



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

“Análisis de la expresión de los operones fimbriales de la familia chaperonau-
usher *pmf* y *tsf* de *Citrobacter rodentium*.”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Stephanie Ortiz Jiménez

TUTOR PRINCIPAL
Dr. José Luis Puente García (Instituto de biotecnología-UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Cinthia Ernestina Núñez López (Instituto de biotecnología-UNAM)
Dr. Fernando Navarro García (CINVESTAV-MÉXICO)

Cuernavaca, Morelos. Agosto, 2019.



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.

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. A mi comité tutorial, la Dra. Cinthia Núñez López y el Dr. Fernando Navarro García por las aportaciones que hicieron a este proyecto.

A todos los miembros del laboratorio número dos del Instituto de biotecnología. Particularmente a la M. en C. María Inés Isidro Coxca por todas sus enseñanzas y su ayuda durante el desarrollo de cada experimento que realicé. También quiero agradecer de manera especial al Dr. Ismael Hernández Lucas por la atención y el interés en este proyecto y en mi formación. Agradezco también a sus alumnos; la Dra. Liliana Medina Aparicio y al M. en C. Javier Esteban Rebollar Flores por todas sus enseñanzas en cuanto al trabajo con RNA.

Así mismo, agradecer al jurado conformado por el Dr. David René Romero Camarena, Dr. Ernesto Ortiz Suri, Dr. Miguel Ángel Cevallos Gaos, Dra. Claudia Martínez Ayala y la Dra. Liliana Pardo López, por sus comentarios y sugerencias que enriquecieron la escritura de esta tesis.

Y, por último, quiero agradecer a la Dra. Lucía Perezgasga Ciscomani, al M. en C. Marcos Fernández Mora, a la Dra. Alejandra Vázquez Ramos y al Biól. Francisco Javier Santana Estrada por el apoyo técnico, así como a la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (Programa UNAM-PAPIIT IN213516 y IN215119) y CONACyT CB-239659 y FC-2015-2/950, por los recursos otorgados para la realización de este proyecto, así como al “Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado” por el apoyo para asistir a congresos.

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio número 2 del Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. José Luis Puente García y como parte del Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas de la misma Universidad.

Durante la realización de mi trabajo, recibí una beca por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de beca 482509 y número de registro 631156, durante el periodo comprendido de septiembre 2017 a agosto 2019.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Características generales de los patógenos A/E.....	1
1.2 <i>Citrobacter rodentium</i> como modelo de estudio.....	4
1.3 Factores de virulencia presentes en <i>C. rodentium</i>	6
1.3.1 Las fimbrias como factores de virulencia.....	6
1.3.2 El Sistema de Secreción Tipo 6 (SST6) como factor de virulencia... ..	16
2. ANTECEDENTES.....	19
2.1. Expresión y regulación de operones fimbriales de la familia CU de <i>C. rodentium</i>	19
2.1.1. KFC	20
2.1.2. GCF	21
2.1.3. PMF (ROD_11771-11791).....	22
2.1.4. TSF (ROD_27771-27801)	23
2.2 Expresión y funcionalidad del SST6 en <i>C. rodentium</i>	25
2.2. Proteínas homólogas de H-NS en <i>C. rodentium</i>	26
3. JUSTIFICACIÓN.....	27
4. HIPÓTESIS.....	28
5. OBJETIVOS.....	28
5.1. Objetivo general.	28
5.2. Objetivos particulares.....	28
6. METODOLOGÍA	29
6.1 Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento.....	29
6.2. Diseño de oligonucleótidos y reacciones en cadena de la polimerasa. .	31
6.3 Construcción de fusiones transcripcionales al gen <i>cat</i>	35
6.4 Predicción de promotores.	36

6.5 Ensayos de actividad transcripcional (Cloranfenicol acetil transferasa, CAT). 36	
6.6 Etiquetado de proteínas con el epítoto FLAG	37
6.7 Clonación de los genes etiquetados en los plásmidos pMPPM-K3 y pMPPM-T3 para su sobreexpresión.	38
6.8. Western Blot.....	38
6.9. Perfil de secreción.....	40
6.10. Extracción de RNA.....	40
6.11 RT-PCR.....	41
7. RESULTADOS	41
7.1. Resultados del operón <i>pmf</i>	41
7.1.1. Regulación de <i>pmf</i> por H-NS, StpA, CicR, pehH y Ler.	41
7.1.3. Análisis de la organización transcripcional del operón <i>pmf</i>	48
7.2. Resultados del operón <i>tsf</i>	51
7.2.1 La fusión <i>tssF-tssH-cat</i> es activa en ausencia de H-NS.	51
8. DISCUSIÓN.....	58
9. CONCLUSIONES.....	67
9.1 Conclusiones del operón <i>pmf</i>	67
9.2 Conclusiones del operón <i>tsf</i>	67
10. PERSPECTIVAS	67
10.1. Perspectivas para el operón <i>pmf</i>	67
10.2 Perspectivas del operón <i>tsf</i>	68
11. ANEXOS.....	68
12. REFERENCIAS	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía de la formación de pedestales de actina en EPEC.	1
Figura 2. Isla de patogenicidad LEE.....	2
Figura 3. Modelo del mecanismo de formación de la lesión A/E en EPEC.	4
Figura 4. Clasificación de las fimbrias.	7
Figura 5. Estructura básica de una fimbria CU.....	9
Figura 6. Regulación de la expresión de la fimbria Tipo I de <i>E. coli</i>	12
Figura 7. Regulación de la fimbria Pap de <i>E. coli</i>	13
Figura 8. Modelo de la regulación de la fimbria Tipo 3 en <i>K. pneumoniae</i>	14
Figura 9. Mecanismos de represión por H-NS.	15
Figura 10. Biogénesis y mecanismo de acción del SST6.....	18
Figura 11. KFC es importante para la colonización de <i>C. rodentium</i> durante los días 15-20 pi.....	21
Figura 12. GCF es importante para <i>C. rodentium</i> durante los primeros días de colonización.	22
Figura 13. <i>pmf</i> es regulado negativamente por H-NS y StpA.....	23
Figura 14. El operón <i>tsf</i> es regulado negativamente por H-NS	24
Figura 15. Composición genética del CTS1.	25
Figura 16. CicR, PehH y Ler no participan en la regulación de <i>pmf</i>	42
Figura 17. Perfil de proteínas secretadas de las cepas etiquetadas con el epítotope FLAG.	43
Figura 18. Esquema de los genes clonados en los plásmidos pMPPM-K3 y pMPPM-T3.....	45
Figura 19. Expresión de la chaperona PmfA.....	46
Figura 20. Expresión de la proteína hipotética PmfC.	47
Figura 21. Organización transcripcional del operón <i>pmf</i>	50
Figura 22. Regiones del operón fimbrial <i>tsf</i> y de los operones del SST6 <i>cts1L</i> y <i>cts1R</i> clonadas en el plásmido pKK232-8.	51
Figura 23. Promotores predichos con BPROM de la región clonada en las fusiones TssF-int-cat y TssF-H-cat.	52
Figura 24. H-NS regula negativamente la expresión del operón <i>cts1R-tsf</i>	53
Figura 25. El promotor localizado en la región intergénica entre los genes <i>tssH</i> y <i>tsfA</i> es regulado negativamente por H-NS, CicR y PehH.	54

Figura 26. H-NS regula negativamente la expresión del operón *cts1R-tsf*..... 55

Figura 27. Identificación de la región mínima reguladora del operón *cts1R-tsf*
..... 57

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Abundancia de fimbrias CU en enterobacterias.	8
Tabla 2. Elementos de regulación de las fimbrias CU en enterobacterias.	11
Tabla 3. Componentes estructurales del SST6.	16
Tabla 4. Operones identificados en <i>C. rodentium</i>	19
Tabla 5. Proteínas homólogas a H-NS en <i>C. rodentium</i>	26
Tabla 6. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.	29
Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.	31

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Esquema de la composición estructural de los operones CU de <i>C. rodentium</i>	68
Anexo 2. Ortólogos del operón <i>pmf</i>	70
Anexo 3. Motivos presentes en la proteína hipotética PmfC..	70
Anexo 4. Motivos presentes en la proteína hipotética PmfC (ROD_11791) de <i>C. rodentium</i> y en su ortólogo EcWSU1_04028 de <i>E. ludwigii</i>	71
Anexo 5. Búsqueda de elementos de regulación del operón <i>pmf</i>	72
Anexo 6. Ortólogos del operón <i>tsf</i>	73
Anexo 7. Estructura genética del SST6 de <i>S. Typhimurium</i> y de <i>C. rodentium</i>	74
Anexo 8. Predicción de promotores del operón <i>tsf</i>	74

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Características generales de los patógenos A/E.

Los patógenos A/E (por sus siglas en inglés: *Attaching and effacing*) deben su nombre a que causan una lesión denominada de adherencia y esfacelamiento. Esta lesión se caracteriza por la eliminación de las microvellosidades presentes en las células epiteliales del intestino (enterocitos), una adherencia estrecha de las bacterias a las membranas de estas células y por reacomodos en el citoesqueleto del hospedero. Estos últimos, permiten la acumulación de actina polimerizada justo donde la bacteria hace contacto con el enterocito, formando estructuras tipo pedestal que llegan a medir alrededor de 10 μm (Figura 1) (Frankel y Phillips, 2008; Frankel *et al.*, 1998).

