



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE OPERONES
FIMBRIALES DE LA FAMILIA CHAPERONA-
USHER DE *Citrobacter rodentium*.**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

LICENCIADA EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A

STEPHANIE ORTIZ JIMÉNEZ

**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA**



CIUDAD UNIVERSITARIA, Cd. Mx., 2018



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.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Patógenos A/E</i>	1
1.2. <i>Isla de patogenicidad LEE</i>	3
1.3. <i>Citrobacter rodentium como modelo de estudio</i>	4
1.4. <i>Fimbrias</i>	5
1.4.1. Clasificación de las fimbrias	5
1.4.1.1. Fimbrias chaperona/usher.....	5
1.4.2.1. Elementos de DNA invertibles	8
1.4.2.2. Metilación de DNA	8
1.4.2.3. Concentración de c-di-GMP.....	8
1.4.2.4. Reguladores de unión a DNA	8
1.4.2.5. Regulación negativa por H-NS	9
1.4.2.6. Regulación negativa por StpA	10
2. ANTECEDENTES	10
2.1. <i>Fimbrias que juegan un papel durante la patogénesis de C. rodentium</i>	10
2.2.1. La fimbria CFC	11
2.2.2. La fimbria KFC	12
2.2.3. La fimbria GCF	12
3. JUSTIFICACIÓN	13
4. HIPÓTESIS	14
5. OBJETIVOS	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS	14
6.1. <i>Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento</i>	14
6.2. <i>Oligonucleótidos y reacciones en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	16
6.4. <i>Construcción de fusiones transcripcionales</i>	18
6.5. <i>Ensayos de actividad transcripcional (CAT)</i>	18
6.6. <i>Determinación del inicio de transcripción por Primer Extension</i>	19
6.7. <i>Predicción de promotores</i>	20
6.8. <i>Etiquetado de proteínas con FLAG</i>	20
6.9. <i>Western Blot</i>	21

6.10. Perfil de secreción	22
7. RESULTADOS.....	22
7.1. Los promotores de los operones <i>crf1</i> y <i>crf3</i> son activos en ausencia de H-NS.....	22
7.2. El promotor del operón <i>crf1</i> se expresa diferencialmente según el medio de cultivo y la fase de crecimiento.	25
7.3. El promotor del operón <i>crf1</i> es activo en ausencia de <i>StpA</i>	27
7.4. Identificación de la región mínima reguladora del operón <i>crf1</i>	28
7.5. Identificación del inicio de transcripción de <i>crf1</i>	29
7.6. Visualización de los posibles productos de la traducción de los transcritos de <i>crf1</i>	32
8. DISCUSIÓN	33
9. PERSPECTIVAS.....	37
10. REFERENCIAS.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Lesiones características de los patógenos A/E.....	1
Figura 2. Modelo del mecanismo de infección de los patógenos A/E.	2
Figura 3. Isla de patogenicidad LEE.....	3
Figura 4. Ensamblaje de fimbrias C/U.....	7
Figura 5. Mecanismos de represión por H-NS.	9
Figura 6. Esquema de la composición de los operones fimbriales <i>crf1</i> , <i>crf2</i> , <i>crf3</i> y <i>crf4</i>	23
Figura 7. Los promotores de los operones <i>crf1</i> y <i>crf3</i> son regulados negativamente por H-NS, mientras que los de <i>crf2</i> y <i>crf4</i> son inactivos.	24
Figura 8. El promotor del operón <i>crf1</i> se expresa preferencialmente en MM-N en ausencia de H-NS.	26
Figura 9. Actividad transcripcional del promotor del operón fimbrial <i>ecp</i> utilizado como control.....	26
Figura 10. El promotor del operón <i>crf1</i> es también regulado negativamente por StpA..	27
Figura 11. Esquema de las fusiones transcripcionales al gen reportero <i>cat</i> generadas para delimitar la región mínima reguladora del operón <i>crf1</i>	28
Figura 12. La región mínima reguladora del promotor del operón <i>crf1</i> se encuentra contenida dentro de la fusión <i>crf1_B</i>	29
Figura 13. Inicio de transcripción del operón <i>crf1</i>	30
Figura 14. Predicción de secuencias promotoras del operón <i>crf1</i>	31
Figura 15. Perfil de secreción de las cepas etiquetadas con FLAG.	33

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Abundancia de fimbrias C/U en enterobacterias.	6
Tabla 2. Operones identificados en <i>C. rodentium</i>	11
Tabla 3. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.....	15
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	16

DEDICATORIA

A toda mi familia:

A mamá, porque no sé hablar de mí sin mencionar su nombre. Gracias por todo tu esfuerzo, amor y apoyo. Gracias por enseñarme a no rendirme, y que no importa cuán alto uno llegue, siempre se puede llegar más arriba.

A papá, por apoyar siempre a mamá y por esforzarse en ser mejor para nosotros. Gracias por siempre darme alguna razón para pelear contigo, porque así la vida nunca es aburrida.

A Oscarín, porque no importa que ahora sea más alto que yo, siempre será mi bebé. Gracias por ser mi cómplice de vida.

A mamá Maya por siempre cuidar de todos. Gracias por todas las enseñanzas, amor y comprensión.

A papá Félix, gracias por siempre mostrar interés en las cosas que hago; por ir a mis partidos cuando nadie más lo hacía, y por siempre recibirme en casa con veinte mil preguntas de ciencia.

A mi tío Félix por ser además de tío y amigo, un padre más para mí. Gracias por la infancia que tuve contigo; por llevarme a jugar maquinitas, por enseñarme a jugar fútbol y por disparar las lalitas después de cada cascarita. Gracias por las veces que, aunque cansado, después del trabajo te sentabas conmigo a jugar canicas o tazos.

A mis tíos Kari y Leo, por siempre preocuparse de que tome las mejores decisiones para tener una mejor vida, y más gracias aun cuando me apoyan aunque no elija lo que ustedes piensan que es mejor para mí. Gracias por siempre estar atentos de que nada nos falte, gracias por ayudar a mamá conmigo, gracias porque sin ustedes cumplir esta meta hubiera sido muy complicado. Gracias infinitas.

A Sofía, por llegar a iluminar la vida de todos y hacerme sentir un cariño que nunca antes había sentido, por recordarme lo bonito de la inocencia de ser niño, por devolverme la emoción de hacer cosas que consideraría ridículas si no tuviera a cambio su sonrisa.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. José Luis Puente, por todo el apoyo brindado tanto en el ámbito académico como en el personal; por todas sus enseñanzas y por la confianza depositada en mí.

Gracias a Gus, por ser mi primer mentor en el laboratorio, y por enseñarme a hacer fusiones transcripcionales.

A todos los miembros del laboratorio: Lucy, Roger, Ema, Richard, Inés, Pao, Álvaro, Haydee, Ale, Carmen, Panchito, Deya, Claudia Paredes, Claudia Silva, Jess, Magda, Paloma, Lili, Esteban, Ismael, Marcos, Víctor, Ross, Amapola, Rebe y Mario; gracias por el compañerismo.

En especial quiero agradecer a Inés, Haydee y Pao por todas las enseñanzas; por ayudarme a resolver mis dudas y por enseñarme diversas técnicas. Niñas; muchas gracias por el apoyo y amistad.

También quiero agradecer a Esteban por ayudarme a hacer los experimentos de *primer extension*, además de agradecer su variado repertorio musical que amena el trabajo en el laboratorio.

Muchas gracias al Dr. Ismael por interesarse en este proyecto y en mi formación; gracias por las revisiones de tesis, los retos, los consejos, las llamadas de atención: gracias por todo el apoyo.

Y por último, quiero agradecer a Lucía Perezgasga Ciscomani, Marcos Fernández, Alejandra Vázquez y Francisco Javier Santana Estrada por el apoyo técnico, así como a la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (Programa UNAM-PAPIIT IN213516) por la beca de apoyo y, junto con CONACyT CB-239659 y FC-2015-2/950, por los recursos otorgados para la realización de este proyecto.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Patógenos A/E

Los patógenos A/E (“*Attaching and Effacing*”) se caracterizan por la unión estrecha a las células epiteliales del intestino (enterocitos) de sus hospederos, la eliminación de las microvellosidades presentes en estas células y por la formación de estructuras de actina tipo pedestal en las mismas (Frankel & Phillips, 2008; Frankel *et al.*, 1998) (Figura 1).

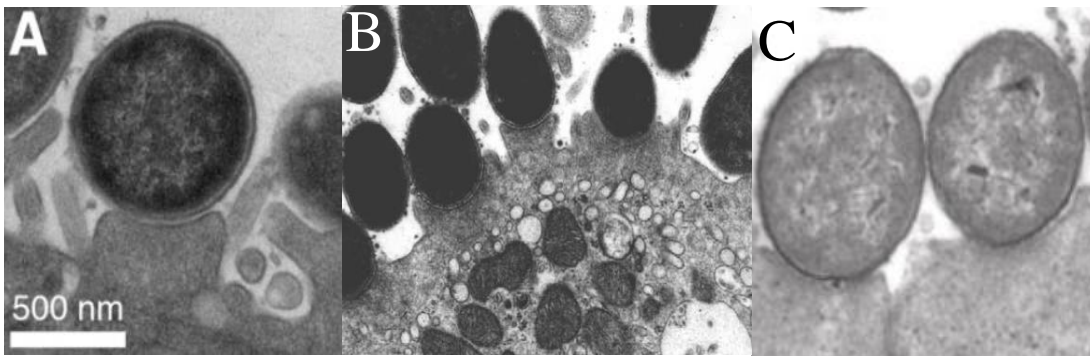


Figura 1. Lesiones características de los patógenos A/E. Micrografías de EHEC (a), EPEC (b) y *C. rodentium* (c). Se muestra la formación de los pedestales ricos en actina (Modificado de Campellone & Leong, 2003; Lai *et al.*, 2013; Mundy *et al.*, 2005).

Dentro de este grupo de bacterias se encuentran las patógenas para humanos *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) y *E. coli* enteropatógena (EPEC). EPEC es la principal causa de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, mientras que EHEC, principalmente el serotipo O157:H7, el cual produce toxinas tipo Shiga, puede causar el síndrome urémico hemolítico, caracterizado por fallas renales irreversibles, e incluso la muerte, principalmente en países desarrollados (Nataro & Kaper, 1998). Además, dentro de los patógenos A/E se encuentran EPEC de conejos (REPEC) y de cerdos (CEPEC), y *Citrobacter rodentium* que es un patógeno específico de ratones.

Los principales eventos de la patogénesis de este grupo de bacterias se dividen en tres etapas (Figura 2).

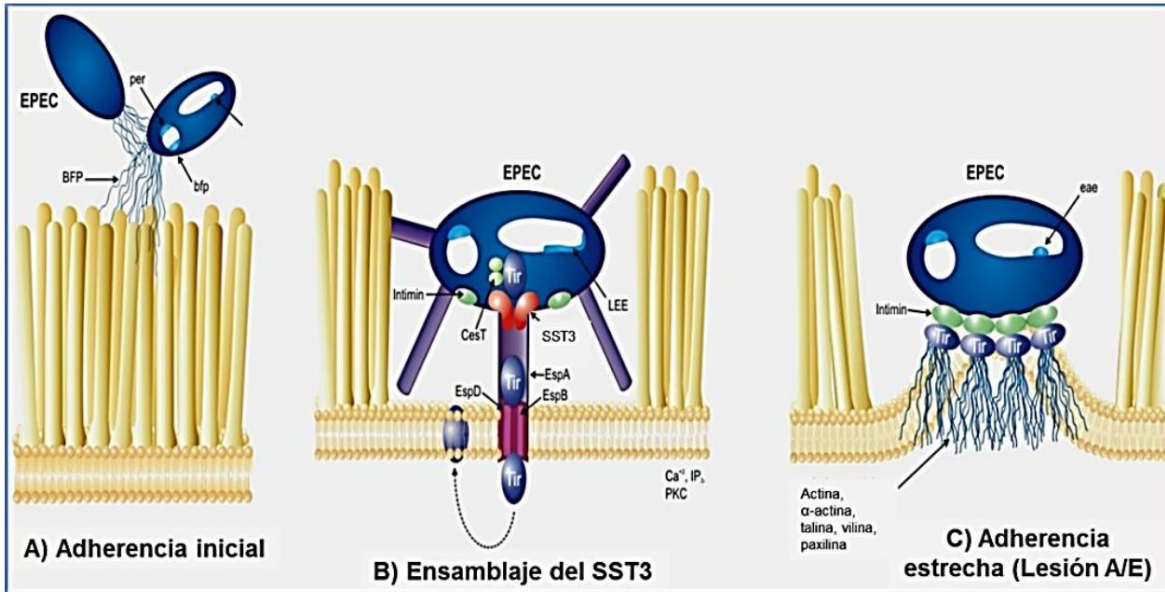


Figura 2. Modelo del mecanismo de infección de los patógenos A/E. En el caso de EPEC, la interacción de la bacteria con los enterocitos está mediada inicialmente por la fimbria tipo IV denominada BFP (del inglés “*bundle-forming pilus*”), la cual provoca un fenotipo característico conocido como adherencia localizada (a), posteriormente es necesario el ensamblaje del sistema de secreción tipo III o inyectisoma (b), pues vía este sistema se inyectan diversas proteínas efectoras, una de ellas, Tir, tras ser translocada al enterocito se inserta en la membrana plasmática donde funciona como receptor de la proteína de membrana externa Intimina, ocasionando una adherencia estrecha (c) entre la bacteria y el enterocito y la formación de pedestales ricos en actina (Tomado de <http://fernness.com/science-01.html>).

En primera instancia, la bacteria interactúa con los enterocitos provocando una adhesión inicial la cual puede estar mediada por fimbrias. En segundo lugar, debe acoplarse el sistema de secreción tipo III (SST3) para translocar, desde el citoplasma bacteriano hacia el citosol de la célula hospedera, diversas proteínas efectoras. Una de ellas es Tir (del inglés: “*Translocated Intimin Receptor*”), la cual se inserta en la membrana del enterocito y va a funcionar como receptor de la Intimina, una adhesina bacteriana localizada en la membrana externa de la bacteria. La interacción entre estas dos proteínas permite el establecimiento de una adherencia más estrecha o íntima entre la bacteria y el enterocito (Frankel *et al.*, 2001). Tir, además de cumplir su función como receptor, participa en el ensamblaje de actina, mediado por la activación de N-WASP (del inglés: “*Nucleation promoting factor neural Wiskott–Aldrich Syndrome*”) y el complejo ARP2/3 (del inglés: “*Actin-regulated protein 2/3*”), y el reclutamiento de otras proteínas del citoesqueleto al sitio de adherencia de la bacteria, función para la

cual su interacción con la Intimina es esencial (Campellone *et al.*, 2014 & Lai *et al.*, 2013).

1.2. Isla de patogenicidad LEE

Las proteínas responsables del fenotipo A/E se encuentran codificadas dentro de una isla de patogenicidad denominada LEE (del inglés “*Locus of Enterocyte Effacement*”) (Figura 3), la cual contiene 41 genes ordenados en siete operones; 5 policistrónicos (*LEE1-LEE5*), dos bicistrónicos (*LEE6-LEE7*) y cuatro unidades monocistrónicas (*etgA*, *cesF*, *map* y *escD*) (Gaytán *et al.*, 2016).

LEE codifica para componentes de un sistema de secreción tipo III (SST3), moléculas de adhesión a la membrana, la adhesina bacteriana intimina y el receptor de esta proteína (Tir), además de otras proteínas efectoras como EspB, EspF, EspG, EspH, EspZ/SepZ, y Map, así como a sus respectivas chaperonas (Deng *et al.*, 2001). Actualmente, se han descrito ocho chaperonas codificadas en esta isla: CesF, CesL, CesT, CesAB, CesD, CesD2, EscE y EscG/CesA2; a excepción de CesF y CesD2, todas estas chaperonas son cruciales para la virulencia de *C. rodentium* (Deng *et al.*, 2004 & Gaytán *et al.*, 2016).

El LEE también codifica proteínas reguladoras tales como Ler, GrIR y GrIA (Furniss & Clements, 2018), así como a las proteínas SepL y SepD que forman un interruptor molecular que confiere especificidad al SST3 para secretar a los diferentes efectores (Deng *et al.*, 2005).

