutantes en las proteasas presentaban un aumento o disminución de la adherencia con respecto a la cepa silvestre. En la Figura 15 se mostró que las adherencias en las cepas mutantes  $\Delta clpXP$ ,  $\Delta lon$  y  $\Delta clpXP lon$  resultaron en niveles diferenciales. La ausencia de la proteasa ClpXP afectó la adherencia de la cepa silvestre, ya que se obtuvo un valor medio aproximado de 0.6. Este efecto se explicaría debido a que la proteasa ClpXP

degrada proteolíticamente a la proteína represora GrIR. En ausencia de ClpXP, GrIR se acumula y reprime la expresión de la isla LEE afectando la adherencia a células Vero. Para el caso de Lon, se obtuvo una media mayor a 1, esto por el ligero incremento en la adherencia. Se sabe que en *Yersinia pestis*, la ausencia de Lon produjo una acumulación de la proteína represora YmoA, reprimiendo las proteínas del SST3 y dicha mutante estuvo atenuada en la virulencia; este mismo estudio demostró que una mutante en ClpXP y Lon muestra una importante disminución de la virulencia, debido a la estabilidad de YmoA, lo que indica que ambas proteasas son las encargadas de regular el SST3 de *Y. pestis* por medio de la proteólisis de YmoA.<sup>51</sup> En contraste, una mutante  $\Delta lon$  en *P. syringae* exhibió un aumento en la secreción SST3, lo cual es consistente con un incremento en la virulencia, además en este estudio se demostró que la proteasa Lon de *P. syringae* es funcionalmente equivalente a la proteasa Lon que se encuentra en *E. coli*.<sup>52</sup> Recientemente se reportó que la proteasa Lon regula negativamente la isla de patogenicidad LEE en EHEC<sup>53</sup>, por lo que estos resultados nos explicarían el efecto de la ausencia de Lon en la adherencia. En el caso de la doble mutante  $\Delta clpXP lon$ , tiene una media aproximada de 0.3, mostrando una importante disminución de la adherencia a las células Vero y presentando una adherencia menor a la mutante sencilla  $\Delta clpXP$ . Como se discutió con la ausencia de ClpXP, en la doble mutante  $clpXP lon$  aumentaría la expresión del regulador GrIR disminuyendo la adherencia, y aunque la ausencia de Lon favorece ligeramente la adherencia, en ausencia también de ClpXP, favorece e incrementa la disminución de la adherencia.

En el caso de la motilidad la cepa silvestre tuvo un promedio de alrededor de 1 cm, que sirve como comparación para el resto de las cepas. En la Figura 16 se observó que la mutante  $\Delta clpXP$  aumentó considerablemente la motilidad con una media de aproximadamente 3 cm. Algunos estudios demuestran que en EHEC, el regulón flagelar es controlado por la proteasa ClpXP, a través de dos vías: la primera, por el control transcripcional del regulador maestro FlhD/FlhC y a través del control transcripcional del operón *flhDC*.<sup>43</sup> Se ha demostrado que la degradación de FlhD y FlhC por ClpXP es responsable de la regulación negativa de la expresión flagelar; por lo tanto, en ausencia de esta proteasa no hay degradación del regulador maestro FlhD/FlhC, y por ende hay una buena biogénesis flagelar, lo que favorece la motilidad bacteriana. En la ausencia de Lon hubo una importante disminución de la motilidad de la bacteria con una media aproximada de 0.5 cm, lo que indica que la ausencia de Lon afecta este fenotipo en la bacteria, tal vez porque esta proteasa no es capaz de degradar el regulador maestro FlhD/FlhC, probablemente incluso en su presencia, haya una mayor expresión del regulador maestro, o favorezca indirecta o directamente algún factor o regulador en la biogénesis flagelar; en consecuencia, su ausencia no favorece la producción del regulador maestro y por ello la disminución de la motilidad. Estas observaciones serán comprobadas determinando la expresión transcripcional del operón *flhDC* en la mutante  $\Delta lon$ .

Finalmente, en la doble mutante  $\Delta clpXP lon$  la motilidad presentó un fenotipo intermedio entre las mutantes  $\Delta clpXP$  y  $\Delta lon$ , mostrando un promedio aproximado de 1.6 cm. Ya que en la ausencia de ClpXP no se degrada el regulador maestro FlhD/FlhC, y esto produce una mayor expresión de la motilidad, pero como se dijo

anteriormente, Lon regula positivamente la biosíntesis flagelar ocasionando una disminución de la motilidad bacteriana, para el caso de la doble mutante  $\Delta clpXP lon$  el efecto en la motilidad muestra un efecto intermedio entre la regulación negativa y positiva mediada por las proteasas ClpXP y Lon, respectivamente.

Nuestros resultados muestran que ambas proteasas parecen tener funciones aditivas y antagonistas en los fenotipos de adherencia y motilidad de EHEC. Futuros estudios en el laboratorio evaluarán el efecto de estas proteasas sobre otros genes de virulencia, tales como la toxina shiga (*stx2A*) y la enterohemolisina (*ehx*) codificada en el plásmido pO157.