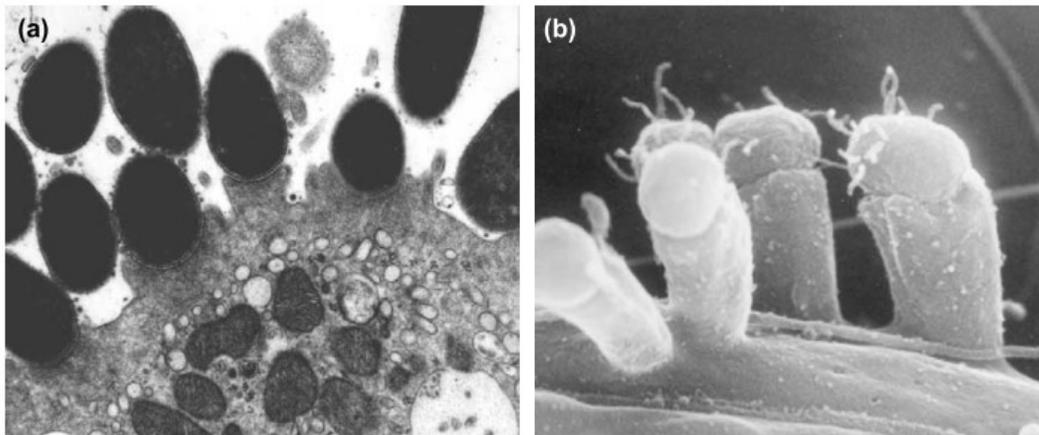


Figura 1. Micrografía de la formación de pedestales de actina en EPEC. A) Formación de la lesión A/E en células epiteliales del intestino de cerdos gnotobióticos; B) Formación del pedestal de actina en células HeLa (Modificada de Campellone *et al.*, 2003).

Esta familia incluye a los patógenos humanos *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), y a *Citrobacter rodentium* un patógeno específico de ratón. EPEC es el principal causante de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, mientras que EHEC es responsable de diarreas hemorrágicas en adultos, provocadas por la acción de la toxina tipo Shiga producida por cepas principalmente de los serogrupos O157, O26, O103, O111 y O145, la cual puede causar complicaciones adicionales como el síndrome urémico hemolítico (HUS), que conlleva a fallas renales irreversibles que pueden desencadenar la muerte (Nataro y Kaper, 1998). Por su parte, *C. rodentium* es causante de colitis e hiperplasia transmisible del colon, una

enfermedad caracterizada por la proliferación descontrolada de las células epiteliales en el colon, la cual puede desencadenar episodios de diarrea en ratones (Mundy *et al.*, 2005).

Aunque los patógenos A/E causan la misma lesión, tienen un tropismo diferente: EPEC coloniza el intestino delgado, específicamente el duodeno, el íleon y las placas de Peyer; EHEC coloniza preferencialmente las placas de Peyer y el intestino grueso; y *C. rodentium* inicia la colonización en el tejido linfóide del ciego y eventualmente en el colon que es donde se establece (Phillips *et al.*, 2000; Fitzhenry *et al.*, 2002; Mundy *et al.*, 2005).

EPEC, EHEC y *C. rodentium* comparten 2940 genes (Petty *et al.*, 2010). Entre el conjunto de genes comunes de los patógenos A/E se encuentra la isla de patogenicidad LEE (Figura 2) (por sus siglas en inglés: *Locus of enterocyte effacement*) que confiere el fenotipo A/E.

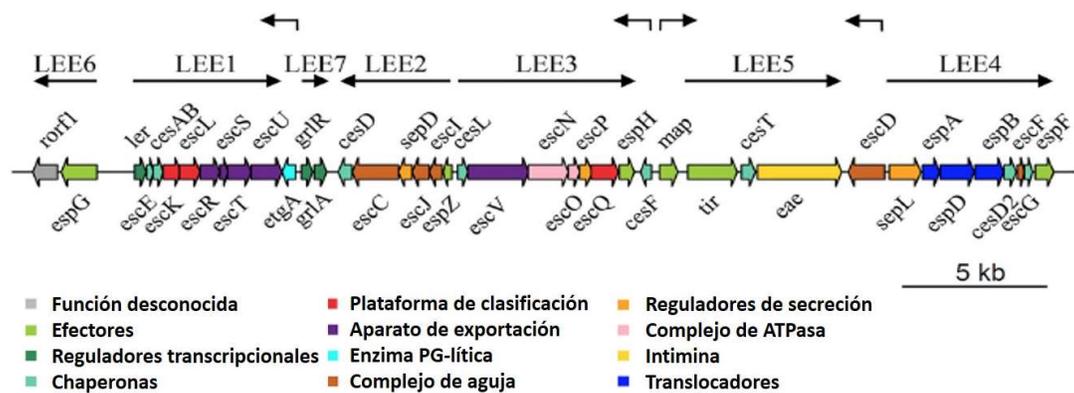


Figura 2. Isla de patogenicidad LEE. Estructura genética de la isla de patogenicidad LEE de EPEC (E2348/69 O127:H6). Se ilustran los genes contenidos dentro de cada operón y en la parte de abajo con colores se describen las funciones descritas para cada gen (Modificada de Gaytán *et al.*, 2016).

La isla de patogenicidad LEE consta de 35 kb con 41 genes organizados en cinco operones policistrónicos, dos bicistrónicos y cuatro unidades monocistrónicas. LEE codifica para todos los componentes estructurales de un sistema de secreción tipo 3 (SST3) por el que se translocan diversas proteínas efectoras hacia los enterocitos. Algunos de los efectores que se translocan por este sistema también se codifican dentro del LEE: EspB, EspF, EspG, EspH, EspZ y Map, así como 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). LEE también codifica para la adhesina “intimina” y su receptor “Tir”, además de para componentes cruciales para la regulación y expresión de la isla tales como Ler, GrIR y GrIA (Schmidt, 2010), así como para las proteínas SepL y SepD que forman un interruptor molecular que confiere especificidad al SST3 para secretar los diferentes efectores (Deng *et al.*, 2005). Además de la regulación mediada por las proteínas antes mencionadas, la expresión de LEE es modulada transcripcional y post-transcripcionalmente por varios reguladores globales en respuesta a diversos estímulos ambientales y percepción de quórum (Connolly *et al.*, 2015).

El mecanismo mediante el cual los patógenos causan la lesión A/E se divide en tres etapas para su estudio, aunque éstas no son sucesivas o excluyentes entre sí. En la etapa inicial las bacterias se adhieren a los enterocitos mediante la interacción con fimbrias Tipo IV (Figura 3A). En EPEC se expresa la fimbria BFP (por sus siglas en inglés: *Bundle-Forming Pilus*), en EHEC HCP (por sus siglas en inglés: *Hemorrhagic coli Pilus*) y en *C. rodentium* CFC (por sus siglas en inglés: *Colonization Factor Citrobacter*) (Girón *et al.*, 1991; Mundy *et al.*, 2003; Xicohtencatl-Cortés *et al.*, 2007). El siguiente paso involucra el ensamblaje del SST3 codificado en el LEE, vía el cual se translocan diversos efectores (Figura 3B). EPEC O127:H7 posee 22 genes funcionales que codifican para efectores que son sustrato del SST3 y por lo tanto potencialmente translocados al enterocito, EHEC O157:H7 50 genes y *C. rodentium* 29 genes (Tobe *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2010, 2012; Petty *et al.*, 2010). Cada efector tiene propiedades distintas por lo que de manera orquestada ayudan al patógeno a subvertir diversos procesos celulares (Gaytán *et al.*, 2016). Tir es la primera proteína efectora que se secreta, se ancla a la membrana de la célula eucariota y funciona como receptor para una adhesina llamada intimina, la cual se localiza en la membrana de la bacteria. La interacción entre estas dos proteínas provoca una adherencia más estrecha entre la bacteria y el enterocito (Figura 3C). Tir tiene un dominio extracelular para interactuar y unirse a intimina, a la vez que su dominio N y C terminal se

encuentran en el citoplasma de la célula hospedera donde son capaces de interactuar con componentes de señalización del citoesqueleto eucarionte y por tanto de inducir la formación del pedestal (Luo *et al.*, 2000; De Grado *et al.*, 1999). Tir recluta Nck al sitio de adherencia, que a su vez recluta a la proteína N-WASP (por sus siglas en inglés: neural Wiskott-Aldrich syndrome protein) y al complejo ARP2/3 (por sus siglas en inglés: actin-related protein 2/3) para mediar la formación del pedestal de actina justo donde la bacteria hace contacto con el enterocito (Lai *et al.*, 2013). Esta es la tercera etapa del mecanismo de formación de la lesión A/E.

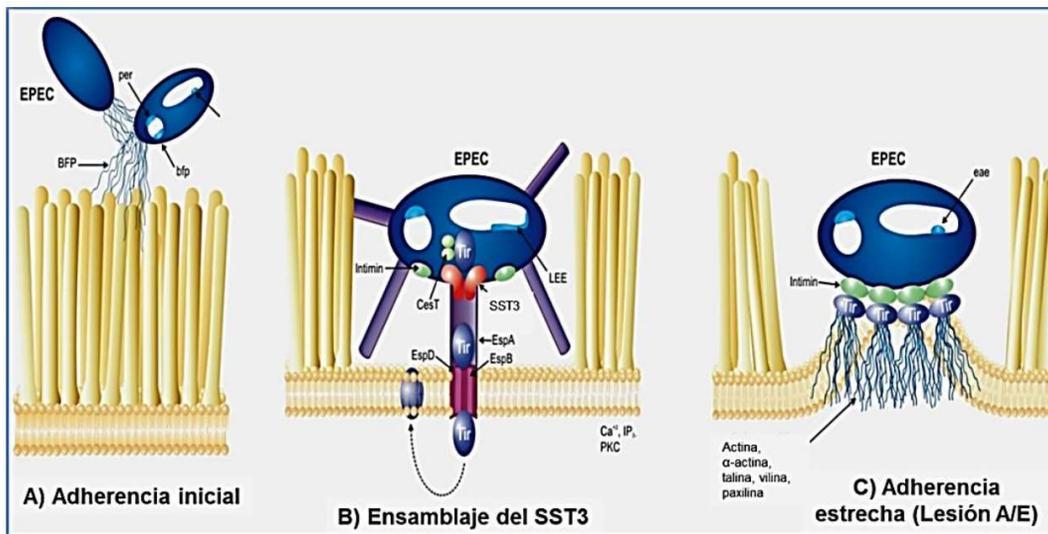


Figura 3. Modelo del mecanismo de formación de la lesión A/E en EPEC. A) Adherencia inicial. EPEC interactúa con las células epiteliales del intestino vía la fimbria BFP, la cual se encuentra codificada dentro del plásmido EAF. B) Ensamblaje del SST3. EPEC va a translocar alrededor de 22 proteínas efectoras al citoplasma eucarionte vía el SST3. C) Adherencia estrecha. La proteína efectora Tir se ancla a la membrana del enterocito e interactúa con la adhesina bacteriana intimina para establecer una adherencia más estrecha, además de inducir cambios en el citoesqueleto que permiten la formación del pedestal rico en actina (Strynadka y Ness, 2002, comunicación personal).