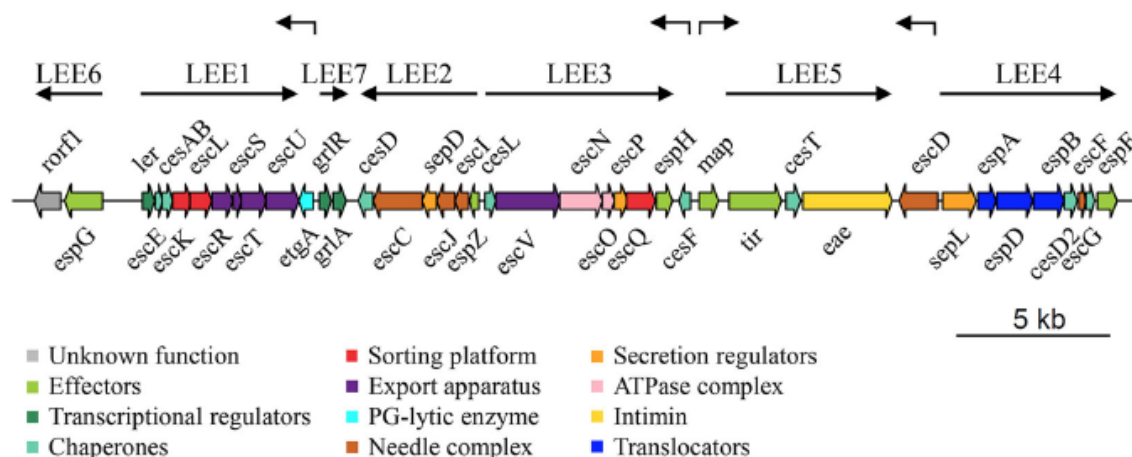


Figura 3. Isla de patogenicidad LEE. Estructura genética de la isla de patogenicidad LEE de EPEC (E2348/69 O127:H6). Se ilustran los genes contenidos dentro de cada operón y en la parte de abajo se describen las funciones propuestas para cada gen (Tomado de Gaytán *et al.*, 2016).

1.3. *Citrobacter rodentium* como modelo de estudio

Los patógenos A/E EPEC y EHEC no tienen un hospedero animal donde se reproduzca la infección que causan en humanos, lo cual limita el estudio de sus mecanismos de virulencia *in vivo*. Bacterias de la familia A/E que infectan otros mamíferos como REPEC (EPEC de conejos) y PEPEC (EPEC de cerdos), han sido utilizadas como modelos de estudio para generar conocimiento sobre los patógenos humanos EPEC y EHEC; sin embargo, REPEC ha dejado de ser modelo de estudio debido a la variabilidad en los niveles de colonización y de infección, y la dificultad de crear conejos genéticamente modificados (Crepin *et al.*, 2016), mientras que PEPEC también tiene sus limitaciones como modelo de estudio pues, además de ser un modelo caro, desarrolla inmunidad (Dean-Nystrom *et al.*, 2002). También se ha intentado infectar ratones con EHEC y EPEC, pero la colonización es ineficiente y no resulta en lesiones A/E (Mundy, 2005). Esta limitación fue solventada en parte con el hallazgo de *C. rodentium*, una bacteria altamente infecciosa causante de colitis e hiperplasia del colon transmisible en ratones de laboratorio (Mundy, 2005). *C. rodentium*, al igual que EPEC y EHEC, posee un LEE funcional (Deng *et al.*, 2001) y coloniza el lumen de la mucosa gástrica formando lesiones A/E (Schauer & Falkow, 1993) (Figura 1), lo cual hace de esta bacteria un modelo alternativo ideal para estudiar y entender mejor la patogénesis causada por patógenos A/E incluyendo, de manera indirecta, los patógenos humanos EPEC y EHEC. *C. rodentium* se identificó originalmente como *C. freundii* a partir de un brote que causó gran morbilidad y mortalidad en colonias de ratones durante la década de los 60's (Brennan *et al.*, 1965 & Muto *et al.*, 1969).

C. rodentium es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la familia Enterobacteriaceae. Tiene un genoma de 5.3 Mb, además de contener cuatro plásmidos. Aunque comparte secuencias genómicas con otros patógenos A/E, cuenta con 1585 secuencias codificantes sin ortólogos en EPEC o EHEC; sin embargo, el mecanismo de infección mediado por las funciones codificadas en el LEE, así como la mayoría de los efectores codificados fuera de esta isla de patogenicidad, se encuentran conservados entre los patógenos A/E (Petty *et al.*, 2010). El curso y efectos de la infección varía dependiendo del fondo genético del ratón, pudiendo llegar a ser fatal en algunas líneas de ratón o causar inflamación moderada y reversible del ciego y el colon (Borenshtein *et al.*, 2008).

La colonización por *C. rodentium* inicia en la superficie de tejido linfoide en el ciego unas horas después de haber sido ingerida. Durante los primeros dos a tres días post-infección (pi) la bacteria coloniza el colon distal, del cual es evidente el engrosamiento entre los días 5-14 pi debido al proceso inflamatorio causado por la bacteria, para posteriormente desaparecer al ser eliminada entre los días 21-28 pi

en una respuesta que involucra al sistema inmune y a la microbiota del hospedero (Wiles *et al.*, 2004; Mundy *et al.*, 2005; Kamada *et al.*, 2015).

1.4. Fimbrias

Las bacterias patógenas necesitan anclarse a las células hospederas del nicho que favorece su sobrevivencia y proliferación como paso crucial al momento de establecer una infección. Este proceso de colonización es mediado por adhesinas de la superficie bacteriana que reconocen receptores en la célula hospedera (Proft & Baker, 2009); sin embargo, debido a que tanto la bacteria como la célula hospedera tienen cargas negativas, se crea una fuerza de repulsión entre ambas. Una solución a este problema es presentar a la adhesina en la punta de una estructura filamentosa sobre la superficie bacteriana que le permita establecer la interacción adhesina-receptor manteniendo cierta distancia entre la bacteria y la célula hospedera evitando dicha repulsión (Proft & Baker, 2009). Estas estructuras reciben el nombre de fimbrias o pili y son apéndices que son utilizados, además de para la adherencia, para diversas funciones adicionales como: invasión, formación de biopelículas estableciendo interacciones entre las propias bacterias, movilidad y transporte de proteínas y DNA a través de las membranas (Waksman & Hultgren, 2009).

1.4.1. Clasificación de las fimbrias

Las fimbrias pueden ser clasificadas en cinco clases de acuerdo a su ruta biosintética: fimbrias chaperona-usher (C/U), fimbrias curli, fimbrias tipo IV, fimbrias dependientes del SST3 y las fimbrias de secreción tipo IV (Fronzes *et al.*, 2008).

1.4.1.1. Fimbrias chaperona/usher

Esta familia de fimbrias es la mejor caracterizada y más abundante en las enterobacterias (Tabla 1). Los genes involucrados en la biosíntesis de fimbrias C/U se encuentran organizados en operones que codifican, al menos, tres diferentes proteínas: una subunidad estructural principal (pilina), una chaperona que interviene en el plegamiento de las pilinas y una proteína *usher* o acomodadora que se encuentra anclada a la membrana externa y funge como soporte para el anclaje del filamento de pilinas (Nuccio & Bäumler, 2007).

Tabla 1. Abundancia de fimbrias C/U en enterobacterias.

Enterobacteria	Número de operones C/U	Referencia
<i>E. coli</i> Uropatógena (UPEC)	12	Welch <i>et al.</i> , 2002
EPEC O127:H6 E2348/69	9	Iguchi <i>et al.</i> , 2009
EPEC O55:H7 CB9615	14	Zhou <i>et al.</i> , 2010
EHEC O157:H7 EDL933	14	Perna <i>et al.</i> , 2001
<i>C. rodentium</i>	13	Petty <i>et al.</i> , 2010
<i>Proteus mirabilis</i>	17	Kuan <i>et al.</i> , 2014
<i>Yersinia</i> sp.	9	Chahuan <i>et al.</i> , 2016
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	12	Yue <i>et al.</i> , 2012

El proceso de ensamblaje fimbrial (Figura 4) requiere que todos los componentes involucrados en la biogénesis fimbrial, los cuales se sintetizan en el citoplasma, sean exportados hacia el periplasma, tarea que es realizada por el sistema de secreción Sec (Pugsley, 1993). Las subunidades fimbriales tienen un dominio incompleto de inmunoglobulina donde hace falta la séptima lámina- β , provocando la formación de una región altamente hidrofóbica (Proft & Baker, 2009). Una vez que son exportadas al periplasma interactúan con la chaperona formando un complejo estable que las protege de la degradación, agregación y polimerización prematura. Además, las ayuda a tener un correcto plegamiento pues la chaperona dona una lámina- β (denominada G1) para completar el dominio de la inmunoglobulina, proceso que recibe el nombre de “complementación de la cadena donadora” (DSC por sus siglas en inglés) (Proft & Baker, 2009). Una vez que el complejo chaperona/subunidad fimbrial es reconocido por el *usher*, se da una interacción pilina-pilina que facilita la liberación de las subunidades fimbriales y su secreción a través del canal formado por la proteína *usher* en la membrana, en un proceso muy parecido a DSC denominado “intercambio de la cadena donadora” (DSE, por sus siglas en inglés) (Nuccio & Bäumlér, 2007). En esta interacción una extensión amino terminal (N-te) de cada pilina desplaza la lámina- β donada por la chaperona (G1) de la pilina contigua, liberando a la chaperona la cual puede unirse de nuevo a una subunidad fimbrial libre en el periplasma.

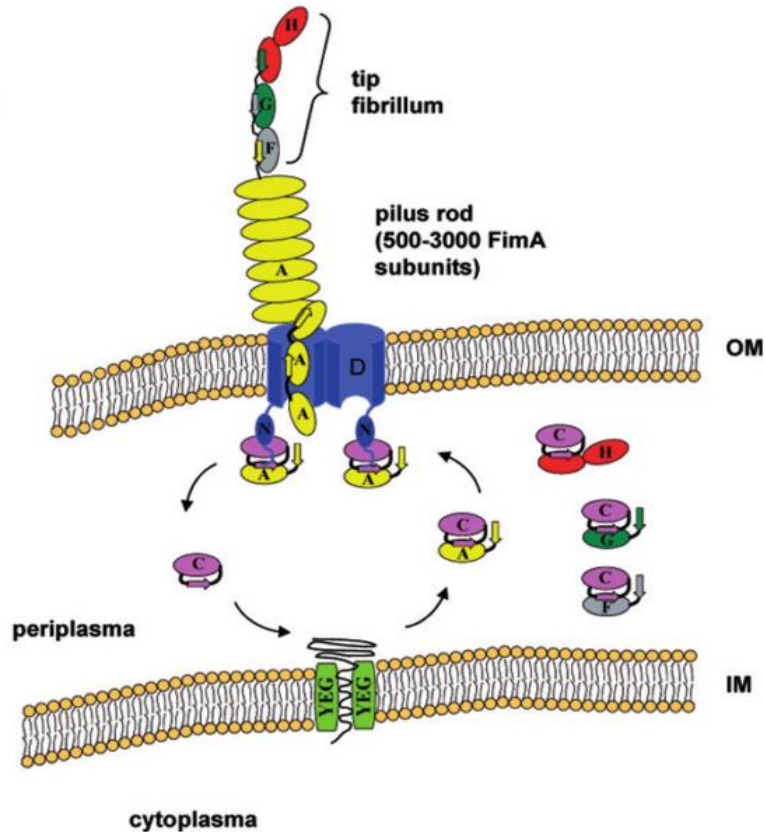


Figura 4. Ensamblaje de fimbrias C/U. Para el caso de la fimbria Tipo I, todos sus componentes son sintetizados en el citoplasma y exportados al periplasma por el translocón SecYEG. Las subunidades fimbriales principales (FimA), así como la adhesina (FimH) y otras subunidades adaptadoras (FimF y FimG), interactúan con la chaperona (FimC) mediante el proceso de DSC. Este complejo chaperona-subunidad fimbrial puede entonces interactuar con la proteína *usher* (FimD) donde se inicia el ensamblaje de las pilinas vía DSE (Tomado de Proft & Baker, 2009).

1.4.2. Regulación de fimbrias C/U

A pesar de la cercana filogenia entre los diferentes operones fimbriales de la familia C/U, los mecanismos y señales ambientales que controlan su expresión en una misma bacteria varían de manera significativa, lo cual parece favorecer que su función, en lugar de ser redundante, proporcione diversidad funcional a la bacteria en diferentes nichos y ambientes dentro o fuera del hospedero. Entre los mecanismos mejor estudiados de control a nivel transcripcional están: elementos de DNA invertibles, metilación del DNA, concentración de c-di-GMP y reguladores de unión a DNA. A continuación se describirán ejemplos de regulación por estos mecanismos en diversos operones fimbriales.

1.4.2.1. Elementos de DNA invertibles

La fimbria tipo I de *E. coli* es un ejemplo de fimbria regulada por elementos de DNA invertible. La transcripción de la subunidad fimbrial *FimA* está sujeta a la orientación de un elemento de DNA invertible llamado *FimS* el cual contiene al promotor de *FimA* flanqueado por dos secuencias repetidas invertidas de 9 pares de bases (pb) que son reconocidas por las recombinasas *FimB* y *FimE*. Además de la acción de las recombinasas, existen otros factores que pueden influir en la orientación de *FimS*, como Lrp (del inglés: “*leucine-responsive regulatory protein*”) e IHF (del inglés: “*integration host factor*”) que mantienen la orientación “on” (a favor de la transcripción de *FimA*), y H-NS (del inglés: “*histone-like nucleoid-structuring*”) que mantiene la orientación “off” desfavoreciendo la transcripción de la subunidad fimbrial (Cleg *et al.*, 2011).

1.4.2.2. Metilación de DNA

La expresión de la subunidad fimbrial principal de la fimbria Pap de *E. coli* (*papA*) está controlada por el estado de metilación de dos sitios GATC ubicados río arriba del promotor *papBA*. Además de la metilación, la concentración de Lrp y de una proteína reguladora fimbria-específica PapI también influyen en la transcripción de los genes de la fimbria Pap. A altas concentraciones de Lrp y a bajas concentraciones del regulador fimbria-específico PapI, Lrp es capaz de unirse a un sitio GATC cercano al promotor inhibiendo así la transcripción del operón fimbrial (Cleg *et al.*, 2011). La unión de Lrp al sitio GATC ocurre cuando no está metilado, y Lrp tiene que competir con la DNA adenin metilasa (Dam) por este sitio de unión (Peterson & Reich, 2008). Al contrario, cuando la concentración de Lrp es baja y la del regulador PapI alta, Lrp se une al sitio GATC distal al promotor, permitiendo que Dam metile el sitio GATC cercano al promotor pero permitiendo la metilación completa del sitio GATC proximal al promotor. En esta condición la transcripción del operón *pap* puede ocurrir.

1.4.2.3. Concentración de c-di-GMP

La fimbria tipo 3 de *Klebsiella pneumoniae* además de estar involucrada en la adhesión celular, también participa en la producción de biopelícula. Cuando el gen que codifica para la diguanilato fosfodiesterasa MrkJ es eliminado, el di-GMP cíclico se acumula dentro de la bacteria induciendo la transcripción del gen que codifica para la subunidad fimbrial (*mrkA*) y por ende, la expresión de la fimbria tipo 3 (Johnson & Clegg, 2010).

1.4.2.4. Reguladores de unión a DNA

Además de los mecanismos de regulación ya antes mencionados, existen otras proteínas de unión a DNA que están involucradas en la regulación de operones fimbriales. Un ejemplo de ello se puede ver en la fimbria tipo I de *Salmonella*

Typhimurium, la cual se codifica dentro del operón *fim*, que codifica para la fimbria tipo I, se regula por los productos de tres genes reguladores, *fimW*, *fimY* y *fimZ*. FimZ posee un dominio de unión a DNA que le permite unirse directamente a la región promotora de *fimA* (Yeh *et al.*, 2002) y su actividad es modulada positivamente vía interacciones proteína-proteína por el co-activador FimY. FimW es un regulador negativo que reprime la expresión de *fimY* uniéndose a su promotor, e inhibe la función de FimY al unirse a este activador. A su vez, la expresión de *fimZ*, y por tanto la producción de la fimbria tipo I, está regulada positivamente por Lrp, la cual se une a la región reguladora de *fimZ* favoreciendo la expresión de este gen (Cleg *et al.*, 2011).