## **9. CONCLUSIONES**

- Las mutantes fueron corroboradas por PCR y secuenciación mostrando correctamente la eliminación de los genes *clpXP* y *lon* y su intercambio por casetes de resistencia a cloranfenicol y kanamicina.
- El crecimiento bacteriano a lo largo de 8 horas a 37°C, no se vio afectado en ninguno de los dos medios usados; en general las cuatro cepas (wt y las tres mutantes) mostraron un crecimiento similar a la cepa silvestre.
- La ausencia de ClpXP afectó la adherencia con respecto a la cepa silvestre EDL933. A su vez, esta misma ausencia aumentó la motilidad mostrando que esta proteasa resultó ser un “switch” para la regulación de los fenotipos de adherencia y motilidad.
- En ausencia de Lon, la adherencia se incrementó ligeramente respecto a la cepa silvestre, mientras que la ausencia de Lon redujo la motilidad. La proteasa Lon parece ser otro “switch” regulador similar a ClpXP.
- La ausencia de ambas proteasas, ClpXP y Lon, disminuyó la adherencia respecto a la cepa silvestre mostrando que ambas proteasas juntas estimulan la adherencia de EHEC. En términos de la motilidad, parece tener un efecto intermedio en relación a la cepa silvestre, por un lado la ausencia de ClpXP beneficia al no degradar el regulador maestro de la motilidad, y por otro, pareciera que Lon es necesaria para la motilidad y que su ausencia la afecta negativamente.



## **10. PERSPECTIVAS**

El trabajo generó las siguientes perspectivas:

- ✓ Evaluar el efecto de las mismas mutantes en células HeLa, para confirmar o contrastar los resultados obtenidos en el presente trabajo.
- ✓ Analizar por RT-PCR en tiempo real la expresión de los genes responsables de la adherencia (*espA*, *espB* y *espD*) y la motilidad (*flhDC* y *fliC*) bacteriana.
- ✓ Analizar la expresión de otros genes de virulencia, tales como la toxina shiga (*stx2A*) y la enterohemolisina (*ehx*).

## 11. REFERENCIAS

1. Romero CR. Microbiología y parasitología humana. 3<sup>a</sup> ed. México: Médica Panamericana; 2007.
2. Puerta-García A, Mateos-Rodríguez F. Enterobacterias. *Medicine*. 2010;10(51):3426-31.
3. Tortora G, Funke B, Case C. Introducción a la microbiología. 9<sup>a</sup> ed. Madrid: Médica Panamericana; 2007.
4. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews Microbiology*. 2004;2(2):123-140.
5. Croxen M, Law R, Scholz R, Keeney K, Wlodarska M, Finlay B. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013;26(4):822-880.
6. Hayhurst C. Epidemics deadly diseases throughout history. New York: The Rosen Publishing Group, Inc; 2004.
7. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998;11(1):142-201.
8. Longo D, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Jameson J, Loscalzo J. Harrison principios de medicina interna. 18<sup>a</sup> ed. México: Mc Graw Hill; 2012.
9. Castro AM. Bacteriología médica basada en problemas. 2<sup>a</sup> ed. México: El Manual Moderno; 2012.

10. Ochoa T, Contreras C. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children. *Curr Opin Infect Dis.* 2011;24(5): 478-483.
11. González-Siles L, Sjölin A. The different ecological niches of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Environmental Microbiology.* 2015; 10(1111): 1-11.
12. Vila J, Zboromyrska Y. Brotes epidémicos causados por *Escherichia coli* diarreagénicas. *Gastroenterol Hepatol.* 2012;35(2):89-93
13. Jahandeh N, Ranjbar R, Behzadi P, Behzadi E. Uropathogenic *Escherichia coli* virulence genes: invaluable approaches for designing DNA microarray probes. *Central European Journal of Urology.* 2015; 68: 452-458.
14. Wijetunge DS, Gongati S, DebRoy C, Kim KS, Couraud PO, Romero IA et al. Characterizing the pathotype of neonatal meningitis causing *Escherichia coli* (NMEC). *BMC Microbiology* (2015) 15:211.
15. Uribarren BT. Departamento de Microbiología y Parasitología Recursos en Bacteriología [sede Web], México: Facultad de Medicina UNAM; 2011 [actualizada 3 de agosto de 2015; acceso 5 de abril de 2016]. <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/escherichia-coli.html>
16. Koneman E, Allen S, Winn W, Procop G, Janda W, Woods G et al. Diagnóstico microbiológico texto y atlas en color. 6a ed. Buenos Aires: Médica Panamericana; 2006.

17. Mohawk K, O'Brien A. Mouse models of *Escherichia coli* O157:H7 infection and shiga toxin injection. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 2010;2011(258185):1-17.
18. Organización Mundial de la Salud [Internet]. OMS [Consulta: 10 de marzo de 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs125/es/>
19. Ho NK, Henry AC, Johnson-Henry K, Sherman PM. Pathogenicity, host responses and implications for management of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Can J Gastroenterol*. 2013;27(5):281-85.
20. Hacker J, Kaper J. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol*. 2000;54:641–79.
21. Franzin F, Sircili M. Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation. *BioMed Research International*. 2015;1-10.
22. Morabito S, Tozzoli R, Oswald E, Capriol A. A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*. *Infection and Immunity*. 2003;71(6):3343–48.
23. Kaper J. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Current Opinion in Microbiology*. 1998;1:103-108.