1.2 *Citrobacter rodentium* como modelo de estudio.

C. rodentium es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la familia de las *Enterobacteriaceae* causante de colitis e hiperplasia transmisible del colon en ratones. La hiperplasia del colon se define por un adelgazamiento de la mucosa colónica y por un engrosamiento de las criptas del colon, las cuales son causadas por una regeneración excesiva del epitelio, así como del incremento

de la expresión de los mecanismos de reparación celular (Luperchio y Schauer, 2001; Shauer y Falkow, 1993).

La infección por *C. rodentium* se transmite por la vía oral-fecal y su severidad es influenciada por el contexto genómico del hospedero. Mientras que para unas cepas de ratones la infección por *C. rodentium* se elimina unas semanas después de que ésta comienza, para otras cepas la infección puede resultar en inflamación severa y una fuerte deshidratación, provocando la muerte del hospedero (Papapietro *et al.*, 2013).

La infección por *C. rodentium* resulta en la formación de lesiones A/E, lo cual lo convierte en un organismo modelo para estudiar el mecanismo de patogenicidad de los patógenos A/E, proporcionando evidencia que nos ayude a entender, al menos en parte, los eventos que podrían ocurrir en un hospedero humano infectado por EPEC o EHEC, y para las cuales no se cuenta con un modelo animal que permita su estudio *in vivo*. Como se mencionó anteriormente, los patógenos A/E comparten alrededor de 2940 genes (Petty *et al.*, 2010). Mutantes de varios de estos genes en *C. rodentium* han permitido ampliar el estudio de su función *in vivo* aportando conocimiento sobre el mecanismo de patogenicidad de esta familia de bacterias. Sin embargo, estos patógenos cuentan con genes no compartidos que les proveen de diversas ventajas. Tal es el caso de EHEC, el patógeno A/E capaz de producir toxinas tipo Shiga (Stx), las cuales, una vez dentro de las células eucariotas, inhiben la síntesis de proteínas al inactivar a los ribosomas (O'Loughlin y Robins-Browne, 2001). Actualmente, se ha construido una cepa de *C. rodentium* que expresa Stx para poder estudiar *in vivo* su función y de esta manera generar información que lleve a un mejor entendimiento de la patogénesis de EHEC en el humano (Mallick *et al.*, 2012).

Además de sus aportaciones al entendimiento de la patogénesis A/E, el estudio de la infección por *C. rodentium* provee un modelo que permite el estudio de diferentes aspectos de la interacción patógeno-hospedero en el intestino, incluyendo las respuestas inflamatorias intestinales durante el desarrollo de la hiperplasia del colon, los efectos producidos en la mucosa, así como la respuesta inmune en esta zona, el recambio del epitelio intestinal y la

importancia de la microbiota en la resistencia a la colonización por patógenos entéricos (Bouladoux *et al.*, 2017).

C. rodentium también se usa como modelo para estudiar otros desórdenes intestinales presentes en humanos, como lo son: enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y cáncer de colon (Chandrakesan *et al.*, 2014; Higgins *et al.*, 1999).

1.3 Factores de virulencia presentes en *C. rodentium*.

Además de los factores de virulencia codificados en la isla de patogenicidad LEE, el genoma de *C. rodentium* contiene otras islas de patogenicidad, elementos genéticos móviles como profagos y secuencias de inserción que codifican para un repertorio de efectores no codificados por LEE (Nle: Non LEE-encoded effectors), además de sistemas de secreción de tipo I, II, III y VI, adhesinas fimbriales y no fimbriales, sistemas de dos componentes, reguladores de percepción de quórum, transportadores y otras proteínas reguladoras que le permiten a esta bacteria responder a distintos estímulos y están involucrados en su patogenicidad (Petty *et al.*, 2010).

1.3.1 Las fimbrias como factores de virulencia.

Las fimbrias son apéndices proteicos filamentosos presentes en las superficies bacterianas que son utilizados para diversas funciones tales como: adherencia e invasión, formación de biopelículas, movilidad y transporte de proteínas a través de las membranas (Waksman y Hultgren, 2009).

Las fimbrias juegan un papel importante durante el ciclo de vida de una bacteria patógena, ya que las proteínas localizadas en la punta, llamadas adhesinas, tienen la capacidad de reconocer diversos ligandos que le proporcionan cierto tropismo o especificidad por un nicho, tejido o célula del hospedero, reservorio biótico o abiótico particular, e incluso les permiten interactuar con otras bacterias. En general, estas estructuras favorecen el reconocimiento y la permanencia en un nicho apto para su supervivencia (Patel *et al.*, 2017). Como un ejemplo, *E. coli* uropatógena (UPEC) expresa dos fimbrias pertenecientes a la familia Chaperona-Usher (CU), la fimbria tipo I y la fimbria Pap, que juegan un papel importante durante la colonización del hospedero y por tanto en el resultado de una infección por esta bacteria. La fimbria tipo I se une a las células epiteliales de la vejiga y del riñón al reconocer

proteínas D-manosiladas a través de la adhesina FimH, causando cistitis; mientras que para la fimbria Pap, la adhesina PapG se une a motivos Gal α -1,4-Gal β presentes en glicolípidos de las células epiteliales del riñón, causando pielonefritis (Korea *et al.*, 2011).

Por su parte, los patógenos A/E deben adherirse a los enterocitos para poder colonizar a su hospedero. En sus etapas iniciales, esta interacción está mediada por fimbrias.

1.3.1.1 Clasificación de las fimbrias.

En un principio las fimbrias se clasificaban según su morfología y función; sin embargo, estas características son muy variables y no reflejan las relaciones filogenéticas de estas estructuras. Por esta razón, actualmente las fimbrias se clasifican según su ruta biosintética en cinco familias: fimbrias CU, fimbrias tipo curli, fimbrias tipo IV, fimbrias dependientes del SST3 y fimbrias dependientes del SST4 (Fronzes, *et al.*, 2008) (Figura 4).

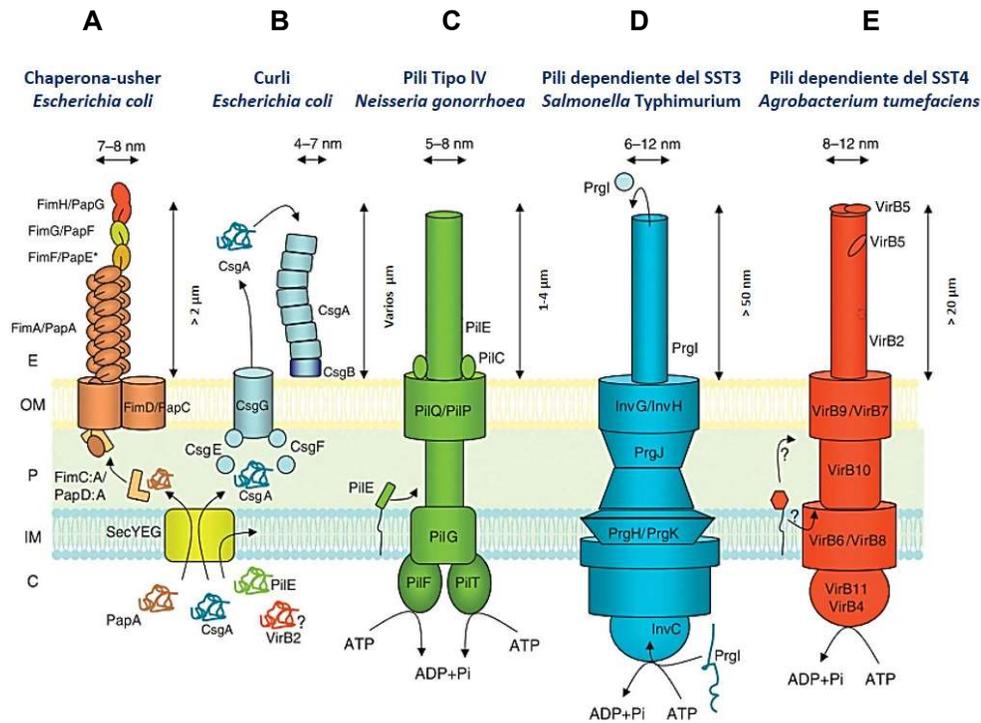


Figura 4. Clasificación de las fimbrias. Esquema de las 5 familias de fimbrias presentes en bacterias Gram-negativas: fimbrias CU (A), fimbrias tipo curli (B), fimbrias tipo IV (C), fimbrias dependientes del SST3 (D) y las fimbrias dependientes del SST4 (E). Las fimbrias CU y curli se ensamblan vía maquinarias localizadas en la membrana externa, mientras que las fimbrias tipo

IV, y dependientes de los sistemas de secreción tipo III y IV requieren de una maquinaria compuesta de complejos proteínicos que cruzan toda la envoltura celular (Modificada de Fronzes *et al.*, 2008).

En este trabajo nos enfocaremos en el estudio de las fimbrias pertenecientes a la familia CU. Esta familia se divide, a su vez, en 6 clados: fimbrias α , β , γ (subdividido en γ_1 , γ_2 , γ_3 y γ_4), κ , π y σ . Los clados reflejan la filogenia de estas estructuras basándose en uno de los genes necesarios para el ensamblaje de la fimbria y que se encuentra representado en una copia única dentro de los operones CU, el gen del *usher*. La filogenia está sustentada por similitudes en la organización de los operones fimbriales y en la morfología de los filamentos dentro de cada clado (Nuccio y Baumler, 2007).

1.3.1.2 Biogénesis de las fimbrias CU.

Las enterobacterias contienen un número variable y amplio de operones fimbriales. De este repertorio fimbrial, aproximadamente 2/3 pertenecen a la familia CU (Wurpel *et al.*, 2013) (Tabla 1).

Tabla 1. Abundancia de fimbrias CU en enterobacterias.