1.4.2.5. Regulación negativa por H-NS

H-NS (por sus siglas en inglés: *histone-like nucleoid structuring protein*) es una proteína asociada al nucleoide bacteriano que, además de condensar al DNA, funciona como un regulador pleiotrópico por su capacidad de unirse a diversas regiones en el DNA caracterizadas por tener un mayor contenido de adeninas y timinas (A-T) con respecto al promedio del genoma (Grainger, 2016). Tanto los genes adquiridos por transferencia horizontal, así como las regiones promotoras contienen gran cantidad de A-T, por lo que H-NS regula la expresión de numerosos genes por lo que es considerado un regulador global en bacterias Gram-negativas.

H-NS cuenta con un dominio de oligomerización en el amino terminal, un dominio de unión a DNA en el carboxilo terminal y una región flexible que conecta ambos dominios (Dorman, 2004). Estas características le permiten a H-NS polimerizar sobre el DNA formando un filamento de nucleoproteína o establecer interacciones entre regiones distales en el DNA para formar un complejo nucleo-represor y de esta manera reprimir transcripción ya sea bloqueando el sitio de unión de la RNA polimerasa, obstruyendo el proceso de elongación o atrapando a esta enzima en bucles de DNA (Figura 5) (Lim *et al.*, 2012).

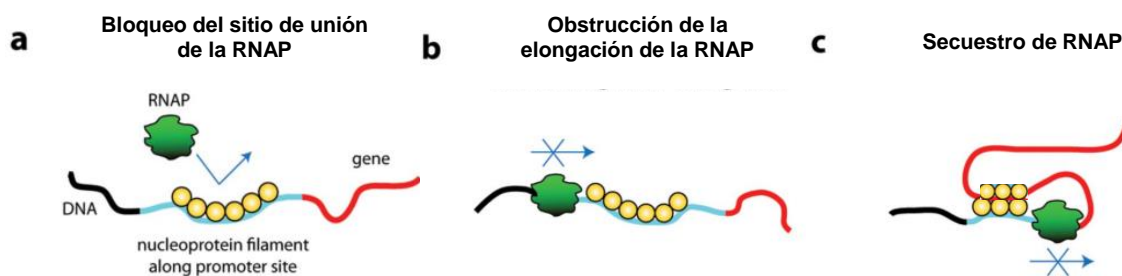


Figura 5. Mecanismos de represión por H-NS. Una vez que se ha formado el filamento de nucleoproteína, H-NS puede reprimir la transcripción por tres vías: la polimerización

puede ocurrir en el sitio de unión de la RNA polimerasa al promotor, actuando como una barrera física que evita que la enzima forme el complejo cerrado y por tanto inicie transcripción (a); el filamento puede obstruir el proceso de elongación una vez iniciada la transcripción actuando como una barrera física que, aunque permite la unión de la enzima, no permite que el complejo abierto avance (b); H-NS puede mediar interacción entre dos hebras de DNA distales permitiendo la formación de bucles que pueden encerrar a la RNAP y/o al represor evitando que ocurra la transcripción (c) (Modificado de Lim *et al*, 2012).

Se sabe que H-NS regula negativamente la expresión de operones fimbriales pertenecientes a los patógenos A/E. Tal es el caso de las fimbrias ECP (“*E. coli common pilus*”) en EPEC y EHEC, LPF (por sus siglas en inglés: “*long polar fimbriae*”) en EHEC y GCF (por sus siglas en inglés: “*gut colonization fimbriae*”) en *C. rodentium* (Martínez-Santos *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2007; Caballero-Flores, *et al.*, 2015).

1.4.2.6. Regulación negativa por StpA

StpA (por sus siglas en inglés: *suppressor of td mutant phenotype A*) al igual que H-NS, es una proteína del nucleóide bacteriano que se une de manera específica a regiones ricas en A-T (Luijsterburg *et al.*, 2006). StpA comparte 52% de identidad con H-NS, los aminoácidos que se conservan en ambas proteínas se encuentran mayoritariamente en los dominios de dimerización y de unión a DNA, por ello StpA y H-NS interactúan formando heterómeros (Leonard *et al.*, 2009). StpA se encuentra en una concentración menor comparada con H-NS y en parte se debe a que H-NS se transcribe de manera constitutiva, mientras que StpA es dependiente de la disponibilidad de nutrientes (Free & Dorman, 1997). La interacción entre estas proteínas es posible incluso cuando una de estas dos se encuentra truncada (Johansson *et al.*, 2001). Se sabe que el operón *bgl* es regulado por H-NS (Schnetzer *et al.*, 1996); sin embargo, cuando H-NS se encuentra de manera truncada y es incapaz de unirse al DNA, StpA funciona como un adaptador que le permite a H-NS reprimir la actividad del operón.

2. ANTECEDENTES

2.1. Fimbrias que juegan un papel durante la patogénesis de *C. rodentium*

El análisis de la secuencia del genoma de *C. rodentium* reveló la presencia de 19 operones fimbriales, 13 de los cuales son de la familia C/U (Petty *et al.*, 2010) (Tabla 2). Se sabe muy poco de estos operones y, a la fecha, únicamente para tres de ellos se ha reportado su participación durante el proceso de colonización en ratón: *cfcABCDEFGHIJPV*, que codifica para la fimbria tipo IV denominada

CFC (Mundy *et al.*, 2003); y los operones de la familia chaperona/usher *kfcHGFEDC*, que codifica para la fimbria KFC (Tatsuno *et al.*, 2006) y *gcfFGABCDE*, que codifica para la fimbria GCF (Caballero-Flores *et al.*, 2015).

Tabla 2. Operones identificados en *C. rodentium*.

Operón	Número acceso	Nombre asignado	Descripción
1	ROD_01101-01121	<i>hofCB-ppdD</i>	Fimbria Tipo IV
2	ROD_03641-03671	<i>gcfFGABCDE</i>	Chaperona/Usher
3	ROD_10951-11021	<i>CsgGFDBAC</i>	Fimbria Curli
4	ROD_11771-11791	<i>crf1^a</i>	Chaperona/Usher
5	ROD_18141-18181	<i>lpfEDCBA</i>	Chaperona/Usher
6	ROD_19341-19381	<i>crf2^a</i>	Chaperona/Usher
7	ROD_22311-22341		Chaperona/Usher
8	ROD_27771-27801	<i>crf3^a</i>	Chaperona/Usher
9	ROD_29101-29191	<i>FimBEAICDFGHK</i>	Chaperona/Usher
10	ROD_29201-29241	<i>ecpABCDE</i>	Chaperona/Usher alterna
11	ROD_29351-29391		Chaperona/Usher
12	ROD_34961-35021	<i>crf4^a</i>	Chaperona/Usher
13	ROD_41241-41291	<i>kfcHGFEDC</i>	Chaperona/Usher
14	ROD_41381-41551	<i>tadZABCD, tadVEGF</i>	Fimbria Tipo IV
15	ROD_44281-44321	<i>hofMNOPQ</i>	Fimbria Tipo IV
16	ROD_46461-46571	<i>cfcABCDEFHGHIJPV</i>	Fimbria Tipo IV
17	ROD_50611-50651		Chaperona/Usher
18	ROD_p1161-1201		Chaperona/Usher
19	ROD_p1291-1301		Chaperona/Usher

^a operones estudiados en este trabajo.

Modificado de Petty *et al.*, 2010.

2.2.1. La fimbria CFC

La fimbria CFC (por sus siglas en inglés: “*Colonization Factor Citrobacter*”), es una fimbria Tipo IV que fue identificada gracias a un experimento de mutagénesis (STM por sus siglas en inglés: “*signature-tagged mutagénesis*”) realizado por Mundy *et al.*, (2003). Una de las mutantes resultantes presentó una inserción de transposón en el gen *cfcH*, una ATPasa del operón fimbrial (ROD_46461–46571), que le impedía colonizar el colon de ratones, pues no se detectaban cuentas bacterianas en el excremento de los ratones infectados 3 días después de la infección. Se ha propuesto que CFC puede estar cumpliendo la función en *C. rodentium* que BFP cumple en EPEC, al ser ambas fimbrias Tipo IV, y estar involucradas en la colonización a sus respectivos hospederos.

2.2.2. La fimbria KFC

La fimbria KFC (por sus siglas en inglés: “*K99-like Factor Involved in Citrobacter Colonization*”) fue descrita por Hart *et al.*, (2008) tras determinar que el operón *kfc* es regulado por RegA (por sus siglas en inglés: “Regulator factor A”), un regulador de la familia AraC considerado un regulador global de virulencia en *C. rodentium*. K99 es una adhesina perteneciente a la familia C/U, la cual juega un papel muy importante durante la colonización de ETEC (*E. coli* enterotoxigénica) a sus hospederos. Por lo anterior, se construyó una mutante en *kfcC* (gen homólogo a *k99*), el cual codifica para la subunidad fimbrial principal, y se evaluó su capacidad de colonización en ratones. Durante los primeros 10 días post-infección (pi) las cuentas bacterianas presentes en las heces de ratones infectados con la cepa mutante eran muy parecidas a las obtenidas de aquellos ratones inoculados con la cepa silvestre, 6×10^8 CFU/g y 4×10^8 CFU/g, respectivamente. Sin embargo, durante los días 15-20 pi se encontraron cuentas bacterianas menores en los ratones inoculados con la cepa mutante, que en aquellos inoculados con la cepa silvestre, sugiriendo que KFC es importante para la colonización en ratón en etapas tardías o para persistir el en hospedero. La activación del operón *kfc* mediada por RegA sucede únicamente en presencia de bicarbonato (Yang *et al.*, 2008). Interesantemente, este regulador que no está conservado en EPEC y EHEC también coordina la expresión de los genes del LEE a través de la activación del operón *grlRA* (Yang *et al.*, 2010).

2.2.3. La fimbria GCF

La fimbria GCF fue descrita en nuestro grupo por Caballero *et al.* (2015), pertenece también a la familia C/U y está codificada por el operón *gcfFGABCDE* (ROD_03641–03671). En ensayos *in vitro* utilizando diferentes condiciones de crecimiento con variación en medios de cultivo, pH, temperatura, presencia o ausencia de CO₂ y diferentes fases de crecimiento (latente, exponencial o estacionaria), no se logró ver expresión de una fusión transcripcional de la región reguladora de este operón fimbrial a un gen reportero; sin embargo, en ensayos de colonización en ratones, mutantes en la subunidad fimbrial principal (*gcfA*) no mostraron la misma habilidad para colonizar el colon de ratón comparado con la cepa silvestre. En las cuentas bacterianas obtenidas a partir de las heces de ratones no se encontraron diferencias en los primeros 3 días pi, pero sí en el día 7 pi, donde se encontraron hasta 3 veces más bacterias en las heces de ratones inoculados con la cepa silvestre, comparado con la mutante $\Delta gcfA$, fenotipo que se mantuvo hasta el día 10 pi. Estos resultados sugieren que la expresión de la fimbria se encuentra restringida a condiciones específicas dentro del ratón, así como a una etapa específica durante la colonización. Se determinó también que el

regulador global H-NS es, al menos en parte, responsable de mantener reprimida la expresión del operón bajo condiciones de crecimiento *in vitro*. Además de que H-NS se une a la región reguladora del operón fimbrial, la mutante en *hns* mostró actividad del promotor del operón y que ésta se regula de manera diferencial en los medios evaluados LB, DMEM, MM-N, demostrando que, además de estar regulada por H-NS, la activación de este operón fimbrial puede ser modulada por las condiciones de crecimiento en ausencia del represor. A la fecha, se desconoce el regulador que abate la represión mediada por H-NS, así como la señal que *in vivo* activa de manera natural la expresión de *gcf*.

3. JUSTIFICACIÓN

Como agentes causales de diarrea en niños (EPEC) o de trastornos más severos como el síndrome urémico hemolítico tanto en niños como en adultos (EHEC), los patógenos humanos A/E tienen un impacto importante en la salud mundial; sin embargo, el estudio de EPEC y EHEC se ve limitado ante la falta de un modelo animal. *C. rodentium*, al ser un patógeno que causa la lesión A/E en su hospedero natural el ratón de laboratorio, permite estudiar las bases moleculares *in vivo* de la patogénia de esta familia de bacterias, Además de ser su hospedero específico, el ratón es un modelo animal convencional que permite la manipulación tanto del patógeno como del hospedero.

Se sabe que durante el mecanismo de patogénesis de la familia A/E, las bacterias deben adherirse a los enterocitos y que esta interacción está mediada en parte por fimbrias Tipo IV como BFP en EPEC y CFC en *C. rodentium*. A su vez, fimbrias de la familia C/U, como KFC y GCF, también son importantes durante diferentes etapas en el proceso de colonización en ratón, y que su expresión depende de las condiciones ambientales y de la participación de varios reguladores. Las fimbrias C/U son las más abundantes dentro de las enterobacterias, y se sabe son factores de virulencia importantes durante la infección del tracto urinario y gastrointestinal. Por ello es de nuestro interés investigar de manera integral si este repertorio fimbrial es redundante o si provee ventajas funcionales diversas a las bacterias que lo poseen, ya sea dentro del hospedero, o durante su paso por algún reservorio ambiental.

En conjunto, el estudio integral de la regulación de la expresión, así como de la biogénesis y función del repertorio fimbrial C/U de un patógeno bacteriano modelo, permitirá profundizar en el entendimiento de los mecanismos que le permiten establecer exitosamente una infección y de las interacciones que establece con el hospedero, generando conocimiento básico extrapolable a otros patógenos y, esperamos, las bases para implementar estrategias novedosas o mejoradas para

la prevención y tratamiento de infecciones causadas por bacterias intestinales patógenas.

4. HIPÓTESIS

Cada operón fimbrial de la familia C/U de *Citrobacter rodentium* es activo en un nicho particular en respuesta a señales específicas y regulado diferencialmente permitiendo que el amplio repertorio fimbrial ofrezca a la bacteria diversidad funcional dentro y fuera del hospedero.

5. OBJETIVOS

Objetivos Generales

Analizar la expresión y regulación de los operones fimbriales *crf1*, *crf2*, *crf3* y *crf4* de la familia C/U en *C. rodentium*.

Objetivos Particulares

1. Crear fusiones de los cuatro operones fimbriales utilizando como sistemas reporteros el operón *lux* y el gen *cat*.
2. Determinar el papel de los reguladores H-NS y StpA en la expresión de estos operones.
3. Analizar la cinética de expresión de estos operones en *C. rodentium* en diferentes condiciones de crecimiento.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento.

Todas las cepas y plásmidos ocupados se enlistan en la Tabla 3. Los preinóculos se crecieron en 5 mL de medio LB ("Luria Bertani" pH 7.4 conteniendo: 10 g/L de bacto triptona, 5g/L de extracto de levadura y 10 g/L NaCl) con el antibiótico correspondiente (kanamicina (Km 30 µg/mL), ampicilina (Amp 200 µg/mL), estreptomycin (Stp, 100 µg/mL) o tetraciclina (Tc 12 µg/mL) a 37°C durante toda la noche. De estos cultivos se tomaron 100 µl para inocular 5mL de medio LB, DMEM ("Dulbecco's Modified Eagle's Medium", Gibco pH 7.4) o Medio Mínimo

(KCl 5mM, (NH₄)₂SO₄ 7mM, K₂SO₄ 0.5 mM, KH₂PO₄ 1mM, casaminoácidos 1g/L, MgCl₂ 200mM, glucosa 0.5% a pH 7.5).