24. Mellies J, Baaron A, Carmona A. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infection and Immunity*. 2007;75(9):4199-4210.
25. Wong A, Pearson J, Bright MD, Munera D, Robinson KS, Lee SF et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Molecular Microbiology*. 2011;80(6):1420-1438.
26. Conollis J, Finlay B, Roe A. From ingestion to colonization: the influence of the host environment on regulation of the LEE encoded type III secretion system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6(568):1-15.
27. Galán J, Lara-Tejero M, Marlovits T, Wagne S. Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annu Rev Microbiol*. 2014;68: 415–438.
28. Diepold A, Wagner S. Assembly of the bacterial type III secretion machinery. *FEMS Microbiol Rev*. 2014;38:802–822
29. Gu L, Zhou S, Zhu L, Liang C, Chen X. Small-molecule inhibitors of the type III secretion system. *Molecules*. 2015;20:17659-17674.
30. Coburn B, Sekirov I, Finlay B. Type III systems and disease. *Clinical Microbiology Reviews*. 2007;20(4):535-549.
31. Garmendia J, Frankel G, Crepin V. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *American Society for Microbiology*. 2005;73(5):2573-2585.

32. Hartland E, Batchelor M, Delahay R, Hale C, Matthews S, Dougan G et al. Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. *Molecular Microbiology*. 1999;32(1):151-158.
33. Melton-Celsa A. Shiga toxin (Stx) classification, structure, and function. *Microbiol Spectr*. 2014;2(2):1-21.
34. Ibarra C, Goldstein J, Silberstein C, Zotta E, Belardo M, Repetto H. Síndrome urémico hemolítico inducido por *Escherichia coli* enterohemorrágica. *SciELO*. 2008;106(5).
35. Zhao X, Norris S, Liu J. Molecular architecture of the bacterial flagellar motor in cells. *Biochemistry*. 2014;53:4323–4333.
36. Duhan Q, Zhou M, Zhu L, Zhu G. Flagella and bacterial pathogenicity. *Journal of Basic Microbiology*. 2011;53:1-8.
37. Patrick J, Kearns D. Swarming motility and the control of master regulators of flagellar biosynthesis. *Mol Microbiol*. 2012;83(1):14–23.
38. Fahrner K, Berg H. Mutations that stimulate flhDC expression in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 2015;197(19):3087–3096.
39. Humbard MA, Maupin FJ. Prokaryotic proteasomes: nanocompartments of degradation. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2013; 23(0): 321–334.
40. Schrader E, Harstad K, Matouschek A. Targeting proteins for degradation. *Nat Chem Biol*. 2009;5(11): 815–822.

41. Gottesman S. Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annu Rev Genet*. 1996;30:465-506.
42. Tomoyasu T, Takaya A, Handa Y, Karata K, Yamamoto T. ClpXP controls the expression of LEE genes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*. 2005;253:59-66.
43. Iyoda S, Watanabe H. ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 2005;187(12):4086-4094.
44. Ingmer H, Bronsted L. Proteases in bacterial pathogenesis. *Research in Microbiology*. 2009;160:704-710.
45. Kitagawa R, Takay A, Yamamoto T. Dual regulatory pathways of flagellar gene expression by ClpXP protease in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2011;157:309.
46. Tsilibaris V, Maenhaut-Michel G, Van Melderen L. Biological roles of the lon ATP-dependent protease. *Research in Microbiology*. 2006;157:701-713.
47. Van Melderen L, Aertsen A. Regulation and quality control by lon-dependent proteolysis. *Research in Microbiology*. 2009;160:645-651.
48. Breidenstein E, Hancock R, Armand-Frappier. Outstanding student award-role of ATP-dependent proteases in antibiotic resistance and virulence. *Can J Microbiology*. 2012;59:1-8.

49. Datsenko K, Wanner B. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. PNAS. 2000;97(12):6640-6645.
50. González-y-Merchand J, Estrada-García I, Colston M, Cox R. A novel method for the isolation of mycobacterial DNA. FEMS Microbiology Letters. 1996;135:71-77.
51. Jackson M, Silva-Herzog E, Plano G. The ATP-dependent ClpXP and Lon proteases regulate expression of the *Yersinia pestis* type III secretion system via regulated proteolysis of YmoA, a small histone-like protein. Molecular Microbiology. 2004;54(5):1364–1378.
52. Bretz J, Losada L, Lisboa K, Hutcheson S. Lon protease functions as a negative regulator of type III protein secretion in *Pseudomonas syringae*. Molecular Microbiology. 2002;45(2):397–409.
53. De la Cruz MA, Morgan J, Ares MA, Yáñez-Santos JA, Riordan J, Girón JA. The two-component system CpxRA negatively regulates the locus of enterocyte effacement of enterohemorrhagic *Escherichia coli* involving  $\sigma^{32}$  and Lon protease. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2016;6:1-13.