Enterobacteria	Número de operones CU	Referencia
UPEC CFT073	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
ETEC (<i>E. coli</i> enterotoxigénica) O78:H11 H10407	13	Crossman <i>et al.</i> 2010
<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

Modificada de Wurpel *et al.*, 2013.

Las fimbrias CU se componen de al menos tres proteínas codificadas en operones (Figura 5A); una subunidad fimbrial principal o pilina que va a dar

cuerpo y forma al filamento fimbrial, una chaperona periplásmica que interacciona con los demás componentes fimbriales para prevenir interacciones prematuras entre éstos o su degradación, y una proteína *usher*, localizada en la membrana externa de las bacterias que sirve de soporte para el ensamblaje del filamento (Figura 5B) (Nuccio y Bäumler, 2007). Sin embargo, los operones de las fimbrias CU pueden contener genes que codifican para otras subunidades fimbriales, adhesinas, proteínas adaptadoras, reguladores transcripcionales u otros genes accesorios que en su mayoría son de función desconocida (Anexo 1).

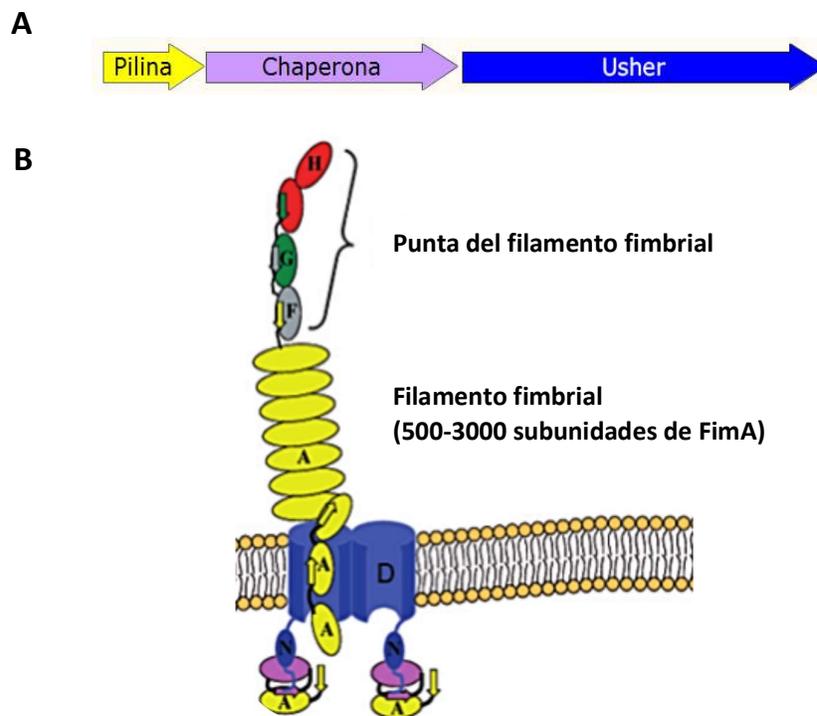


Figura 5. Estructura básica de una fimbria CU. A) Composición básica de un operón CU. Se requieren al menos tres genes para el ensamblaje de una fimbria CU: una pilina (amarillo), una chaperona (lila) y una proteína *usher* (azul). B) Estructura de la fimbria tipo I de UPEC (Modificado de Proft y Baker, 2009).

Las adhesinas son subunidades fimbriales que se componen de dos dominios: un dominio C-terminal estructural y un dominio N-terminal de reconocimiento y unión a lectina que reconoce específicamente carbohidratos en las células epiteliales del hospedero (Busch *et al.*, 2015). Las subunidades fimbriales en su estado individual son proteínas inestables debido a un defecto en su

plegamiento: contienen seis láminas- β en su dominio de inmunoglobulina, la ausencia de la séptima lámina- β característica de este tipo de plegamiento resulta en regiones hidrofóbicas (Sauer *et al.*, 1999). Las pilinas adquieren una conformación estable únicamente al interactuar con su chaperona cognado. La chaperona es una proteína localizada en el periplasma bacteriano de alrededor de 23-25 kDa, compuesta de dos dominios Ig-like (Busch *et al.*, 2015). Uno de estos dominios va a completar el dominio de inmunoglobulina de las pilinas, ocupando el lugar de la séptima lámina- β en un proceso denominado complementación de la cadena donadora (DSC por sus siglas en inglés: *donor strand complementation*). El complejo chaperona-pilina es capaz de interactuar con la proteína *usher* donde se va a ensamblar el filamento. La proteína *usher* tiene cinco dominios estructurales: un dominio N-terminal periplásmico (NTD), un dominio de translocación/poro constituido por 24 hojas β transmembranales embebidas en la membrana externa, el cual es interrumpido por un dominio “enchufe” (plug), y dos dominios C-terminales localizados en el periplasma (Thanassi *et al.*, 2002). El *usher* puede estar en dos estados: activo e inactivo. En su estado inactivo, el poro de translocación se encuentra bloqueado por el dominio tipo enchufe, evitando el paso de solutos o de proteínas periplásmicas; en el estado activo, el dominio tipo enchufe se orienta fuera del poro de translocación para permitir el paso de las subunidades fimbriales. Para que el *usher* adquiera su conformación activa, es necesaria la interacción con el primer complejo chaperona-pilina (o adhesina) (Busch *et al.*, 2015). Una vez asociadas al *usher*, las subunidades fimbriales se van a ensamblar en un proceso denominado intercambio de la cadena donadora (DSE por sus siglas en inglés: *Donor Strand Exchange*). Todas las subunidades fimbriales tienen una extensión de 10-18 residuos en su extremo N-terminal, que desplaza a la cadena donadora proveniente de la chaperona y ocupan su lugar en el dominio de inmunoglobulina de las subunidades fimbriales (Busch *et al.*, 2015).

Los filamentos fimbriales CU pueden tener diversas morfologías y llegar a medir alrededor de 7-8 nm de ancho y hasta 2 μ m de largo (Allen *et al.*, 2012). La fimbria tipo I de *E. coli* uropatógena (UPEC) es un filamento helicoidal con giro hacia la derecha de aproximadamente 3 μ m de longitud, compuesto de la subunidad fimbrial principal (FimA), unido a un filamento delgado y flexible, de

aproximadamente 15 nm, compuesto de una adhesina (FimH) y subunidades fimbriales adaptadoras (FimG y FimF) (Hahn *et al*, 2002) (Figura 5B).

1.3.1.3 Mecanismos de regulación de la expresión de operones fimbriales CU.

La expresión de operones fimbriales CU en enterobacterias es regulada en respuesta a las señales del entorno por mecanismos que involucran elementos de DNA invertibles, la concentración celular del segundo mensajero di-GMP cíclico, metilación de DNA y diversas proteínas de unión a DNA entre las que se encuentra H-NS como un regulador negativo (Clegg *et al.*, 2011) (Tabla 2).

Tabla 2. Elementos de regulación de las fimbrias CU en enterobacterias.

Características	Fimbria	Reguladores conocidos
Elementos invertibles de DNA	<i>E. coli</i> CS18 <i>E. coli</i> Fim <i>Klebsiella pneumoniae</i> Fim <i>K. pneumoniae</i> Kpc <i>P. mirabilis</i> Mrp	FotST FimBE, IcsR, Lrp, IHF FimK Kpci Mrpl
Metilación de DNA	<i>E. coli</i> Pap <i>E. coli</i> K88 <i>E. coli</i> K99 <i>E. coli</i> Sfa <i>S. Typhimurium</i> Pef <i>S. Typhimurium</i> Std	PapI, Lrp FaeA, Lrp Mbf SfaX PefL SeqA, HdfR, RosE
di-GMPc	<i>K. pneumoniae</i> Mrk <i>Pseudomonas aeruginosa</i> CupA <i>P. aeruginosa</i> CupB <i>P. aeruginosa</i> CupC <i>P. aeruginosa</i> CupD	MrkJ PA1120, MorA, PvrR, MvaT RocS1, RocA1, RocR, MvaT RocS1, RocA, RocR, MvaT PvrR, RcsB, RcsC
Otros elementos de unión a DNA	<i>Bordetella pertussis</i> Fha <i>C. rodentium</i> KFC <i>E. coli</i> 987P <i>E. coli</i> CFA/I <i>E. coli</i> CS1 <i>E. coli</i> CS2 <i>E. coli</i> CS17 <i>E. coli</i> CS19 <i>E. coli</i> PCO71 <i>E. coli</i> F1C <i>E. coli</i> Lpf <i>S. Typhimurium</i> Fim	BvgAS RegA, H-NS FasH Rns Rns, H-NS Rns Rns Rns Rns Rns FocB Ler, H-NS FimZYW

Modificado de Clegg *et al.*, 2011.

1.3.1.3.1 Elementos invertibles de DNA

La fimbria Tipo I de *E. coli* se encuentra codificada dentro de un operón compuesto por *fimC*, que codifica para una chaperona; *fimD* que codifica para la proteína *usher*, *fimH* que codifica para una adhesina y otros genes que codifican para subunidades fimbriales (*fimA*, *fimG* y *fimF*) (Figura 5B), siendo *fimA* el gen que codifica para la subunidad fimbrial principal. *fimA* es el primer gen del operón y su transcripción es dependiente de la dirección en la que se encuentre un elemento invertible de DNA, denominado *fimS*. Este elemento es una región de 314 pares de bases (pb) que incluye al promotor de *fimA*, el cual se encuentra flanqueado por dos secuencias repetidas invertidas de 9 pb. La inversión de *fimS* es mediada por la acción de dos recombinasas; FimB y FimE, que actúan uniéndose a regiones cerca o dentro de las secuencias repetidas invertidas de 9 pb. Se sabe que la función principal de FimE es invertir el fragmento para pasar del estado activo al estado inactivo, evitando la producción de la fimbria Tipo I; mientras que FimB puede interferir en la inversión de *fimS* en ambos sentidos pasando de un estado activo a inactivo y viceversa (Figura 6) (Holden *et al.*, 2007).