Tabla 3. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

CEPAS	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
<i>C. rodentium</i>		
DBS100	<i>C. rodentium</i> DBS100 silvestre	Schauer & Falkow, 1993
DBS100 11771-FLAG	DBS100 <i>ROD_11771::3xFLAG-Km</i>	Este estudio
DBS100 11791-FLAG	DBS100 <i>ROD_11791::3xFLAG-Km</i>	Este estudio
JPCR13	DBS100 Δ <i>hns::FRT</i>	Caballero <i>et al.</i> , 2015
JPCR4	DBS100 Δ <i>stpA::Km</i>	Caballero <i>et al.</i> , 2015
<i>E. coli</i>		
DH10 β	F- <i>endA1 deoR⁺ recA1 galE15 g alK16 nupG rpsL Δ(lac)X74 ϕ 80lacZΔM15 araD139 Δ(ara, l eu)7697 mcrA Δ(mrr- hsdRMS-mcrBC) Str^R λ⁻</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
PLÁSMIDOS		
pKK232-8	Contiene el gen reportero <i>cat</i> sin promotor	Pharmacia Biotec
pCS26-pac	Contiene el operón <i>lux</i> de <i>Photobacterium luminescens</i> sin promotor	Bjarnason <i>et al.</i> , 2003
pT6-HNS-G _{113D}	Derivado de pMPM-T6 ϕ que expresa H-NS trunca en el C-terminal bajo la actividad de un promotor inducible con arabinosa	Bustamante <i>et al.</i> , 2018
pKD46	Codifica para las proteínas del sistema recombinasa λ red	Datsenko & Wanner, 2000
pSUB11	Plásmido templado que contiene el casete 3XFLAG-Km	Uzzau <i>et al.</i> , 2001

pKK-pecpA1	Fusión <i>pecpA1-cat</i> de -494 a +211	Martínez-Santos <i>et al</i> , Datos no publicados
pKK-CRF1_A	Fusión <i>crf1-cat</i> de -393 a +37	Este estudio
pKK-CRF1_B	Fusión <i>crf1-cat</i> de -221 a +37	Este estudio
pKK-CRF1_C	Fusión <i>crf1-cat</i> de -130 a +37	Este estudio
pKK-CRF1_D	Fusión <i>crf1-cat</i> de -393 a -135	Este estudio
pKK-CRF2	Fusión <i>crf2-cat</i> de -471 a +40	Este estudio
pKK-CRF3	Fusión <i>crf3-cat</i> de -221 a +55	Este estudio
pKK-CRF4	Fusión <i>crf4-cat</i> de -597 a +105	Este estudio
pCS26-CRF1_A	Fusión <i>crf1-lux</i> de -393 a +37	Este estudio
pCS26-CRF2	Fusión <i>crf2-lux</i> de -471 a +40	Este estudio
pCS26-CRF3	Fusión <i>crf3-lux</i> de -221 a +55	Este estudio
pCS26-CRF4	Fusión <i>crf4-lux</i> de -597 a +105	Este estudio

6.2. Oligonucleótidos y reacciones en cadena de la polimerasa (PCR).

Todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se diseñaron utilizando la plataforma “IDT-DNA oligo analyzer” (www.idtdna.org) y se enlistan en la Tabla 4. Éstos se sintetizaron en la Unidad de Síntesis de ADN del Instituto de Biotecnología-UNAM. Las reacciones de PCR se prepararon utilizando buffer 1X, 5 µM de MgCl₂, 200 µM de dNTP's, 1 µL de Taq polimerasa (Fermentas), 40 pMol de cada oligonucleótido, 100 ng de DNA templado y agua libre de nucleasas para aforar las reacciones en 100µL. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador “PCR system 9700” (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 5 min a 94°C; 30 ciclos de 94°C-45 s, 56°-64°C-45 s y 72°C-30-130 s; y una extensión final de 10 min a 72°C. Los valores de la T_m y extensión variaron dependiendo del oligonucleótido y del tamaño de la región que se quería amplificar.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

OLIGO	SECUENCIA 5´-3´	USO
Oligos para fusiones transcripcionales		
11771 Lux Fw	CTCTAT <u>CTCGAG</u> TCCTAACACCCTGCACGGTAC	Fusión <i>crf1-lux</i>
11771 Lux Rv	TGGACG <u>GGATCC</u> TAAGTGTTGCGGATAATACT	Fusión <i>crf1-lux</i>

19381 Lux Fw	ACAATG <u>CTCGAG</u> AGCATGAAAATCACGATAAG	Fusión <i>crf2-lux</i>
19381 Lux Rv	GCGGAA <u>GGATCC</u> AAATGCCAGCCATACCCAG	Fusión <i>crf2-lux</i>
34961 Lux Fw	CTTAAC <u>CTCGAG</u> TTCAGCAATGCCTGCGTCAA	Fusión <i>crf4-lux</i>
34961 Lux Rv	GGTATT <u>GGATCC</u> CTCACCTGGAATTGATCTG	Fusión <i>crf4-lux</i>
27801 Lux Fw	AGAAAA <u>CTCGAG</u> TACCAAAGATAGGCAGTGCA C	Fusión <i>crf3-lux</i>
27801 Lux Rv	AGTCTA <u>GGATCC</u> ACGTTGATACGCTCGCCATC	Fusión <i>crf1-lux</i>
11771 CAT Fw	CTCTAT <u>GGATCC</u> TCCTAACACCCTGCACGGTA C	Fusiones <i>crf1_A-cat</i> , <i>crf1_B-cat</i> y <i>crf1_C-cat</i>
11771 CAT Rv	TGGACG <u>AAGCTT</u> TAAGTGTGCGGATAATACT	Fusiones <i>crf1_A-cat</i> y <i>crf1_D-cat</i>
19381 CAT Fw	ACAATG <u>GGATCC</u> AGCATGAAAATCACGATAAG	Fusión <i>crf2-cat</i>
19381 CAT Rv	GCGGAA <u>AAGCTT</u> AAATGCCAGCCATACCCAG	Fusión <i>crf2-cat</i>
34961 CAT Fw	CTTAAC <u>GGATCC</u> TTCAGCAATGCCTGCGTCAA	Fusión <i>crf4-cat</i>
34961 CAT Rv	GGTATT <u>AAGCTT</u> CTCACCTGGAATTGATCTG	Fusión <i>crf4-cat</i>
27801 CAT Fw	AGAAAA <u>GGATCC</u> TACCAAAGATAGGCAGTGCA C	Fusión <i>crf3-cat</i>
27801 CAT Rv	AGTCTA <u>AAGCTT</u> ACGTTGATACGCTCGCCATC	Fusión <i>crf3-cat</i>
11771-B C-Fw	ACGC <u>GGATCC</u> TCTCTGTATGTATTTATAAG	Fusión <i>crf1_B-cat</i>
11771-C C-Fw	GCAA <u>GGATCC</u> CTAATGTTATCTCATGCTAC	Fusión <i>crf1_C-cat</i>
11771-D C-Rv	AGAG <u>AAGCTT</u> TGAGTGTAACCACTAAGT	Fusión <i>crf1_D-cat</i>
Oligos para etiquetar cepas con la secuencia del epítoto FLAG		
11771-FW- FLAG	TAATATCCGTCAGGATTTACC	ROD_11771::3x FLAG-Km
11771-RV- FLAG	CGGATAAATACTGGTATCAAAG	ROD_11771::3x FLAG-Km
11771-H1- FLAG	GGAATTGAAGTCCCGAGCTTTACTGCCGACCT GAATGCCGAGGACTACAAAGACCATGACGG	ROD_11771::3x FLAG-Km
11771-H2- FLAG	AACACAGCGGGTAAGGCAGCTTTTTTTAAGCAT AACCGCCCCCATATGAATATCCTCCTTAG	ROD_11771::3x FLAG-Km
11791-FW- FLAG	CACCCGTTTATTTGCGCAACA	ROD_11791::3x FLAG-Km
11791-RV- FLAG	TGCTGCCTATCACCTTAAACA	ROD_11791::3x FLAG-Km
11791-H1- FLAG	ACGGTCATTGAGGCGGATATTCGCTGGCAGCT GCTGACAAAAGACTACAAAGACCATGACGG	ROD_11791::3x FLAG-Km

11791-H2-FLAG	GAAAATGCCCGACAGCGCATGTCTGGGCACAGC GGTTTCAACGCATATGAATATCCTCCTTAG	ROD_11791::3x FLAG-Km
K1-Rev	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	Casete de kanamicina
K2-Rev	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	Casete de kanamicina
Oligos para <i>primer extension</i>		
pKK-Seq1	CAACGGTGGTATATCCAGTG	<i>Primer extensión</i> marcado con [γ - 32P]-ATP

6.4. Construcción de fusiones transcripcionales.

Una vez obtenidos los productos de PCR, éstos se purificaron con el kit “High pure PCR Product Purification Kit” (Roche). Para la generación de las fusiones a *cat* y *lux* los fragmentos fueron digeridos con las enzimas de restricción BamHI y HindIII o BamHI y XhoI (Thermo Scientific) y ligados a los vectores pKK232-8 (*cat*) o pCS26 (*lux*) digeridos con las mismas enzimas, respectivamente. La reacción de ligasa se llevó a cabo con 2 μ l de buffer y 2 μ l de ligasa (Thermo Scientific) y aproximadamente 500 ng de inserto y 100 ng de vector en un volumen final de 25 μ l. La reacción se incubó toda la noche a 15°C.

Diez μ l de cada reacción de ligasa fueron usados para transformar por electroporación células competentes de la cepa de *E. coli* DH10 β , las cuales fueron preparadas a partir de cultivos en LB de 100 mL crecidos a una D.O₆₀₀ de 0.6 a 0.8. Se sometieron a 3 lavados con agua estéril y glicerol a 4°C y se concentraron en alícuotas de 100 μ l. Las transformantes fueron seleccionadas en placas de LB agar con 100 μ g/ml de ampicilina para la selección de construcciones derivadas del pKK232-8 y con 30 μ g/ml de kanamicina para las derivadas del pCS26. La presencia de plásmidos con inserto en las colonias seleccionadas en presencia de los respectivos antibióticos fue corroborada por PCR utilizando los oligonucleótidos correspondientes a cada fusión (Tabla 4).

Los plásmidos con inserto fueron purificados con el kit “Zyppi™ Plasmid Miniprep Kit” (Zymo Research) y confirmados por secuenciación en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología-UNAM. Las fusiones confirmadas (Tabla 3) se transformaron en las cepas de *C. rodentium* DBS100 silvestre, Δ *hns* y Δ *stpA*.

6.5. Ensayos de actividad transcripcional (CAT)

Este ensayo se basó en el protocolo descrito por Puentes *et al.*, (1996). Partiendo de preinóculos de las cepas con las fusiones de interés, se inocularon tubos con 5

mL de medio LB, MM-N o DMEM y se incubaron a 37°C con agitación hasta que alcanzaron cierta densidad óptica (0.6, 0.8 o 1.0 según el experimento). De cada cultivo se colectaron 1.5 mL en un tubo Eppendorf y la pastilla celular se cosechó por centrifugación a 13500 rpm. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con buffer TDTT (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, DTT (dithiothreitol) 3 μ M), se centrifugó nuevamente y se resuspendió en 300 μ L de este mismo buffer. Las muestras se sonicaron en el equipo “Soniprep 150” (Vibra Cell) con un amplitud de 35% durante 10 segundos con periodos de 5 segundos de descanso por una total de 3 minutos. Las muestras sonicadas se centrifugaron 15 minutos a 13000 rpm y el sobrenadante se transfirió a tubos limpios. En placas de 96 pozos se cargaron 10 μ L de cada extracto más 200 μ L de “BCA Protein Assay Reagent” (Pierce) para cuantificar proteína. La placa se incubó a 37°C durante 30 minutos, una vez transcurrido este tiempo se determinó la absorbancia de cada pozo en un lector de microplaca “CERES 900C” (Bio-Tek) a 562 nm con el programa KC3. Para determinar la concentración de proteína los valores obtenidos se extrapolaron en forma automatizada a una curva estándar de concentración de proteína en μ g/ml. Para medir la actividad de CAT se cargaron 5 μ L de cada extracto más 200 μ L de una mezcla de reacción que contiene acetil-CoA 0.1 mM (Sigma), cloranfenicol 0.1 mM (Sigma) y 5,5'-ditio-bis 2- ácido nitrobenzónico (DTNB) 1 mM en 0.1 M Tris-HCl pH 7.8. Inmediatamente se cuantificó la actividad enzimática en el mismo equipo CERES 900C, posicionado en el modo de cinética, determinando la absorbancia a 410 nm cada 5 segundos durante 5 minutos. La actividad específica de CAT se obtiene dividiendo la actividad enzimática entre la cantidad de proteína que corresponda para cada muestra.

6.6. Determinación del inicio de transcripción por *Primer Extension*

Se extrajo RNA a partir de cultivos de la cepa *C. rodentium* DBS100 Δ *hns* sin plásmido o conteniendo las fusiones *crf1_A-cat* y *crf1_B-cat* (Tabla 3) a una D.O.₆₀₀ de 0.6 y 0.8 utilizando fenol ácido a 62°C y limpiando la fase acuosa con etanol al 70%. Una vez obtenido el RNA puro, 40 μ g se usaron como templado para la obtención de cDNA, utilizando el oligonucleótido pKK-seq-1 ó 11771 CAT Rv (Tabla 4), los cuales fueron previamente marcados con 40 μ ci de [γ -³²P]-ATP utilizando 5 u/ μ l de la enzima T4 PNK polinucleótido quinasa (Invitrogen), dNTPs (10mM) y agua DEPC (Dietil policarbonato).

El cDNA obtenido se limpió con N-butanol y etanol al 70% para posteriormente ser resuspendido en 5 μ l de agua libre de nucleasas y 4 μ l de buffer *stop* (Thermo Fisher). Las muestras se resolvieron por electroforesis en un gel de acrilamida al 8% más 8M de urea. En el gel se incluyó una reacción de secuenciación tipo Sanger, para la cual se utilizó como DNA molde el plásmido con la fusión *crf1_A-*

cat, el oligonucleótido 11771 CAT Rv (Tabla 4) marcado con [γ - 32 P]-ATP, la enzima Thermo seq (Thermo Fisher) y su buffer. Una vez separados por electroforesis el cDNA y los productos de la reacción Sanger, se secó el gel a 80°C y se expuso a una película Kodak la cual se reveló siguiendo las recomendaciones del fabricante.

6.7. Predicción de promotores.

Para identificar la presencia de promotores dentro de la región reguladora del operón *crf1* se utilizó el programa BPROM disponible en el servidor web Softberry (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>). BPROM predice posibles promotores reconocidos por σ^{70} con 80% de precisión y especificidad y ha sido utilizado en diversos estudios para la caracterización funcional de secuencias bacterianas (Solovyev y Salamov, 2011).

6.8. Etiquetado de proteínas con FLAG

Para agregar la secuencia que codifica para el epítotope 3XFLAG en fase al extremo 3' de los genes *ROD_11771* y *ROD_11791*, correspondientes al primer y tercer genes del operón *crf1*, se diseñaron oligonucleótidos específicos (Tabla 4) con los que se amplificó, a partir del plásmido pSUB11 (Tabla 3) que se usó como DNA molde, el casete que contiene la secuencia del epítotope 3XFLAG y el gen que codifica para la resistencia a kanamicina. Los productos de PCR se limpiaron y concentraron mediante el método de fenol-cloroformo, el cual permite separar los ácidos nucleicos insolubles en fenol y solubles en cloroformo en dos fases: la fase superior acuosa que contiene a los ácidos nucleicos, y la fase inferior que contiene a los solventes orgánicos fenol y cloroformo, además de otros compuestos celulares como lo son proteínas y lípidos. Una vez separada la fase acuosa, el DNA se precipitó con etanol absoluto y glucógeno y se resuspendió en 12 μ l de agua estéril. De aquí 6 μ l se usaron para electroporar la cepa *C. rodentium* DBS100 silvestre conteniendo el plásmido pKD46 (Tabla 3), que codifica para las proteínas del sistema recombinasa λ red. Las células transformantes se sembraron en cajas de LB agar con 30 μ g/ml de kanamicina. Las colonias que crecieron se sometieron a 3 pases a 42°C sin antibiótico y posteriormente se replicaron en cajas de LB agar más ampicilina de donde se seleccionaron aquellas que ya no crecieron, señal de que perdieron el plásmido pKD46. Por PCR y secuenciación se corroboró que las colonias tuvieran la etiqueta FLAG en fase en el gen de interés.

6.9. Western Blot

Las cepas *C. rodentium* DBS100 *ROD_11771::3xFLAG-Km* y *ROD_11791::3xFLAG-Km*, transformadas con el plásmido pT6-HNS-G₁₁₃D, el cual codifica para una mutante dominante negativa de H-NS cuyo gen se expresa desde el promotor *araBAD*, fueron crecidas en 5 ml de los medios DMEM, MM-N y LB. Como controles se incluyeron las cepas *C. rodentium* DBS100 *ecpA::3XFLAG* y *C. rodentium* silvestre con el plásmido pT6-HNS-G₁₁₃D. Se centrifugaron 5 mL de cada cultivo para colectar la pastilla bacteriana y para separar el sobrenadante, el cual se guardó para hacer un perfil de secreción posteriormente.

Las pastillas generadas se resuspendieron en 300 µL de una solución que contiene urea 8M. Una vez sonicadas las muestras, se les agregó buffer de carga y se hirvieron 5 minutos a 96°C. Pasado este tiempo, las proteínas se resolvieron por electroforesis en un gel de poliacrilamida 8% con 8 M de urea y se corrieron en cámaras verticales conteniendo amortiguador Tris-Glicina.

Para la transferencia, el gel de acrilamida se incubó junto con una membrana de nitrocelulosa (Amersham) en buffer de transferencia (Tris base 2.5 mM, glicina 19.2 mM y metanol 20%) por 10 minutos en agitación. Pasado este tiempo se hizo la transferencia de las proteínas a la membrana en una cámara BioRad a 19V durante 45 minutos siguiendo las instrucciones del fabricante. La membrana se lavó con buffer PBS-T (80 g/l de NaCl, 6.1 g/l de Na₂HPO₄, 2 g/l de KH₂PO₄, 2 g/l de KCl, pH7.4) y se incubó con una solución de bloqueo (PBS 1X, 0.1% de Tween-20 y 5% de leche descremada en polvo) durante 1 hora con agitación a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo, se deshecha la solución de bloqueo y se hacen dos lavados con PBS-T. Se prepara una dilución del anticuerpo primario (α-DnaK, 1:20,000; α-FLAG, 1:5,000) (Sigma) en PBS-T donde se incuba la membrana durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente; posteriormente se hacen dos lavados con PBS-T y se procede a incubar en la dilución correspondiente con el anticuerpo secundario (α-IgG de ratón acoplado a peroxidasa a una dilución de 1:10,000) (Rockland) por 1 hora en agitación a temperatura ambiente.

Por último, la membrana se sumergió en una solución de luminol/oxidante (Carestream) y se colocó entre dos acetatos para exponerse a una película fotográfica (Kodak) durante 30 segundos o 1 minuto. El revelado de la película se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.10. Perfil de secreción

Se prepararon cultivos de las cepas etiquetadas con el plásmido pT6G₁₁₃D. Se tomaron 3 muestras de cultivo de 1.5 mL cada una y se centrifugaron a 14,000 rpm, el sobrenadante se pasó a tubos limpios y se les agregó 10% de Ácido Tri-Cloro-Acético (TAC) frío y se dejó precipitar toda la noche a 4°C. Transcurrido este tiempo las suspensiones se centrifugaron de nuevo a 14,000 rpm, se tiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de proteínas. Una vez eliminado el medio del tubo, las proteínas se resuspenden en 15 µL de buffer de carga (Laemli) 1X, las muestras se corrieron en geles de acrilamida al 15%.

7. RESULTADOS

7.1. Los promotores de los operones *crf1* y *crf3* son activos en ausencia de H-NS.

Como ya se señaló anteriormente, solo unos cuantos operones fimbriales de la familia C/U han sido caracterizados en *C. rodentium*. En este trabajo nos planteamos como objetivo determinar si cuatro de los operones a la fecha no estudiados son activos transcripcionalmente en condiciones de laboratorio. Los operones seleccionados están anotados para el genoma de *C. rodentium* ICC168 como *ROD_11771-11781*, *ROD_19341-19381*, *ROD_27771-27801* y *ROD_34961-35021* (Petty *et al.*, 2010), los cuales para este trabajo se denominaron, por *C. rodentium* fimbria, *crf1*, *crf2*, *crf3* y *crf4*, respectivamente. Para abordar nuestros objetivos, se construyeron fusiones transcripcionales al gen *cat* y al operón *lux*, mediante la clonación de fragmentos obtenidos por PCR de las secuencias corriente arriba del primer gen de cada operón. En la figura 6 se muestra un esquema de la organización de los 4 operones fimbriales, se indica de manera aproximada las regiones que fueron clonadas en los plásmidos pKK232-8 y pCS26 (Tabla 3), como se describe en materiales y métodos. Las construcciones resultantes fueron confirmadas por secuenciación e introducidas tanto en la cepa silvestre DBS100, como en las cepas mutantes en los genes que codifican para los reguladores globales H-NS (DBS100 Δ *hns*) y StpA (DBS100 Δ *stpA*), los cuales reprimen la expresión de un número importante de factores de virulencia, incluyendo operones fimbriales (Lim *et al.*, 2012; Dorman, 2007; Lucchini *et al.*, 2009).

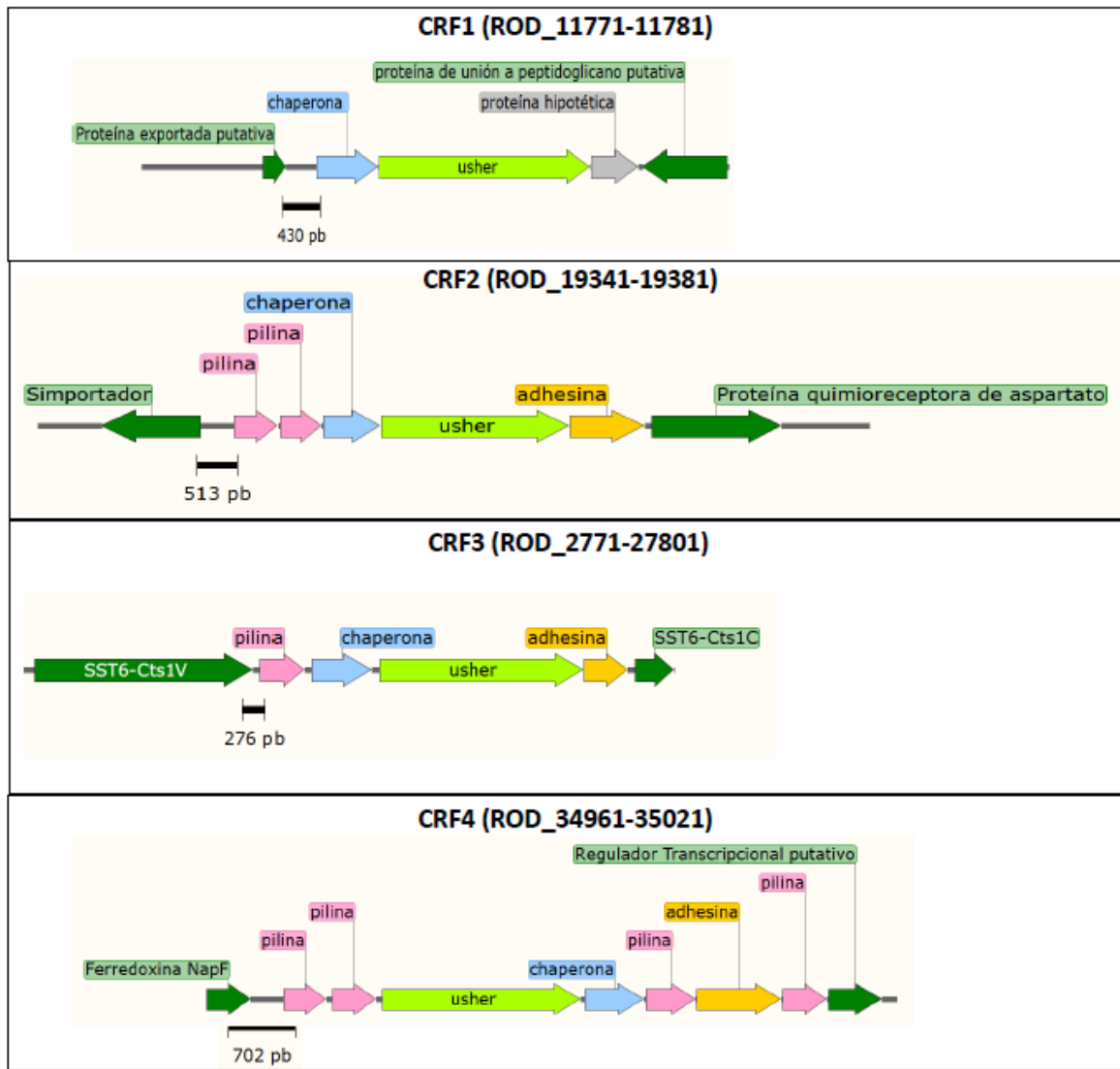


Figura 6. Esquema de la composición de los operones fimbriales *crf1*, *crf2*, *crf3* y *crf4*. *crf1* es un operón fimbrial que consta de tres genes que codifican para una chaperona, un usher y una proteína de función desconocida, y que se caracteriza por la ausencia de genes para subunidades fimbriales. *crf2* además de incluir genes para chaperona y usher, tiene dos genes anotados como pilinas y uno para una adhesina. *crf3* consta de pilina, chaperona, usher y una adhesina, características de un operón fimbrial clásico; sin embargo, se caracteriza por estar embebido en un operón que codifica para componentes clásicos de un sistema de secreción tipo 6 (SST6). Por último, *crf4* es el operón más grande al tener 4 genes anotados para pilinas, una adhesina, una chaperona y una proteína usher. En cada operón se ilustra con color negro la posición y tamaño de la región clonada en los plásmidos pKK232-8 y pCS26 para generar las fusiones al gen reportero *cat* y el operón *lux*, respectivamente, y las cuales fueron seleccionadas de

acuerdo a la secuencia contenida en la región intergénica entre el operón y el gen inmediato anterior.

Después de hacer una selección de las cepas transformantes conteniendo las diferentes fusiones en los tres fondos genéticos (DBS100 silvestre, DBS100 mutante en *hns* y DBS100 mutante en *stpA*), evaluamos la actividad transcripcional dirigida por cada región fusionada a *cat*, correspondiente a la probable región reguladora de los cuatro operones fimbriales, mediante la determinación de la actividad específica de CAT a partir de muestras obtenidas de cultivos crecidos por 8 horas en tres medios distintos, LB, MM-N y DMEM, a 37°C en condiciones estáticas y una atmosfera de 5% de CO₂. Se ha observado que estas condiciones de crecimiento favorecen la expresión de unos u otros factores de virulencia en *C. rodentium*.

Interesantemente, todos los promotores son prácticamente inactivos en la cepa silvestre crecida en cualquiera de los medios probados; sin embargo, pudimos observar que el promotor del operón *crf1* dio actividad significativa en el fondo mutante en H-NS, mientras que *crf3* fue modestamente activo con respecto a la cepa silvestre. Los promotores de los operones *crf2* y *crf4* no mostraron actividad en ninguna de las condiciones probadas (Figura 7).

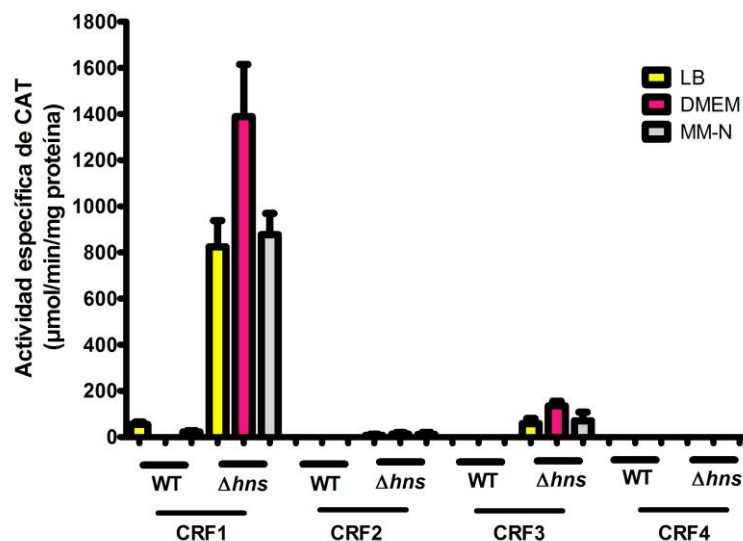


Figura 7. Los promotores de los operones *crf1* y *crf3* son regulados negativamente por H-NS, mientras que los de *crf2* y *crf4* son inactivos. Actividad específica de CAT (µmol/min/mg de proteína) obtenida a partir de extractos de *C. rodentium* DBS100 silvestre o Δ*hns* portando las fusiones correspondientes. Las cepas se cultivaron en tubos con 5mL de medio LB, DMEM o MM-N y se crecieron durante 8 horas en condición estática a 37°C y con 5% de CO₂. Las muestras fueron procesadas como se describe en Materiales y Métodos.

7.2. El promotor del operón *crf1* se expresa diferencialmente según el medio de cultivo y la fase de crecimiento.

Una vez que se observó actividad transcripcional del promotor del operón *crf1* en cultivo estático en presencia de CO₂, independientemente del medio de cultivo, se evaluó su actividad a partir de muestras obtenidas de cultivos crecidos con agitación. A su vez, se determinó la cinética de expresión tomando muestras a distintas densidades ópticas (D.O.₆₀₀: 0.6, 0.8 y 1.0), las cuales se procesaron para determinar la actividad de CAT. Se observó mayor actividad transcripcional en MM-N en la cepa mutante Δhns a lo largo del cultivo, sin que se observaran cambios significativos conforme aumentaba la densidad óptica (Figura 8), lo cual sugiere que la mayor actividad debe estarse generando durante etapas más tempranas del cultivo, principalmente durante la fase exponencial temprana. La actividad transcripcional del promotor *crf1* en DMEM y LB, aunque en general menor a la observada en MM-N, también se mantiene (Figura 8). En su conjunto estos resultados indican que el crecimiento en condiciones de mayor aireación (agitación) favorece la actividad del promotor *crf1* en MM-N en ausencia del represor H-NS, aunque sin afectar de manera significativa la actividad observada en LB y DMEM con respecto a la actividad observada en condiciones estáticas más CO₂ (Figura 7). Se usó como control negativo el plásmido pkk232-8 (Tabla2) sin promotor, tanto en la cepa WT, así como en la mutante Δhns . En ambos casos la actividad específica de CAT fue nula por lo que para simplificar la gráfica no se muestran los resultados. Como control positivo se evaluó la actividad específica de CAT de la fusión *pecpA1-cat* en el plásmido pkk232-8 la cual contiene la región promotora del gen *ecpA* (ROD_29201) codificante para la pilina de la fimbria ECP de *C. rodentium*, la cual es activa transcripcionalmente (Martínez-Santos, datos no publicados) (Figura 9).

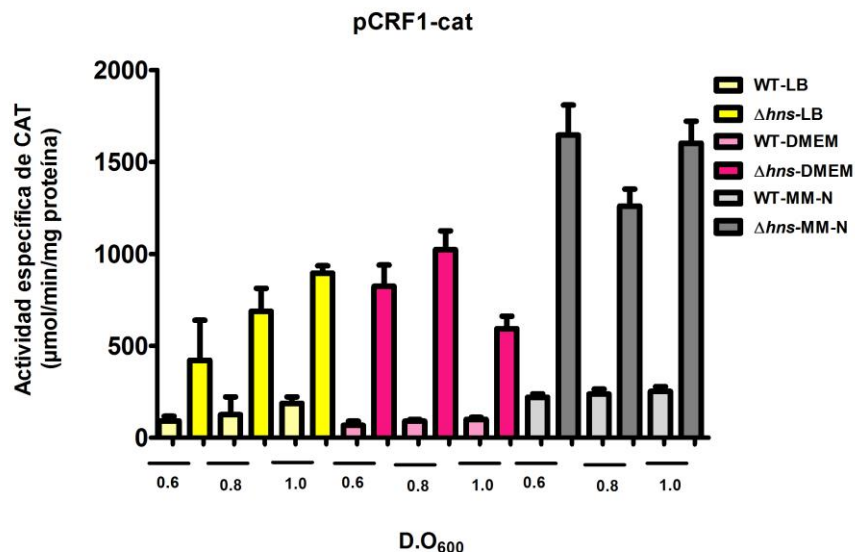


Figura 8. El promotor del operón *crf1* se expresa preferencialmente en MM-N en ausencia de H-NS. Actividad específica de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) obtenida a partir de extractos de *C. rodentium* DBS100 silvestre o Δhns portando el plásmido con la fusión transcripcional del promotor del operón *crf1* (*pCRF1-cat*). Las cepas se cultivaron en tubos con 5mL de medio LB, DMEM o MM-N en agitación a 37°C y las muestras se colectaron a las densidades ópticas indicadas. La gráfica muestra el promedio de tres experimentos independientes.