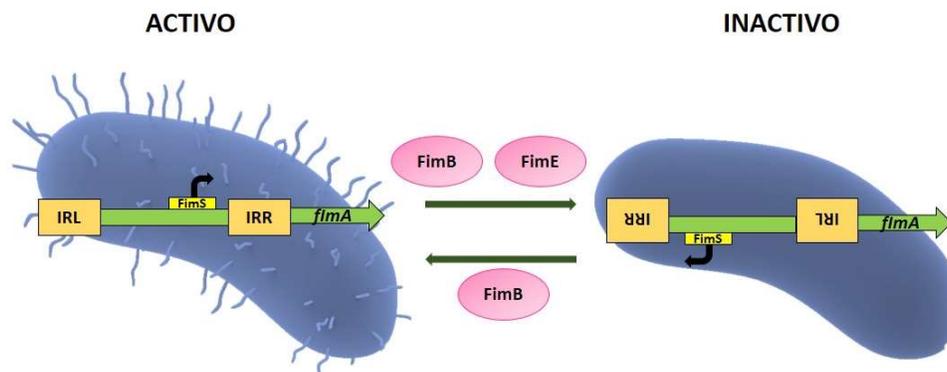


Figura 6. Regulación de la expresión de la fimbria Tipo I de *E. coli*. La expresión de la fimbria Tipo I depende de la orientación de *fimS* (ilustrado en amarillo brillante). *fimS* incluye al promotor de este operón fimbrial y está flanqueado por secuencias repetidas invertidas: IRL e IRR (ilustradas en amarillo opaco). Cuando FimB orienta en su forma activa a *fimS* el operón fimbrial se transcribe, puesto que el promotor se encuentra posicionado apropiadamente; por el contrario, cuando FimB o FimE orientan a *fimS* en su estado inactivo, no hay producción de la fimbria.

Además de la acción de las recombinasas, existen otros elementos que pueden regular la expresión de la fimbria Tipo I al interferir en la orientación de *fimS*. Tal es el caso de Lrp (del inglés: *leucine-responsive regulatory protein*) e IHF (del inglés: *integration host factor*) que mantienen la orientación activa permitiendo la producción de la fimbria y H-NS (del inglés: *histone-like nucleoid-structuring*) que mantiene la orientación inactiva evitando la transcripción del operón fimbrial (Cleg *et al.*, 2011).

1.3.1.3.2. Metilación de DNA

La fimbria Pap de *E. coli* es uno de los mejores ejemplos para ilustrar este mecanismo de regulación (Figura 7). El operón *pap* está constituido por los genes *papA* (subunidad fimbrial principal), *papE* (subunidades adaptadoras), *papF* (subunidad adaptadora), *papG* (adhesina) y *papK* (subunidad adaptadora). La expresión de la subunidad principal está controlada por el estado de metilación de dos sitios GATC localizados río arriba del promotor *papBA*. Además, la expresión de este operón fimbrial va a depender de la actividad y concentración de la proteína Lrp y del regulador específico de esta fimbria, PapI. A altas concentraciones de Lrp y baja concentración de PapI, Lrp se une de manera eficiente a la región GATC más cercana del promotor *pap*, evitando la transcripción del operón fimbrial (Peterson *et al.*, 2008). La unión de Lrp al sitio GATC se da únicamente cuando éste no se encuentra metilado; a su vez, Lrp tiene que competir contra la metilasa Dam por unirse a este sitio (Cleg *et al.*, 2011).

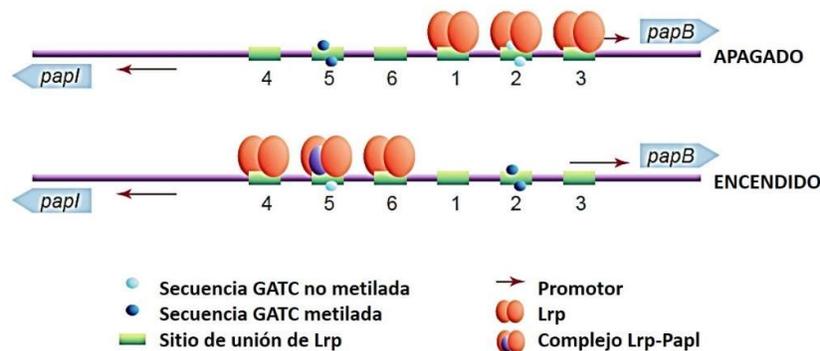


Figura 7. Regulación de la fimbria Pap de *E. coli*. Lrp tiene 6 sitios posibles de unión (ilustrados en verde), cuando se une en los sitios 1-3 la transcripción del operón fimbrial se encuentra apagada, mientras que al unirse a los sitios 4-6 favorece la activación de la transcripción. El sitio de unión de Lrp 3 sobrelapa con el promotor *pap*, por eso impide el inicio

de la transcripción. Los sitios de unión 2 y 5 sobrelapan con secuencias GATC, al unirse Lrp evita la metilación de estos sitios. La unión de Lrp a los sitios 1-3 o a los sitios 4-6 es mutuamente excluyente. (Modificado de Løbner *et al.*, 2005).

1.3.1.3.3. Concentración de di-GMP-c

La fimbria Tipo 3 de *K. pneumoniae* se encuentra codificada dentro del operón *mrkABCDF* y su expresión está regulada por la concentración del segundo mensajero di-GMP-c (Figura 8). Cuando la concentración intracelular de di-GMP-c es alta, se activa la transcripción de *mrkA*, que es el gen que codifica para la subunidad principal de la fimbria tipo 3. La concentración de di-GMP-c es modulada por la acción de dos tipos de enzimas; diguanilato ciclasas (DGCs) que se encargan de su síntesis y fosfodiesterasas (PDEs) que se encargan de su degradación (Hengee, 2009). En *K. pneumoniae*, contiguo al operón fimbrial, se encuentran tres genes formando un segundo operón; éstos codifican para MrkH que puede unirse a di-GMP-c para activar la expresión del operón fimbrial, MrkI que es un regulador de su propio operón, activando de manera indirecta la expresión del operón fimbrial y MrkJ que es una PDE que reprime la expresión de la fimbria tipo 3 (Tan *et al.*, 2015; Wilksch *et al.*, 2011).

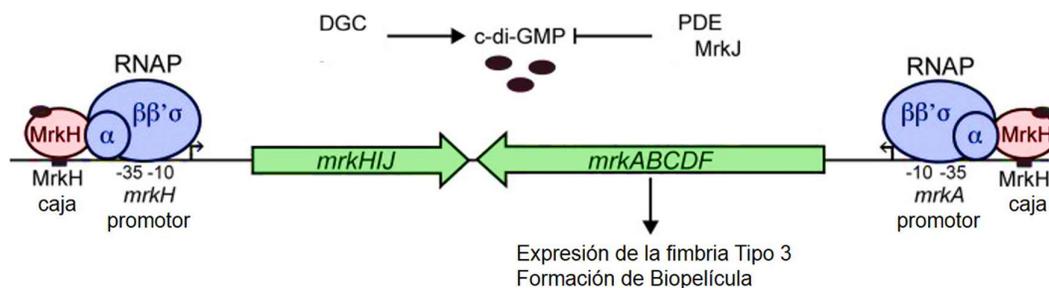


Figura 8. Modelo de la regulación de la fimbria Tipo 3 en *K. pneumoniae*. Una vez que el di-GMP-c se une a MrkH, esta proteína puede reconocer y unirse de manera específica a secuencias denominadas cajas MrkH facilitando el reclutamiento de la RNAP para iniciar la transcripción de los operones *mrkHI* y *mrkABCDF* (Modificada de Tan *et al.*, 2015).

1.3.1.3.4. Reguladores de unión a DNA

En la tabla 2 se enlistan algunos de los reguladores de la expresión de operones fimbriales CU que actúan de manera directa en el DNA. Una de estas proteínas es H-NS, la cual se asocia al nucleoide bacteriano condensando al DNA y funcionando como un regulador de la expresión genética (Figura 9). H-

NS está formada por un dominio amino terminal encargado de la oligomerización y un dominio carboxilo terminal que le permite unirse a DNA, ambos dominios están conectados por un péptido flexible (Dorman *et al.*, 1999). H-NS se une al DNA de manera inespecífica, pero con preferencia a las regiones ricas en adeninas (A) y timinas (T) y es capaz de oligomerizar en estas regiones formando filamentos de nucleoproteína (Dame *et al.*, 2000).

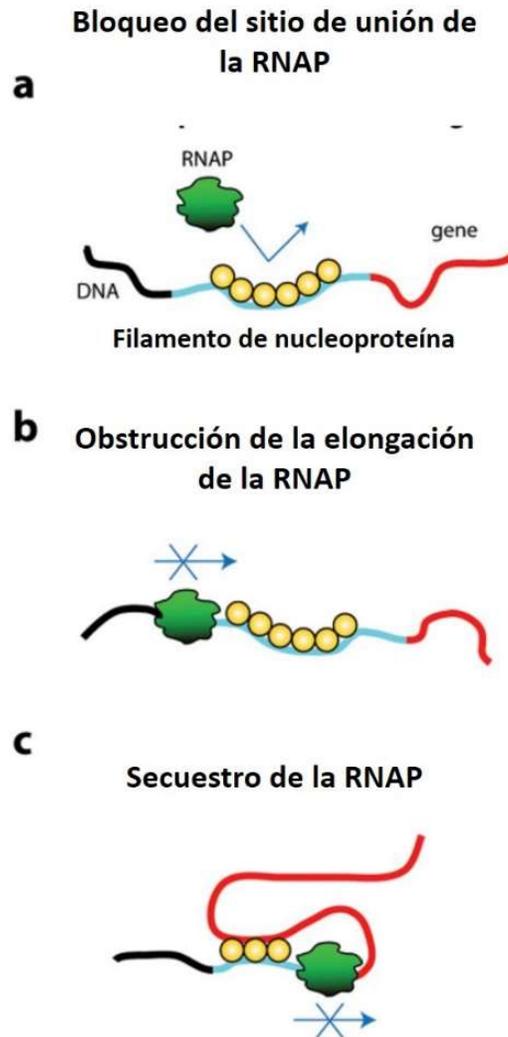


Figura 9. Mecanismos de represión por H-NS. Una vez que se ha formado el filamento de nucleoproteína, H-NS puede reprimir la transcripción al polimerizar en el sitio de unión de la RNA polimerasa al promotor, actuando como una barrera física (a); el filamento puede obstruir el proceso de elongación una vez iniciada la transcripción (b); H-NS puede mediar interacción entre dos hebras de DNA distales permitiendo la formación de bucles que pueden encerrar a la RNAP y evitando que ocurra la transcripción (c) (Modificado de Lim *et al.*, 2012).