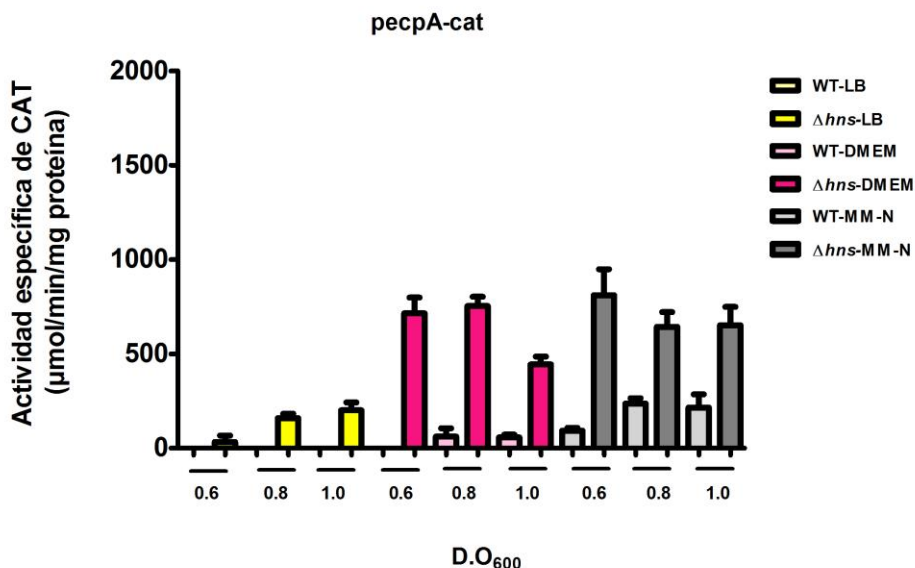


Figura 9. Actividad transcripcional del promotor del operón fimbrial *ecp* utilizado como control. Actividad específica de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) obtenida a partir de extractos de *C. rodentium* DBS100 silvestre o Δhns portando el plásmido con la fusión

transcripcional del promotor del operón *ecp* (*pecpA1-cat*). Las cepas se cultivaron en tubos con 5mL de medio LB, DMEM o MM-N en agitación a 37°C y las muestras se colectaron a las densidades ópticas indicadas. La gráfica muestra el promedio de tres experimentos independientes.

7.3. El promotor del operón *crf1* es activo en ausencia de StpA.

Con los resultados descritos anteriormente, pudimos observar que el promotor del operón *crf1* es regulado por H-NS. *C. rodentium* codifica para otras cuatro proteínas muy parecidas a H-NS (Caballero *et al.*, 2015), una de ellas es StpA a la que se le ha atribuido un papel compensatorio en ausencia de H-NS (Leonard *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2012). Con estos antecedentes, decidimos evaluar el papel de StpA en la regulación de los cuatro promotores asociados a los operones fimbriales motivo de este estudio: *crf1*, *crf2*, *crf3* y *crf4*. Para ello se transformaron las cuatro fusiones transcripcionales descritas en la figura 6 en la cepa DBS100 Δ *stpA* y se determinó la actividad transcripcional bajo condiciones similares a los experimentos descritos anteriormente. Este análisis permitió observar que el promotor *crf1* es también reprimido por StpA en forma muy similar a H-NS (Figura 10), lo cual plantea la posibilidad de que H-NS y StpA actúen de manera cooperativa o sinérgica para regular negativamente la expresión de *crf1*. Queda por distinguir entre estas dos posibilidades, ya que aunque se esperaría que en una doble mutante la actividad fuera similar o se incrementara, respectivamente con respecto a la de las mutantes individuales, el experimento no es viable porque la doble mutante presenta muchos problemas de crecimiento, lo cual podría dificultar la interpretación del resultado.

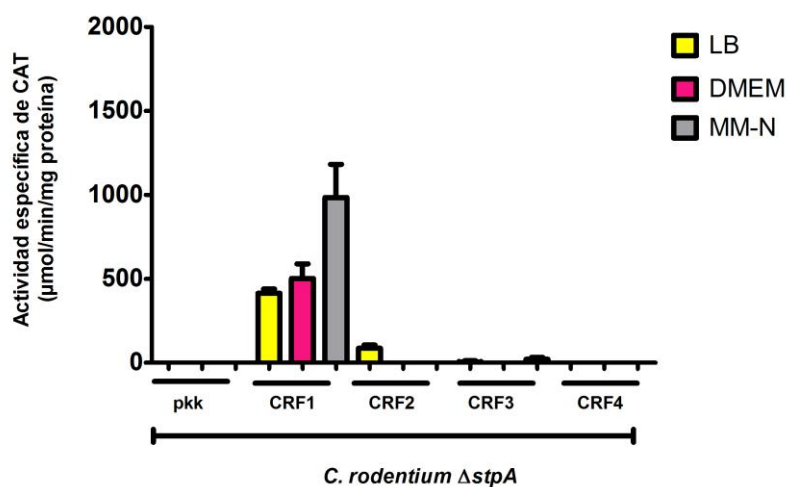


Figura 10. El promotor del operón *crf1* es también regulado negativamente por StpA. Actividad específica de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) obtenida a partir de

extractos de *C. rodentium* DBS100 silvestre o Δ *stpA* conteniendo los plásmidos con las fusiones *crf1*, *crf2*, *crf3* y *crf4*. Los cultivos se hicieron en tubos con 5mL de medio LB, DMEM o MM-N y se dejaron crecer durante 8 horas en agitación a 37°C.

7.4. Identificación de la región mínima reguladora del operón *crf1*.

Para delimitar la región mínima reguladora del operón *crf1* se construyeron fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* con recortes de la región de 430 pb contenida en la fusión *crf1_A-cat*, la cual abarca de la posición -393 a +37 respecto al ATG del primer gen del operón, generando las fusiones *crf1_B-cat* que consta de la región -221 a +37; *crf1_C-cat* de -130 a +37 y *crf1_D-cat* de -393 a -135 respecto al ATG del primer gen del operón (Figura 11; Tabla 3).

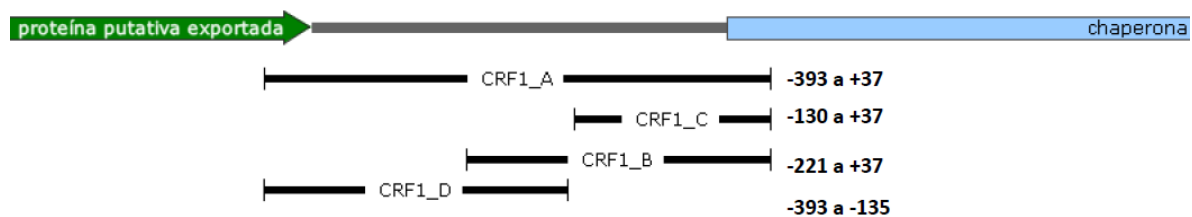


Figura 11. Esquema de las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* generadas para delimitar la región mínima reguladora del operón *crf1*. Las posiciones se indican con respecto al codón de inicio de la traducción del primer gen del operón que codifica para la chaperona.

Estas fusiones se transformaron en la cepa silvestre DBS100 silvestre y Δ *hns*. Los resultados de la actividad de CAT obtenidos para cada fusión muestran que la fusión *crf1_B-cat* presenta una actividad muy similar a la de la fusión *crf1_A-cat*, indicando que la región eliminada en *crf1_B-cat* no contiene elementos involucrados ni en la represión observada en la cepa silvestre, ni en la activación en ausencia de H-NS. La determinación más precisa de la región mínima reguladora de este operón requerirá de la generación de fusiones aún más delimitadas (Figura 12).

Para las fusiones *crf1_C-cat* y *crf1_D-cat* la actividad disminuye, indicando que carecen de elementos importantes para la regulación positiva de la expresión del operón *crf1*; sin embargo, la actividad no se pierde por completo, lo cual sugiere la presencia de dos promotores activos pues estas fusiones contienen segmentos independientes de la región reguladora (Figura 11). Dado que la suma de las actividades de las fusiones *crf1_C-cat* y *crf1_D-cat* es aparentemente equivalente a la actividad transcripcional de la fusión *crf1_B-cat*, la cual abarca la región contenida en *crf1_C-cat* más las posiciones -221 a -135 contenidas en *crf1_D-cat*,

estos resultados sugieren que la expresión del operón *crf1* se debe a la actividad de dos promotores que se encuentran dentro de la secuencia localizada entre las posiciones -221 a +37.

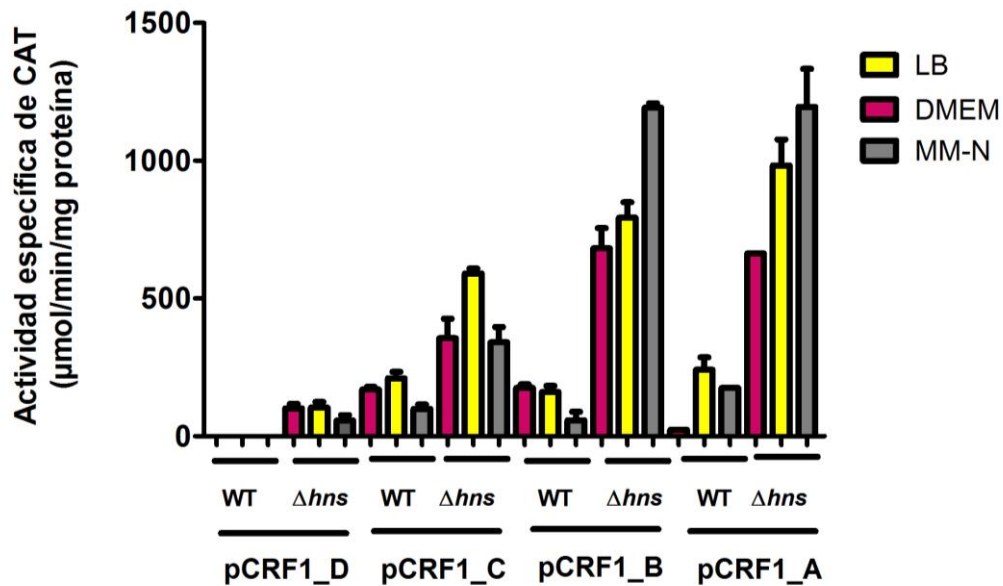


Figura 12. La región mínima reguladora del promotor del operón *crf1* se encuentra contenida dentro de la fusión *crf1_B*. Actividad específica de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) obtenida a partir de extractos de *C. rodentium* DBS100 silvestre o Δhns conteniendo las fusiones del operón *crf1*. Los cultivos se hicieron en tubos con 5mL de medio LB, DMEM o MM-N y se dejaron crecer durante 8 horas en agitación a 37°C. La gráfica muestra el promedio de los resultados obtenidos en dos experimentos independientes.

7.5. Identificación del inicio de transcripción de *crf1*.

Para determinar la localización del o de los promotores del operón *crf1*, se identificó la posición de los posibles inicios de transcripción mediante la técnica de *primer extension*. En un primer experimento se utilizó RNA extraído de *C. rodentium* Δhns conteniendo el plásmido de la fusión *crf1_A-cat* a partir de un cultivo en MM-N a 37°C en agitación cosechado a una D.O₆₀₀: 0.8. Este RNA fue utilizado como templado para la reacción de *primer extension* utilizando los oligonucleótidos 11771-CAT-Rv y pKK-Seq-I (Tabla 4), marcados radioactivamente. El resultado del experimento con ambos oligonucleótidos sugiere dos posibles inicios de transcripción localizados en las posiciones -154 y -123 con respecto del ATG (Figura 13, panel izquierdo). A su vez, se observaron varias señales adicionales que consideramos fueron generados por productos de degradación de los transcritos primarios, por lo que en un nuevo experimento se utilizó RNA obtenido de un cultivo en DMEM donde *C. rodentium* crece mejor

a partir de *C. rodentium* Δhns portando el plásmido pCRF1_A crecida en MM-N hasta una D.O₆₀₀: 0.8, utilizando el oligonucleótido 11771-CAT-RV y pKK-seq1 del lado derecho e izquierdo, respectivamente. En los carriles del lado derecho (flechas rosas) se ilustra el resultado del *primer extension* a partir de RNA extraído de *C. rodentium* Δhns sin plásmido o portando los plásmidos pCRF1_A y pCRF1_B crecidas en medio DMEM a una D.O₆₀₀: 0.6. Para todas las reacciones se utilizó el oligonucleótido 11771-CAT-RV marcado radioactivamente (Tabla 4). Los carriles centrales incluyen las reacciones de secuenciación tipo Sanger (GATC). Los posibles inicios de transcripción se indican a los lados con respecto a la secuencia de la sección correspondiente de la región reguladora de *crf1*. El resto de las bandas parecen ser productos de degradación del transcrito principal ya que disminuyen significativamente cuando la muestra se colecta a una menor densidad óptica.

Una vez detectados posibles inicios de transcripción se prosiguió a predecir cajas -10 y -35 de promotores potenciales utilizando el software BPROM, el cual indicó tres posibles promotores esquematizados en la Figura 14. De acuerdo a la ubicación del inicio de transcripción localizado experimentalmente a -123 pb del ATG, se identificó como posible caja -10 a la secuencia TATTCT y como posible caja -35 a la secuencia TTTACT, ambas con 4 de 6 posiciones conservadas con respecto al consenso para promotores dependientes de sigma 70 (Figura 14, color azul).

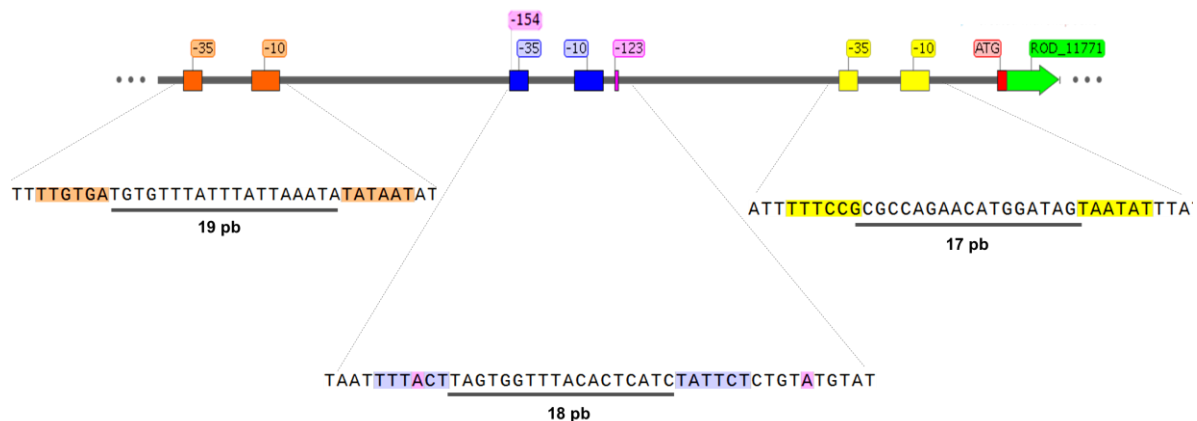


Figura 14. Predicción de secuencias promotoras del operón *crf1*. La predicción de cajas -10 y -35 con BPROM sugiere que las cajas azules constituyen el principal promotor de *crf1* cuyo inicio de transcripción se ubica a -123 pb del codón de inicio ATG de acuerdo a los resultados del *primer extension*. Adicionalmente el programa predice dos promotores más (cajas anaranjadas y amarillas); sin embargo, para ambos no se detectó inicio de transcripción. Para el caso del promotor más distal (cajas anaranjadas), no se puede descartar la posibilidad de que éste sea responsable de la actividad observada para la fusión *crf1_D-cat*, aunque también podría ser un falso positivo; mientras que para el proximal (cajas amarillas) que de este dependa la actividad de la fusión *crf1_C-cat*, la cual carece de los dos promotores predichos corriente arriba de la posición -130.

7.6. Visualización de los posibles productos de la traducción de los transcritos de *crf1*.

Para evaluar si los posibles transcritos generados por el operón *crf1* se traducen a proteínas, se procedió a añadir la secuencia que codifica para el epítipo FLAG en fase al extremo 3' de los genes ROD_11771 (posible chaperona) y ROD_11791 (proteína hipotética de función desconocida) para añadir dicho epítipo al C-terminal de las proteínas predichas para estos genes. Lo anterior se planteó tanto para la cepa silvestre como para la mutante Δhns donde se desreprime la expresión del promotor de *crf1*; sin embargo, únicamente se consiguió etiquetar a ambos genes en la cepa silvestre. Debido a que la expresión del operón fimbrial *crf1* en la cepa silvestre es muy baja (Figura 8), antes de intentar detectar a las proteínas etiquetadas por *western blot*, se introdujo en las cepas etiquetadas el plásmido pT6-HNS-G₁₁₃D, el cual codifica para una proteína H-NS mutante en el dominio de unión a DNA, la cual al formar heterodímeros con la H-NS silvestre genera un efecto de dominancia negativa. El ensayo de *western blot* se realizó creciendo a las cepas etiquetadas con el plásmido pT6-HNS-G₁₁₃D en los tres medios probados en este estudio: MM-N, DMEM y LB. Utilizando como control negativo la cepa silvestre de *C. rodentium* sin etiquetas y como control positivo una cepa que expresa la subunidad fimbrial EcpA-FLAG. Desafortunadamente, no se logró detectar señal ni de la chaperona, ni de la proteína hipotética a partir de muestras colectadas de cultivos en los tres medios (datos no mostrados). Para descartar que este fenotipo estuviera asociado a la falta de funcionalidad del sistema de dominancia negativa, se hizo un perfil de secreción de proteínas.

Se sabe que el DMEM establece una condición de crecimiento que permite la expresión tanto de los genes involucrados en la biogénesis del sistema de secreción tipo III, como de su funcionalidad, mientras que el medio LB es una condición de represión, por lo que en un ensayo de dominancia negativa donde H-NS es inhabilitada se esperaría que haya mayor secreción de proteínas en ambos medios. El perfil de secreción reprodujo el fenotipo antes mencionado (Figura 15), demostrando que el sistema de dominancia negativa es funcional y que la nula detección de las proteínas etiquetadas por *western blot* se debe a otras causas, entre las que se podrían mencionar que la concentración de las proteínas etiquetadas es muy baja o incluso que éstas no se expresen a pesar de que en este trabajo se confirmó que el promotor del operón *crf1* es funcional.

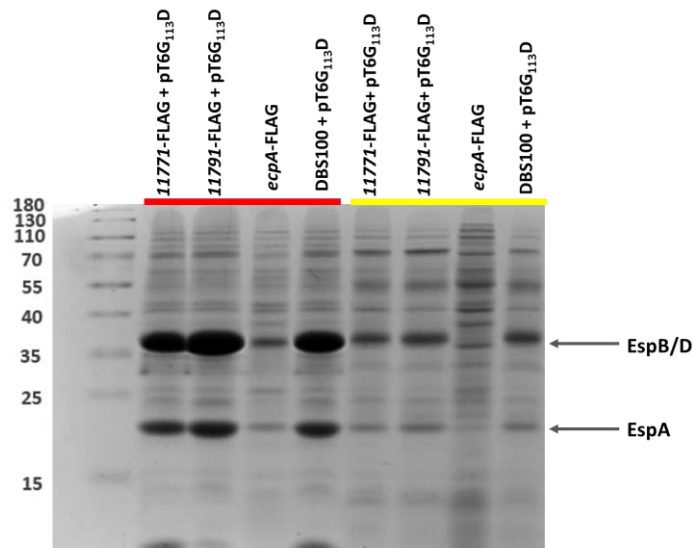


Figura 15. Perfil de secreción de las cepas etiquetadas con FLAG. El perfil de secreción de proteínas correspondiente a las cepas etiquetadas en el gen de la chaperona (11771-FLAG) y de la proteína hipotética (11791-FLAG) conteniendo el plásmido pT6-HNS-G₁₁₃D indican funcionalidad del sistema de dominancia negativa. En medio DMEM (panel rojo) se secretan las proteínas del SST3 EspB, EspD y EspA en mayor abundancia en las cepas con el plásmido pT6-HNS-G₁₁₃D, comparado con la cepa etiquetada en *ecpA*, la cual no contiene el plásmido. Lo mismo ocurre en medio LB (panel amarillo).

8. DISCUSIÓN

Los patógenos A/E EPEC y EHEC son agentes causales de diarrea en humanos con prevalencias a nivel mundial que varían de acuerdo a la región geográfica donde siguen representando un problema de salud. Ante la falta de un modelo animal que permita investigar en más detalle el mecanismo de patogenicidad mediante el cual estas bacterias establecen una infección, se recurre al uso de *C. rodentium* como modelo alternativo, ya que es un patógeno específico de ratones de bioferio en las que produce, al igual que EPEC y EHEC en humanos, la lesión A/E en células del epitelio intestinal, particularmente en el colon. Interesantemente, *C. rodentium* comparte 2940 genes con EPEC y EHEC que constituyen el genoma *core* entre estos tres organismos, y de manera particular 229 genes con EHEC y 230 con EPEC, pero tiene 1585 genes sin ortólogos en los otros patógenos A/E (Petty *et al.*, 2010). De los genes comunes entre los patógenos A/E destacan los que componen la isla de patogenicidad LEE, así como los que codifican para otros efectores localizados fuera de la isla denominados *nle* (*non LEE-encoded effectors*). Durante la adherencia inicial, los patógenos A/E expresan fimbrias tipo IV que facilitan la interacción con las células eucariontes: CFC en *C. rodentium*, BFP en EPEC y HCP en EHEC (Mundy *et al.*, 2003; Girón *et al.*, 1991; Sherlock *et al.*, 2005).

El estudio tanto *in vitro* como *in vivo* de mutantes de diversos genes que son compartidos con EPEC y EHEC en *C. rodentium*, ha permitido dilucidar el papel que éstos juegan durante la colonización e infección (Deng *et al.*, 2004; Bishop *et al.*, 2007). Además, *C. rodentium* también se ha utilizado como un modelo heterólogo para estudiar genes de EPEC y EHEC que no están presentes en *C. rodentium*. Tal es el caso del gen que codifica para la proteína PerC (del inglés: “*Plasmid-encoded regulator C*”) de EPEC o de sus ortólogos en EHEC denominados Pch (por sus siglas en inglés: “*PerC homologue*”), que son reguladores positivos de la expresión del gen *ler*, el cual codifica para Ler, el regulador maestro de la isla de patogenicidad LEE en EHEC y EPEC. De manera interesante, cuando *perC* o *pchA* se expresan a partir de un plásmido en *C. rodentium*, son capaces de regular positivamente la expresión de la isla LEE (Bustamante *et al.*, 2011). Otro ejemplo interesante del uso de *C. rodentium* como modelo heterólogo lo representa la construcción de una cepa de *C. rodentium* (λ stx2_{dact}) que expresa toxinas tipo Shiga de EHEC, la cual provee un modelo para el estudio *in vivo* de la patogénesis de EHEC mediada por dicha toxina responsable de complicaciones secundarias graves como el Síndrome Urémico Hemolítico (Mallick *et al.*, 2012).

El modelo de infección *C. rodentium*-ratón ha sido a su vez utilizado para investigar la dinámica de la transmisión de la infección fecal-oral, así como para estudiar el mecanismo de respuesta del sistema inmune del ratón ante la infección, pues el ratón tiene la capacidad de eliminar la infección por *C. rodentium* y adquirir inmunidad ante infecciones posteriores (Buschor *et al.*, 2017). En los últimos años, también se ha empleado como modelo para estudiar cómo influye la microbiota durante el proceso de infección al ratón y la ocurrencia de disbiosis después de la infección (Chen *et al.*, 2014; Collins *et al.*, 2014; Kamada *et al.*, 2015). Además de ser usado como modelo de los patógenos A/E, también se ha implementado como modelo para estudiar otras enfermedades humanas, como lo son la enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y cáncer de colon (Higgins *et al.*, 1999; Chandrakesan *et al.*, 2013).

Entre los genes de *C. rodentium* que no tienen ortólogos ni en EPEC ni en EHEC, se encuentran los operones fimbriales *crf1*, *crf2*, *crf3* y *crf4*, además de otros no mencionados en este trabajo. Los ortólogos más cercanos a *crf1* se encuentran en *Leclercia adecarboxilata* y *Enterobacter cloacae*, donde los operones constan al igual que en *C. rodentium* únicamente de una chaperona, un *usher* y una proteína hipotética río abajo del gen del *usher*. Para el caso de *crf2*, los ortólogos más cercanos se encuentran en bacterias del mismo género como *C. amalonaticus* y *C. farmeri* o *E. fergusonii*. Los ortólogos más cercanos al operón *crf3* se encuentran en *Pantoea alhagi* que es un patógeno de plantas, *Cronobacter sakazakii* y *C. turicensis*, los cuales de manera interesante conservan la misma

organización del operón fimbrial dentro de otro operón que contiene genes de un sistema de secreción tipo seis. El operón *crf4* tiene a sus ortólogos más cercanos en bacterias del mismo género como *C. farmeri* y *C. amalonaticus*, así como en *E. cloacae*.

El hecho de que estos operones fimbriales no estén en otros patógenos A/E, sugiere que podrían estar involucrados en mediar la especificidad de nicho, el cual varía para estos patógenos: EPEC coloniza el intestino delgado, EHEC el intestino grueso y *C. rodentium* el colón de ratón (Phillips *et al.*, 2000; Fitzhenry *et al.*, 2002; Mundy *et al.*, 2005).

En la punta del filamento fimbrial está presente una subunidad fimbrial denominada adhesina, la cual puede interactuar con un receptor específico sobre las células del hospedero o sobre una superficie o reservorio ambiental, proporcionando a las bacterias tropismo. Por ejemplo, la fimbria Pap de *E. coli* uropatógena tiene en su punta a la adhesina PapG que reconoce los glucolípidos Gal α 1-4Gal de la superficie de las células renales favoreciendo la adherencia de UPEC causando pielonefritis, mientras que la fimbria Fim de esta misma bacteria tiene en la punta a la adhesina FimH que se une a un receptor manosilado en la superficie del epitelio de la vejiga donde provoca cistitis (Allen *et al.*, 2012). Es decir, las adhesinas pueden proporcionar a las bacterias especificidad por un nicho dado y por ende, participar en el desarrollo de un padecimiento u otro. Por otro lado, mientras que la expresión de cada adhesina puede promover de manera independiente la adhesión de la bacteria a un tejido específico, la expresión secuencial o específica en respuesta al entorno de dos o más fimbrias puede, eventualmente, también determinar las características de una infección dada o el nicho dentro de un hospedero o sobre un reservorio ambiental en el que la bacteria se establecerá y proliferará (Bush & Waksman, 2014). Esto último suma interés considerando el número de operones fimbriales de la familia C/U en las enterobacterias (Tabla 1), y establece como interrogantes si estas estructuras cumplen funciones diversas o redundantes dentro de los patógenos.

Los datos descritos sobre la regulación de las fimbrias C/U sugieren que éstas se expresan en diferentes etapas durante el ciclo de vida de las bacterias, es decir, los mecanismos que regulan su expresión están respondiendo a distintos estímulos y por ende son reguladas de manera diferencial. El hecho de no haber observado actividad transcripcional en este estudio de los operones *crf2* y *crf4* no significa que no sean operones activos, puede ser que simplemente no logramos reproducir las condiciones donde estas fimbrias se expresan. Incluso si no hay expresión *in vivo* dentro del hospedero, tampoco se pueden interpretar como operones inactivos, pues podrían estar involucradas en la adherencia de algún reservorio ambiental o participar en procesos como la transferencia entre

hospederos que en el caso de los roedores se da a través de las heces. Tal es el caso de ECP, una fimbria C/U ubicua en *E. coli* pero también presente en *C. rodentium*. ECP se expresa preferencialmente a 26°C y se ha descrito que en EHEC es necesaria para establecer la interacción con hojas de espinaca, que pueden ser una fuente de transmisión al hombre, permitiéndole adherirse a los estomas y prevalecer hasta que es transmitida a su hospedero final (Saldaña *et al*, 2011).

Interesantemente, en este trabajo observamos actividad transcripcional del operón *crf1*, el cual consta de tres marcos de lectura que codifican para la chaperona, la proteína *usher* y una proteína hipotética de función desconocida, pero carece de genes para subunidades fimbriales. Considerando que la biogénesis de las fimbrias C/U requiere de al menos una subunidad fimbrial que se ensamble para formar el filamento, para el operón *crf1* consideramos tres posibilidades: 1) que *crf1* sea un pseudo-operón que perdió el gen para la subunidad fimbrial y posee genes para la chaperona y el *usher* que ya no son funcionales y eventualmente también serán eliminados, pero que azarosamente conserva un promotor funcional; 2) que los componentes codificados en el operón *crf1* participen en el ensamblado una subunidad fimbrial codificada en otro operón, ya que hay operones que codifican para más de una pilina, como es el caso de *crf2* y *crf4* (Figura 6); sin embargo, este fenómeno no ha sido observado; 3) que la chaperona y el *usher* exporten a la proteína hipotética codificada por el tercer gen del operón. Esta última opción sugiere, a su vez, dos posibilidades; que la proteína hipotética sea una subunidad fimbrial poco conservada, o una proteína de función desconocida pero características novedosas que está siendo exportada vía el sistema fimbrial, lo cual tampoco se ha documentado para las fimbrias C/U. De manera interesante, hay un ortólogo de la proteína hipotética en *Salmonella enterica* sv Typhimurium, con la que comparte una identidad del 39%, que está anotada como posible subunidad fimbrial; sin embargo, la proteína hipotética de *C. rodentium* no presenta motivos típicos de pilina, y en su lugar sí un motivo de glucosilación de la familia RoIB/RoIC y un motivo de función desconocida.

El otro operón donde observamos actividad transcripcional es *crf3*, aunque los niveles de expresión observados son muy bajos. En parte esto se puede explicar porque la región utilizada para generar las fusiones transcripcionales en los sistemas reporteros *cat* y *lux* podría carecer de sitios de unión de reguladores positivos o porque en realidad el operón es cotranscrito con los genes del SST6 ya que la región clonada corresponde a la región intergénica entre un gen del SST6 y la pilina de *crf3*. Esto hace necesario evaluar si la expresión observada a partir de la región clonada no es un artificio y en su lugar la activación del operón *crf3* depende de la región reguladora del operón del SST6. La potencial co-expresión de una fimbria C/U con el SST6 sería un hallazgo muy interesante pues ambos

son factores de virulencia importantes para las bacterias patógenas. Cabe señalar que se ha demostrado que el SST6 en *C. rodentium* es funcional y le provee ventajas durante la competencia con otras bacterias (Gueguen & Cascales, 2013). Queda por definir si existe alguna correlación funcional entre el SST6 y la fimbria C/U una vez que se confirme que la expresión del operón fimbrial da lugar al ensamble de un filamento sobre la superficie bacteriana.

Otro dato interesante encontrado en este trabajo, fue el hecho de que StpA reprime la expresión de *crf1* en la misma magnitud que lo hace H-NS. Aunque ya se han descrito genes donde StpA regula uniéndose a las mismas regiones que H-NS, compensando la ausencia de esta proteína (Leonard *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2012), no se había descrito la intervención de StpA en la regulación de algún operón fimbrial. Incluso ECP y GCF que son fimbrias C/U reguladas por H-NS no muestran represión por StpA (Martínez-Santos, datos no publicados; Caballero-Flores; datos no publicados). Queda por evaluar si el efecto de H-NS y StpA en la transcripción del operón es aditivo o cooperativo. Por otra parte, el hecho de que *crf1* esté regulado negativamente por H-NS y StpA sugiere que hay un regulador positivo que, bajo las condiciones apropiadas de crecimiento, desplaza a estas proteínas para permitir el acceso de la RNA polimerasa y dar lugar a la transcripción del operón. Esta situación se ilustra con la regulación del operón *kfc* de *C. rodentium*, el cual es regulado por RegA, un regulador transcripcional positivo de la familia AraC que se une a un operador localizado cerca del promotor del operón, lo que resulta en el desplazamiento de H-NS, la cual reprime la expresión del operón bajo condiciones no permisivas (Yang *et al.*, 2008).

En conclusión, este trabajo contribuyó con la caracterización inicial de un operón fimbrial que muestra características particulares dentro de la familia C/U y que pudiera brindar información nueva respecto a la biogénesis de estas fimbrias y la función de genes accesorios, así como de los mecanismos que regulan su expresión. Además, este trabajo forma parte de un estudio sistemático de la función y regulación de los operones fimbriales en *C. rodentium*, que esperamos nos acerque a comprender más sobre la diversidad funcionalidad de estas estructuras en bacterias patógenas.

9. PERSPECTIVAS

1. Corroborar la región promotora de *crf1* mutando las posibles cajas -10 y -35.
2. Determinar si los genes que conforman el operón *crf1* son traducidos a proteína una vez transcritos. Lo anterior mediante la adición de la secuencia

que codifica para el epítoto FLAG al extremo 3' de cada gen en la cepas mutantes en *hns* y *stpA* para facilitar la detección de los productos por Western blot. Alternativamente, clonando los genes etiquetados en plásmidos que permitan su sobreexpresión.

3. Determinar si el gen ROD_11791 que codifica para la proteína hipotética es parte del operón *crf1*, si su expresión deriva en una proteína y, en su caso, cuál es su localización en la célula o si ésta está siendo exportada vía los componentes de este operón fimbrial.
4. Evaluar la actividad *in vivo* de los promotores de los operones fimbriales *crf1*, *crf2*, *crf3* y *crf4* con las fusiones transcripcionales al operón *lux*.
5. Construir mutantes de los operones fimbriales para examinar su papel en adherencia a líneas celulares en cultivo y durante la colonización en ratones.