Se ha descrito el papel de H-NS como regulador negativo de 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*”) y KFC (por sus siglas en inglés: “*K99-like Factor Involved in Citrobacter Colonization*”) en *C. rodentium* (Martínez-Santos *et al.*, 2012; Torres *et al.*, 2007; Caballero-Flores, *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2008).

1.3.2 El Sistema de Secreción Tipo 6 (SST6) como factor de virulencia.

Otro factor de virulencia importante durante la patogénesis son los sistemas de secreción, los cuales le permiten a las bacterias transportar proteínas fuera del compartimento celular. Estas proteínas secretadas tienen un papel importante durante las interacciones bacterianas, ya sea con sus células hospederas, con otras bacterias o bien, con el medio abiótico en el que se encuentran (Cianfanelli *et al.*, 2016).

A la fecha se han descrito nueve tipos de sistemas de secreción, nombrados sistema de secreción tipo I a sistema de secreción tipo IX (SST1-SST9) (Abby *et al.*, 2016). Estos sistemas de secreción liberan proteínas o efectores a través de la secreción o inyección regulando la interacción entre las bacterias que los expresan y sus respectivos hospederos.

El SST6 se encuentra codificado en operones que contienen al menos 13 genes que codifican para proteínas necesarias para formar la estructura del sistema de secreción, a estos componentes se les llama proteínas “core” (Tss del inglés: *Type six secretion*). Sin embargo, el SST6 también puede contener proteínas menos conservadas que reciben el nombre de proteínas accesorias (Tag: del inglés: *Type six secretion associated genes*) y sustratos específicos del sistema (efectores) (Tabla 3) (Boyer *et al.*, 2009).

Tabla 3. Componentes estructurales del SST6.

Tss/Tag	Localización/Función
TssA	Base
TssB	Cubierta contráctil
TssC	Cubierta contráctil

TssD	Tubo expulsado
TssE	Base
TssF	Base
TssG	Base
TssH	Reciclaje de la cubierta contráctil
Tssl	Tubo expulsado
TssJ	Complejo de membrana
TssK	Base
TssL	Complejo de membrana
TssM	Complejo de membrana
TagD	Punta del tubo expulsado
TagF	Regulación post-traducciona
TagJ	Reciclaje de la cubierta contráctil
TagL	Anclaje a la pared celular

La biogénesis del SST6 requiere del ensamblaje de tres complejos proteínicos que le permitan secretar las proteínas efectoras (Figura 10). El complejo intermembranal (CM) está compuesto de tres subunidades: TssJ, TssL y TssM, el cual funge como sitio de acoplamiento de una plataforma denominada complejo basal (CB) que contiene a las proteínas TssE, TssF, TssG y TssK (Ma *et al.*, 2012). El CB se encuentra localizado en el citoplasma, pero se asocia a la membrana interna. TssA conecta el complejo TssEFGK a la jeringa molecular compuesta de un tubo interno formado de hexámeros de una proteína llamada Hcp (por sus siglas en inglés: *hemolysin-coregulated protein*), que se encuentra rodeado de una cubierta contráctil formada por numerosas subunidades de TssB y TssC. Adicionalmente, en la punta del tubo interno se encuentra un trímero de VgrG (por sus siglas en inglés: *valine-glycine repeat G*), que funciona como la aguja que penetra la membrana de la célula blanco del SST6. Esta aguja formada por VgrG interactúa con otra proteína denominada PAAR (por sus siglas en inglés: *proline-alanine-alanine-arginine domain*) que da forma de punta a la aguja compuesta por VgrG (Shneider *et al.*, 2013).

Durante el ensamblaje del SST6, las proteínas efectoras se cargan dentro del tubo de Hcp o se asocian con la aguja, ya sea en el trímero de VgrG o con las proteínas PAAR. La cubierta contráctil se encarga de impulsar al tubo interno para lanzarlo fuera del compartimento celular bacteriano y secretar las proteínas efectoras del SST6 (Zoued *et al.*, 2016). Una vez que el tubo interno

y las proteínas efectoras son secretadas al exterior, la cubierta contráctil se desensambla y sus elementos son reciclados por una ATPasa denominada ClpV.

El SST6 puede secretar efectores al medio extracelular o a células blanco que pueden ser eucariotas u otras células bacterianas. Existe una gran diversidad funcional de efectores secretados vía este sistema, incluyendo nucleasas, fosfolipasas, hidrolasas, glicohidrolasas y enzimas que inducen reacomodos en el citoesqueleto (Russel *et al.*, 2011; 2013).

La funcionalidad del SST6 es muy diversa, se ha descrito como un sistema que confiere ventajas en la competencia bacteriana, promueve la invasión celular, favorece el escape fagosomal y la supervivencia intracelular además de participar en la adquisición de metales (Anderson *et al.*, 2017; Wan *et al.*, 2017; Brodmann *et al.*, 2017; Lin *et al.*, 2017).

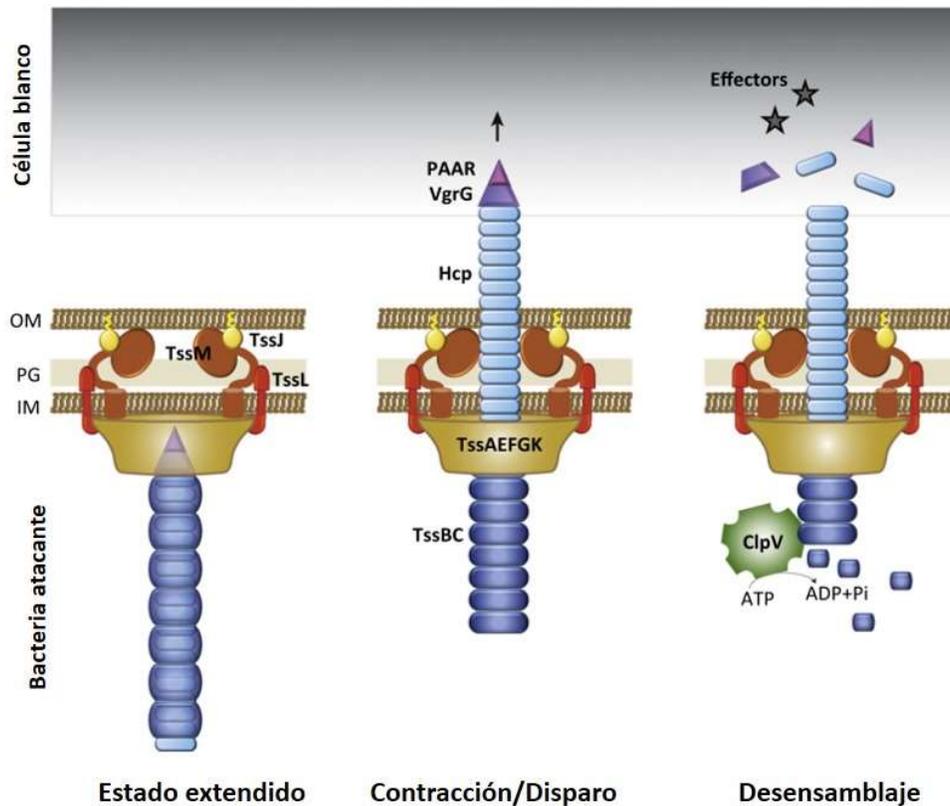


Figura 10. Biogénesis y mecanismo de acción del SST6. A) En su estado extendido, el SST6 requiere del ensamblaje del complejo de membrana compuesto por TssJ, TssL y TssM, representados en color amarillo, rojo y marrón, respectivamente. El complejo basal formado por las proteínas TssAEFGK, representado en color café se posiciona en la cara citoplásmica de la membrana interna. Sobre VgrG, dentro del complejo basal, empieza la elongación del tubo

interno formado por Hcp y rodeado por una cubierta contráctil compuesta por TssB y TssC. B) En el estado de contracción o disparo, la cubierta contráctil impulsa al tubo interno hacia la célula blanco. PAAR y VgrG, representados en rosa y morado, respectivamente, forman la punta responsable de perforar la membrana para liberar a las proteínas efectoras. C) Una vez que los efectores, ilustrados con estrellas color gris, se liberan a la célula blanco, la cubierta contráctil de desensambla por la acción de ClpV, ilustrada con hexámeros verdes (Modificado de Cianfanelli *et al.*, 2016).

2. ANTECEDENTES

2.1. Expresión y regulación de operones fimbriales de la familia CU de *C. rodentium*.

Al secuenciar el genoma de *C. rodentium* se identificaron 19 operones fimbriales, de los cuales 14 pertenecen a la familia CU (Tabla 4).

Tabla 4. 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 γ^4
3	ROD_10951-11021	<i>csgGFDBAC</i>	Fimbria Curli
4	ROD_11771-11791	<i>pmfABC</i> ^a	Chaperona/Usher β
5	ROD_18141-18181	<i>lpfEDCBA</i>	Chaperona/Usher γ^1
6	ROD_19341-19381	<i>crf2</i>	Chaperona/Usher σ
7	ROD_22311-22341		Chaperona/Usher γ^4
8	ROD_27771-27801	<i>tsfABCD</i> ^a	Chaperona/Usher γ^4
9	ROD_29101-29191	<i>fimBEAICDFGHK</i>	Chaperona/Usher γ^1
10	ROD_29201-29241	<i>ecpABCDE</i>	Chaperona/Usher alterna α
11	ROD_29351-29391		Chaperona/Usher γ^4
12	ROD_34961-35021	<i>crf4</i>	Chaperona/Usher π
13	ROD_41241-41291	<i>kfcHGFEDC</i>	Chaperona/Usher κ
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 γ^4

18	ROD_p1161-1201	<i>crf5</i>	Chaperona/Usher κ
19	ROD_p1291-1301		Chaperona/Usher γ^1

^a operones estudiados en este trabajo.

Modificado de Petty *et al.*, 2010.

A la fecha, sólo se han estudiado algunos de ellos y sólo dos se ha demostrado que juegan un papel importante durante la patogénesis de *C. rodentium*. Estas fimbrias se denominan KFC y GCF.

2.1.1. KFC

KFC está codificada dentro del operón *kfcCDEFGH* y fue descrita por Hart *et al.* (2008). Comparte del 24 al 48% de identidad con el operón fimbrial K99 de ETEC, que codifica para la fimbria K99 que está involucrada en la adhesión de ETEC al intestino delgado de sus hospederos (Jones y Isaacson, 1983). Para determinar si KFC tiene un papel importante durante la colonización de *C. rodentium* a ratón, se construyó una cepa mutante en el gen *kfcC*, que codifica para la subunidad fimbrial principal y se examinó su capacidad de colonizar 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 (Figura 11).

La expresión de este operón fimbrial se encuentra regulada de manera positiva por RegA (por sus siglas en inglés: *Regulation factor A*), una proteína similar a AraC, en presencia de bicarbonato. De manera interesante, este regulador no está conservado en EPEC y EHEC, mientras que en *C. rodentium* también coordina la expresión de los genes del LEE a través de la activación del operón *grlRA* (Yang *et al.*, 2010).

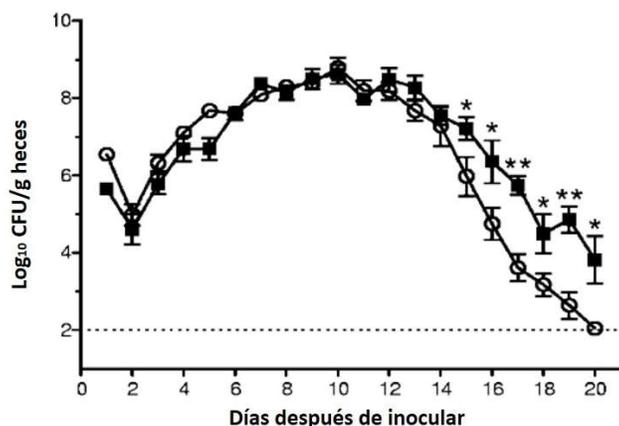


Figura 11. KFC es importante para la colonización de *C. rodentium* durante los días 15-20 pi. Los ratones se inocularon vía oral con 2×10^9 CFU. La cinética de colonización de la cepa silvestre se ilustra con cuadrados negros (■) y la cinética de la cepa mutante en *kfcC* con círculos blancos (○) (Modificada de Hart *et al.*, 2008).

2.1.2. GCF

GCF fue descrita en nuestro grupo por Caballero *et al*, 2014. Esta fimbria se encuentra codificada dentro de un operón que consta de siete genes: *gcfABDCEF*. *gcfA* es el primer gen del operón y codifica para la subunidad principal, en seguida se encuentran los genes *gcfB*, *gcfC* y *gcfD* que codifican para la chaperona, el *usher* y la adhesina fimbrial, respectivamente. Se construyó una cepa mutante en *gcfA* y se evaluó su papel durante la colonización a ratón durante los primeros 10 días de infección inoculando $\sim 5 \times 10^7$ CFU. En los primeros 3 días pi no se observó ninguna diferencia significativa en las cuentas bacterianas obtenidas entre los ratones inoculados con la cepa silvestre y la mutante en *gcfA*; sin embargo, al día 7 pi se encontró una disminución en las cuentas bacterianas obtenidas de los ratones inoculados con la cepa mutante de aproximadamente tres órdenes de magnitud comparado con las observadas en los ratones infectados con la cepa silvestre (Figura 12).

La expresión en condiciones de crecimiento en el laboratorio de este operón es reprimida por H-NS, la cual se une a la región reguladora de *gcf* sugiriendo que este represor global tiene una función directa en su represión. El operón se expresa por un promotor putativo sigma 70 que es regulado diferencialmente

por las condiciones de crecimiento en ausencia de H-NS, sugiriendo la participación de reguladores adicionales que aún no han sido identificados.

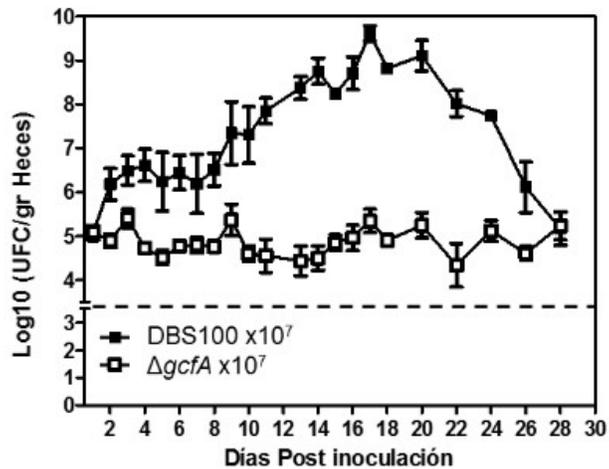


Figura 12. GCF es importante para *C. rodentium* durante los primeros días de colonización. Los ratones se inocularon vía oral con 5×10^7 CFU de la cepa silvestre de *C. rodentium* (■) o de la mutante en *gcfA* (□) (Modificado de Caballero *et al.*, 2014).

2.1.3. PMF (ROD_11771-11791)

En nuestro grupo es de interés analizar la expresión y función de los operones CU restantes de *C. rodentium* que no han sido estudiados.

El operón *pmf* (por sus siglas en inglés: “*pilin minus fimbriae*”), antes denominado *crf1* (Ortiz-Tesis de Licenciatura, 2018), es un operón fimbrial que potencialmente codifica para una chaperona (*pmfA*), un *usher* (*pmfB*), y para una proteína de función desconocida (*pmfC*), en vez de para una subunidad fimbrial, cuyo gen se encuentra sobrelapado con el gen del *usher* (Figura 13 A). La falta de una subunidad fimbrial determinó que fuera originalmente clasificado como un pseudo-operón (Petty *et al.*, 2010). De manera interesante, una fusión transcripcional de su promotor al gen reportero *cat* muestra actividad a 37°C en agitación en los medios LB, DMEM y MM-N. La expresión de esta fusión transcripcional se ve aumentada en cepas mutantes en los genes codificantes para los reguladores globales H-NS y StpA (Figura 13 B),

sugiriendo que estas proteínas actúan como represores de la expresión de este operón.

Nuestro interés en este operón reside en el hecho de que carece del gen para la subunidad fimbrial, lo cual plantea la posibilidad de que el operón participe en el ensamblaje de subunidades codificadas por otros operones o en alguna función aún no descrita en la que participe el producto del tercer gen.

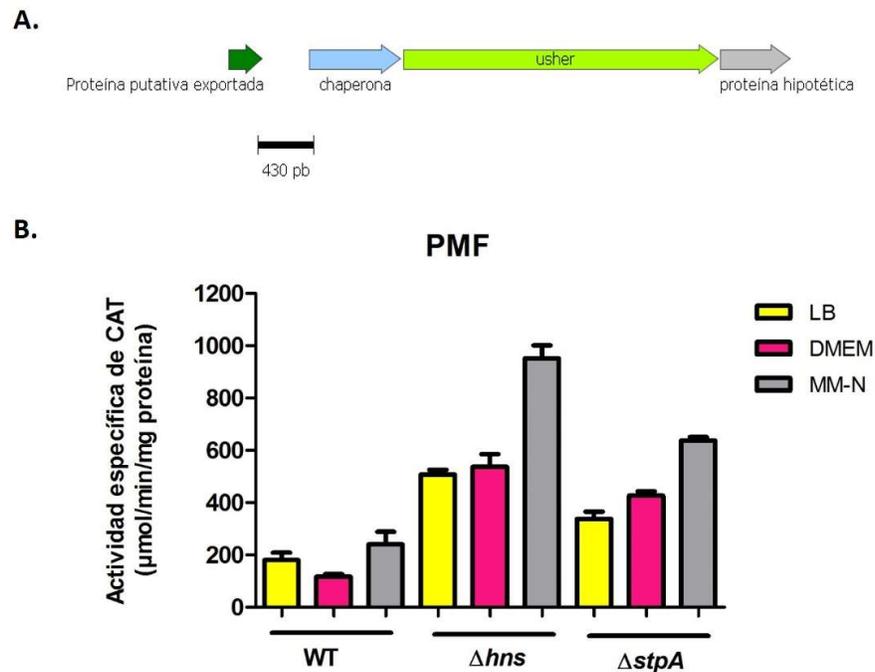


Figura 13. *pmf* es regulado negativamente por H-NS y StpA. A) Estructura del operón *pmf*. La región incluida en la fusión transcripcional al gen *cat* se ilustra en color negro. B) Actividad específica de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) obtenida a partir de extractos de *C. rodentium* DBS100 silvestre, Δhns o $\Delta stpA$ con el promotor del operón *pmf*. Los cultivos se hicieron en tubos con 5 mL de medio LB, DMEM o MM-N y se dejaron crecer en agitación a 37°C. Las gráficas muestran el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes (Modificado de Ortiz, Tesis de Licenciatura, 2018).

2.1.4. TSF (ROD_27771-27801)

El operón *tsf* (por sus siglas en inglés: “*type six secretion system associated fimbriae*”), antes nombrado *crf3* (Ortiz-Tesis de Licenciatura, 2018), es un operón que contiene todos los componentes necesarios para el ensamblaje de una fimbria de la familia CU: una subunidad fimbrial (*tsfA*), una chaperona

(*tsfB*), un *usher* (*tsfC*) y una adhesina (*tsfD*) (Figura 14 A). Sin embargo, éste se encuentra insertado en un clúster que codifica, a su vez, para los componentes de un SST6, el cual se ha visto que proporciona ventajas a *C. rodentium* en cuanto a competencia con otras bacterias (Gueguen y Cascales, 2013). Esto plantea preguntas interesantes sobre el papel que juega esta fimbria al ser, en principio, co-expresada con este sistema de secreción. En estudios preliminares pudimos observar actividad de una fusión transcripcional que contiene la región intergénica del operón *tsf* y del gen *tssH* perteneciente al SST6 en el fondo mutante en H-NS (Figura 14 B).