10. REFERENCIAS

Allen, W., Phan, G. y Waksman, G. (2012). Pilus biogenesis at the outer membrane of Gram-negative bacterial pathogens. *Curr Opin Struct Biol.* 22: 500–506.

Bishop, A., Wiles, S., Dougan, G. y Frankel, G. (2007). Cell attachment properties and infectivity of host-adapted and environmentally adapted *Citrobacter rodentium*. *Microbes Infect.* 9: 1316–1324.

Bjarnason, J., Southward, C. M. y Surette, M. G. (2003). Genomic profiling of iron-responsive genes in *Salmonella enterica* serovar typhimurium by high-throughput screening of a random promoter library. *J Bacteriol.* 185: 4973-4982.

Borenshtein, D., McBee, M. y Schauer, D. (2008). Utility of the *Citrobacter rodentium* infection model in laboratory mice. *Curr Opin Gastroenterol.* 24: 32–37.

Brennan, C., Fritz, E., Flynn, J. y Poole, C.M. (1965). *Citrobacter freundii* associated with diarrhea in laboratory mice. *Lab Anim Care.* 15: 266–275.

Buschor, S., Cuenca, M., Uster, S., Scharen, O., Balmer, M., Terrazos, M., Schurch, M. y Hapfelmeier, S. (2017). Innate immunity restricts *Citrobacter rodentium* A/E pathogenesis initiation to an early window of opportunity. PLoS Pathog. 13(6): e1006476.

Bush, A. y Waksman, G. (2012). Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. Phil Trans R Soc B. 367: 1112–1122.

Bustamante, V. H., Martínez, L. C., Santana, F. J., Knodler, L. A., Steele-Mortimer, O. y Puente, J. L. (2008). HilD-mediated transcriptional cross-talk between SPI-1 and SPI-2. PNAS. 38: 14591-14596.

Bustamante, V. H., Villalba, M., García-Angulo, V., Vázquez, A., Martínez, L., Jiménez, R. y Puente, J. L. (2011). PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 82: 398-415.

Caballero-Flores, G., Croxen, M., Martinez-Santos, V.I., Finlay, B., y Puente, J. L. (2015). Identification and regulation of a novel *Citrobacter rodentium* gut colonization fimbria (Gcf). J Bacteriol. 197:1478–1491.

Campellone, K. y Leong, J. (2003). Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. Curr Opin Microbiol. 6: 82-90.

Campellone, K., Rankin, S., Pawson, T., Kirschner, M., Tipper, D. y Leong, J. (2014). Clustering of Nck by a 12-residue Tir phosphopeptide is sufficient to trigger localized actin assembly. J Cell Biol. 164:407–416.

Chauhan, N., Wrobel, A., Skurnik, M. y Leo, J. C. (2016). *Yersinia* adhesins: An arsenal for infection. Proteomics Clin Appl. 10: 949–963.

Chandrakesan, P., Roy, B., Jakkula, L., Ahmed, I., Ramamoorthy, P., PApineni, R., Houchen, C., Anant, S. y Umar, S. (2013). Utility of a bacterial infection model to study epithelial–mesenchymal transition, mesenchymal–epithelial transition or tumorigenesis. Oncogene. 33: 2639–2654.

Chen, J., Waddell, A., Lin, Y. y Cantorna, M. (2014). Dysbiosis caused by vitamin D receptor deficiency confers colonization resistance to *Citrobacter rodentium* through modulation of innate lymphoid cells. Natu Muc Immun. 8: 618-626.

Clegg, S., Wilson, J. y Johnson, J. (2011). More than one way to control hair growth: regulatory mechanisms in enterobacteria that affect fimbriae assembled by the chaperone/usher pathway. *J Bacteriol.* 193: 2081-2088.

Collins, J., Chervaux, C., Raymond, B., Derrien, M., Brazeilles, R. Kosta, A., Chambaud, I., Crepin, V. y Frankel, G. (2014). Fermented dairy products modulate *Citrobacter rodentium* induced colonic hyperplasia. *J Infect Dis.* 210: 1029–1041.

Crepin, V., Collins, J., Habibzay, M. y Frankel, G. (2016). *Citrobacter rodentium* mouse model of bacterial infection. *Nat Prot.* 11: 1851-1876.

Datsenko, K. y Wanner, B. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA.* 97: 6640–6645.

Dean-Nystrom, E., Gansheroff, L., Mills, M., Moon, H. y O'Brien, A. D. (2002). Vaccination of pregnant dams with intimin (O157) protects suckling piglets from *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Infect Immun.* 70: 2414–2418.

Deng, W., Li, Y., Vallance, B., y Finlay, B. (2001). Locus of enterocyte effacement from *Citrobacter rodentium*: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens. *Infect Immun.* 69: 6323–6335.

Deng, W., Liou, S. R., Plunkett, G., Mayhew, G. F., Rose, D. J., Burl, V., Kodoyianni, V., Schwartz, D. C. y Blattner, F. R. (2003). Comparative genomics of *Salmonella enterica* serovar Typhi strains Ty2 and CT18. *J Bacteriol* 185: 2330–2337.

Deng, W., Puente, J. L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B. A., Vázquez, A, *et al.* (2004). Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 3597–3602.

Deng, W., Li, Y., Hardwidge, P. R., Frey, E. A., Pfuetzner, R. A., Lee, S., Gruenheid, S., Strynakda, N. C., Puente, J. L. y Finlay, B. B. (2005). Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens. *Infect Immun.* 73: 2135–2146.

Dorman, C. (2004). H-NS: a universal regulator for a dynamic genome. *Nature Rev. Microbiol.* 2: 391–400.

Fitzhenry, R. J., Pickard, D. J., Hartland, E. L., Reece, S., Dougan, G., Phillips A. D. y Frankel, G. (2002). Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Gut*. 50:180–185.

Frankel, G., Phillips, A., Rosenshine, I., Dougan, G., Kaper, J. y Knutton, S. (1998). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol*. 30: 911–921.

Frankel, G., Phillips, A., Trabulsi, L., Knutton, S., Dougan, G. y Matthews, S. (2001). Intimin and the host cell is it bound to end in Tir(s)? *Trends Microbiol*. 9: 214– 218.

Frankel, G. y Phillips, A. (2008). Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cell Microbiol*. 10: 549–556.

Free, A. y Dorman, C. J. (1997). The *Escherichia coli* *stpA* gene is transiently expressed during growth in rich medium and is induced in minimal medium and by stress conditions. *J Bacteriol*. 179: 909–918.

Fronzes, R., Remaut, H. y Waksman, G. (2008). Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *EMBO J*. 27: 2271–2280.

Furniss, R. y Clements, A. (2018). Regulation of the locus of enterocyte effacement in attaching and effacing pathogens. *J Bacteriol*. 200:e00336-17.

Gaytán, M., Martínez-Santos V., Soto, E. y González-Pedrajo, B. (2016). Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*. 6:129.

Girón, J. A., Ho, A. S. y Schoolnik, G. K. (1991). An inducible bundle- forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*. 254:710–713.

Grainger, D. (2016). Structure and function of bacterial H-NS protein. *Biochemical Society Transactions*. 44: 1561-1569.

Grant, S. G., Jesse, J., Bloom, F.R. y Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 4645-4649.

Gueguen, E. y Cascales, E. (2013). Promoter swapping unveils the role of the *Citrobacter rodentium* CTS1 type VI secretion system in interbacterial competition. *Appl Environ Microbiol.* 79: 32–38.

Hart, E., Yang, J., Tauschek, M., Kelly, M., Wakefield, M. J., Frankel, G., Hartland, E. L. y Robins-Browne, R. M. (2008). RegA, an AraC-like protein, is a global transcriptional regulator that controls virulence gene expression in *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun.* 76: 5247-56.

Higgins, L., Frankel, G., Douce, G., Dougan, G. y MacDonald, T. (1999). *Citrobacter rodentium* infection in mice elicits a mucosal TH1 cytokine response and lesions similar to those in murine inflammatory bowel disease. *Infect Immun.* 67: 3031–3039

Iguchi, A., Thomson, N. R., Ogura, Y., Saunders, D., Ooka, T., Henderson, I. R., Harris, D., Asadulghani, M. y Kurokawa, K. (2009). Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *J Bacteriol.* 191: 347–354.

Johansson, J., Eriksson, S., Sondén, B., Wa, S. y Uhlin, B. (2001). Heteromeric Interactions among Nucleoid-Associated Bacterial Proteins: Localization of StpA-Stabilizing Regions in H-NS of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 183: 2343–2347.

Johnson, J. G. y Clegg, S. (2010). Role of MrkJ, a phosphodiesterase, in type 3 fimbrial expression and biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol.* 192: 3944–3950.

Kamada, N., Sakamoto, K., Seo, S., Zeng, M., Kim, Y., Cascalho, M., Vallance, B., Puente, J. L. y Núñez, G. (2015). Humoral Immunity in the Gut Selectively Targets Phenotypically Virulent Attaching-and-Effacing Bacteria for Intraluminal Elimination. *Cell Host & Microbe.* 17: 617–627.

Kuan, L., Schaffer, J. N., Zouzias, C. D. y Pearson, M. M. (2014). Characterization of 17 chaperone-usher fimbriae encoded by *Proteus mirabilis* reveals strong conservation. *J Med Microbiol.* 63: 911–922.

Lai, Y., Rosenshine, I., Leong, J. M. y Frankel, G. (2013). Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 15: 1796–1808.

- Leonard, P. G., Ono, S., Gor, J., Perkins, S. J., y Ladbury, J. E. (2009). Investigation of the self-association and hetero association interactions of H-NS and StpA from Enterobacteria. *Mol Microbiol.* 73: 165–179.
- Lim, C. J., Lee, S. Y., Kenney, L. J. y Yan, J. (2012). Nucleoprotein filament formation is the structural basis for bacterial protein H-NS gene silencing. *Sci Rep.* 2: 509.
- Lucchini, S., McDermott, P., Thompson, A. y Hinton, J.C. (2009). The H-NS-like protein StpA represses the RpoS (sigma 38) regulon during exponential growth of *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol.* 74: 1169–1186.
- Luijsterburg, M. S., Noom, M. C., Wuite, J. L., y Dame, R. T. (2006). The architectural role of nucleoid-associated proteins in the organization of bacterial chromatin: a molecular perspective. *J Struct Biol.* 156: 262–272
- Mallick, E., Mc Bee, M., Vanguri, V., Melton-Celsa, A., Schileper, K., Karalius, B., O'Brien, A., Butters, J., Leong, J. y Shauer, D. (2012). A novel murine infection model for Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Invest.* 122: 4012–4024.
- Martinez-Santos V., Medrano-López, A., Saldaña, Z., Girón, J. A. y Puente, J. L. (2012). Transcriptional regulation of the *ecp* operon by EcpR, IHF, and H-NS in attaching and effacing *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 194: 5020–5033.
- Mundy, R., Pickard, D., Wilson, R. K., Simmons, C. P., Dougan, G. y Frankel, G. (2003). Identification of a novel type IV pilus gene cluster required for gastrointestinal colonization of *Citrobacter rodentium*. *Mol Microbiol.* 48: 795-809.
- Mundy, R., MacDonald, T. T., Dougan, G., Frankel, G. y Wiles, S. (2005). *Citrobacter rodentium* of mice and man. *Cell Microbiol.* 7: 1697–1706.
- Muto, T., Nakagawa, M., Isobe, Y., Saito, M., y Nakano, T. (1969). Infectious megaenteron of mice. I. Manifestation and pathological observation. *Jpn J Med Sci Biol.* 22: 363– 374.
- Nataro, J. y Kaper, J. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11: 142-201

Nuccio, S. P. y Bäumlér A. J. (2007). Evolution of the Chaperone/Usher Assembly Pathway: Fimbrial. Classification Goes Greek. *Microbiol Mol Biol Rev.* 72: 551–575.

Perna, N. T., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G. F., Evans, P. S., Gregor, J. y Kirkpatrick, H. A. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nat.* 409: 529–533.

Peterson, S. N. y N. O. Reich. (2008). Competitive Lrp and Dam assembly at the pap regulatory region: implications for mechanisms of epigenetic regulation. *J Mol Biol.* 383: 92–105.

Petty, N. K., Bulgin, R., Crepin, V. F., Cerdeño-Tarraga, A. M., Schroeder, G. N., Quail, M. A., Lennard, N., Corton, C., Barron, A., Clark, L., Toribio, A. L., Parkhill, J., Dougan, G., Frankel, G. y Thomson, N. R. (2010). The *Citrobacter rodentium* genome sequence reveals convergent evolution with human pathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 192: 525–538.

Phillips, A. D. y Frankel, G. (2000). Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J Infect Dis.* 181: 1496–1500.

Proft, T. y Baker, E. N. (2009). Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci.* 66: 613– 635.

Puente, J. L., Bieber, D., Ramer, S. W., Murray, W. y Schoolnik, G. K. (1996). The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol.* 20: 87-100.

Pugsley, A. (1993). The complete general secretory pathway in Gram-negative bacteria. *Microbiol Rev.* 57: 50–108.

Saldaña, Z., Sánchez, E., Xicohtencatl-Cortes, J., Puente, J.L. y Girón, J. (2011). Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* O157:H7. *Front Microbiol.* 2:119.

Schauer, D. B. y Falkow, S. (1993). Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect. Immun.* 61: 2486–2492.

Schnetz, K. y Wang, J. C. (1996). Silencing of the *Escherichia coli bgl* promoter: effects of template supercoiling and cell extracts on promoter activity in vitro. *Nucleic Acids Res.* 24:2422–2428.

Sherlock, O., Vejborg, R. M. y Klemm, P. (2005) The TibA adhesin/invasin from enterotoxigenic *Escherichia coli* is self-recognizing and induces bacterial aggregation and biofilm formation. *Infect Immun.* 73: 1954–1963.

Solovyev, V., y Salamov, A. (2011). Automatic Annotation of Microbial Genomes and Metagenomic Sequences. In *Metagenomics and its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies* (Ed. R.W. Li), Nova Science Publishers. 61-78.

Tatsuno, I., Mundy, R., Frankel, G., Chong, Y., Phillips, A. D., Torres, A. G. y Kaper, J. B. (2006). The *lpf* gene cluster for long polar fimbriae is not involved in adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* or virulence of *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun.* 74: 265–272.

Torres, A., López-Sánchez, G., Milflores-Flores, L., Patel, S., Rojas-López, M., Martínez de la Peña, C., Arenas-Hernández, M. y Martínez-Laguna, Y. (2007). Ler and H-NS, regulators controlling expression of the long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol.* 189:5916–5928.

Uzzau, S., Figueroa-Bossi, N., Rubino, S. y Bossi, L. (2001). Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:15264– 15269.

Waksman, G. y Hultgren, S. J. (2009). Structural biology of the chaperone–usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 7: 765–774.

Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., Redford, P. y Roesch, P. (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99: 17020–17024.

Wiles, S., Clare, S., Harker, J., Huett, A., Young, D., Dougan, G. y Frankel, G. (2004). Organ specificity, colonization and clearance dynamics *in vivo* following oral challenges with the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. *Cell Microbiol.* 6: 963–972.

Yang, J., Hart, E., Tauschek, M., Price, G. D., Hartland, E. L., Strugnell, R. A. y Robins-Browne, R. M. (2008). Bicarbonate-mediated transcriptional activation of

divergent operons by the virulence regulatory protein, RegA, from *Citrobacter rodentium*. Mol Microbiol. 68: 314-327.

Yang, J., Tauschek, M., Hart, E., Hartland, E. L. y Robins-Browne, R. M. (2010). Virulence regulation in *Citrobacter rodentium*: the art of timing. Microb Biotechnol. 3(3):259-68.

Yeh, K. S., Tinker, J. K. y Clegg, S. (2002). FimZ binds the *Salmonella typhimurium* fimA promoter region and may regulate its own expression with FimY. Microbiol Immunol. 46: 1–10.

Yue, M., Rankin, S., Blanchet, R., Nulton, J., Edwards, R. y Schifferli, D. (2012). Diversification of the *Salmonella* fimbriae: a model of macro and microevolution. PLoS One. 7: e38596.

Zhou, Z., Li, X., Liu, B., Beutin, L. y Xu, J. (2010) Derivation of *Escherichia coli* O157:H7 from its O55:H7 precursor. PLoS One. 5: e8700.