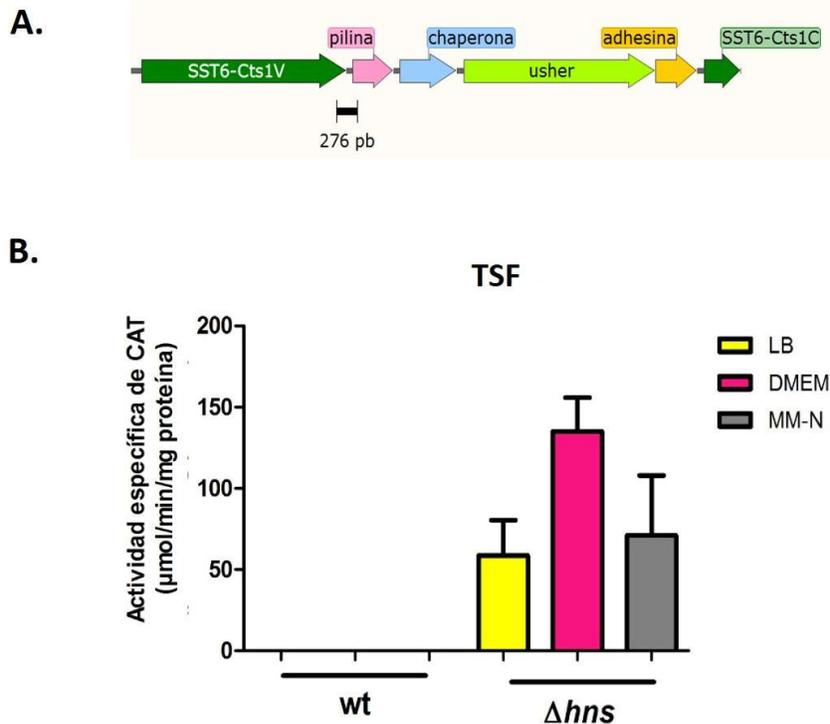


Figura 14. El operón *tsf* es regulado negativamente por H-NS. A) El operón *tsf* se encuentra embebido en un clúster con genes necesarios para el ensamblaje de un SST6. La región incluida en la fusión transcripcional al gen *cat* se ilustra en color negro. B) Actividad específica de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) obtenida a partir de extractos de *C. rodentium* DBS100 silvestre o Δhns portando la fusión CRF3-*cat*. Se hicieron cultivos de ambas cepas en tubos con 5 mL de medio LB, DMEM o MM-N y se crecieron durante 8 horas en condición estática a 37°C y con 5% de CO₂. Cada barra muestra el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes por duplicado (Modificado de Ortiz, Tesis de Licenciatura, 2018).

en gris un autotransportador, proteínas hipotéticas y otras de función desconocida. Río debajo de *cts1R-tsf* se encuentran reguladores de la familia LysR y MarR (naranja) y proteínas hipotéticas (gris).

En 2013 Gueguen y Cascales intentaron evaluar la expresión del CTS1 de *C. rodentium*; sin embargo, no lograron ver expresión del sistema bajo las condiciones de crecimiento usadas, por lo que construyeron un plásmido que les permitió reemplazar la región reguladora putativa de ambos operones del CTS1 por promotores inducibles, dejando un operón bajo la acción del promotor *pBAD* inducible por arabinosa, y el otro de *P_{tac}* inducible con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). En estas condiciones, demostraron que ambos operones son necesarios para el ensamblaje del SST6 y que éste es funcional al proveer ventajas de crecimiento a *C. rodentium* cuando se encuentra en co-cultivos con otras bacterias.

2.2. Proteínas homólogas de H-NS en *C. rodentium*

Debido al papel que juega H-NS en la regulación de la expresión de factores de virulencia, como lo son los operones fimbriales, en el laboratorio es de interés analizar la función de esta proteína y de sus parálogos en *C. rodentium*. Caballero *et al.*, (2015) encontró que *C. rodentium* codifica para 5 proteínas homólogas a H-NS de *E. coli* y que éstas se expresan, sugiriendo que podrían ser proteínas funcionales (Tabla 5).

Tabla 5. Proteínas homólogas a H-NS en *C. rodentium*.

Nombre asignado	Tamaño (aa)	Identidad/ Similitud	Nombre (No. acceso)	Especie (%identidad)
H-NS1 (ROD_17711)	137	96/98	H-NS (AGE94391)	<i>C. amalonaticus</i> Y19 (99)
CicR (ROD_20571)	134	64/73	H-NS (WP_023201854)	<i>S. sv</i> Sloterdijk (98)
StpA (ROD_31391)	133	59/69	StpA (NP_417155)	<i>E. coli</i> K-12 (84)
pehH (ROD_p2271)	154	47/62	H-NS (WP_001483165)	<i>E. coli</i> P0299917 (99)
Ler (ROD_30151)	129	36/60	Ler (YP_002331430)	<i>E. coli</i> O127:H6 (90)

Modificada de Caballero *et al.*, 2015.

Aunque aún no se ha descrito interacción entre estas proteínas en *C. rodentium*, se sabe que en *E. coli* H-NS y StpA (por sus siglas en inglés: *suppressor of td mutant phenotype A*) forman heterómeros y que StpA es capaz de sustituir funcionalmente a H-NS, además de cumplir con funciones propias. StpA, al igual que H-NS, es una proteína asociada al nucleóide bacteriano que se une a regiones ricas en A-T (Luijsterburg *et al.*, 2006). StpA en ausencia de H-NS es susceptible a la acción de la proteasa Lon, mientras que en presencia de H-NS es más estable, sugiriendo que StpA se encuentra preferencialmente formando heterómeros con H-NS (Johansson *et al.*, 2001).

3. JUSTIFICACIÓN

Las bacterias patógenas cuentan con un conjunto de factores de virulencia que les permiten colonizar, invadir y persistir dentro de sus hospederos. Uno de estos factores, son las fimbrias. De manera muy interesante, dentro de las enterobacterias, las fimbrias de la familia CU son muy abundantes y participan en diversas etapas durante la patogénesis: median la adhesión a sus hospederos, facilitan la evasión de las defensas del hospedero y promueven la formación de biopelículas (Waksman y Hultgren, 2009). Muchos de los operones fimbriales CU tienen un contexto genómico variable e interesante, ya que contienen genes accesorios que están también involucrados en virulencia, así como otros que codifican para proteínas hipotéticas de función desconocida o para reguladores transcripcionales que controlan su expresión. Aunque esta familia de fimbrias es la más estudiada, muy poco se sabe sobre la co-expresión y funcionalidad conjunta de estas estructuras dentro de una bacteria, es decir, si el gran repertorio fimbrial provee a las bacterias que las expresan diversidad funcional o si su función es redundante.

Estudiar cada uno de los operones fimbriales CU de *C. rodentium* nos permitirá evaluar esta diversidad o redundancia funcional de una manera más asertiva, debido a que *C. rodentium* es un patógeno específico de ratón, nos permite hacer estudios *in vivo* y así entender mejor lo que ocurre de manera natural durante el proceso de patogénesis y de esta manera poder extrapolar a lo que podría estar ocurriendo con otros patógenos para los que no se cuenta con un

modelo animal, como es el caso de los patógenos A/E de humanos EPEC y EHEC.

En este trabajo abordamos el estudio de los operones *pmf* y *tsf*, cuyo contexto genético presenta características distintivas interesantes. Su estudio nos permitirá explorar los mecanismos que regulan la expresión de estos operones, así como la posible función de un operón transcripcionalmente activo, *pmf*, que carece de un gen que codifica para una subunidad fimbrial pero posee el de una función desconocida, y el de otro embebido dentro de un operón que a su vez codifica para otra estructura macromolecular, el SST6. A futuro esperamos entender las posibles ventajas que le confiere a la bacteria cada uno de estos operones.

4. HIPÓTESIS

Los operones fimbriales *pmf* y *tsf* de la familia CU de *C. rodentium* son transcripcionalmente activos bajo condiciones de crecimiento *in vitro* y poseen genes accesorios que se co-expresan dando lugar a proteínas funcionales.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general.

Analizar la expresión y regulación de los operones *pmf* y *tsf*.

5.2. Objetivos particulares.

1. Identificar la región mínima reguladora de los operones *pmf* y *tsf*.
2. Evaluar el efecto de los reguladores H-NS, StpA, CicR, PehH y Ler en la transcripción de los operones *pmf* y *tsf*.
3. Analizar la organización transcripcional de ambos operones mediante RT-PCR.
4. Determinar si los transcritos de los genes de estos operones se traducen en proteínas.

6. METODOLOGÍA

6.1 Cepas utilizadas y condiciones de crecimiento.

Todas las cepas y plásmidos ocupados se enlistan en la Tabla 6. 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 5 mL de medio LB, DMEM (“Dulbecco's Modified Eagle’s Medium”, Gibco pH 7.4) o Medio Mínimo para realizar los experimentos correspondientes.

Tabla 6. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

CEPA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
<i>C. rodentium</i>		
DBS100	<i>C. rodentium</i> silvestre	Schauer y Falkow, 1993
DBS100 pmfA-FLAG	DBS100 <i>ROD_11771::3xFLAG-Km</i>	Ortiz, Tesis de Licenciatura, 2018
DBS100 pmfC-FLAG	DBS100 <i>ROD_11791::3xFLAG-Km</i>	Ortiz, Tesis de Licenciatura, 2018
DBS100 ecpA-FLAG	DBS100 <i>ecpA::3XFLAG-Km</i>	Martínez-Santos, Tesis de Doctorado, 2012
JPCR13	DBS100 $\Delta hns::FRT$	Caballero <i>et al</i> , 2015
JPCR13 pmfA-FLAG	DBS100 $\Delta hns::FRT ROD_11771::3xFLAG-Km$	Este estudio
JPCR13 pmfC-FLAG	DBS100 $\Delta hns::FRT ROD_11791::3xFLAG-Km$	Este estudio
JPCR4	DBS100 $\Delta stpA::Km$	Caballero <i>et al</i> , 2015
JPCR4 pmfA-FLAG	DBS100 $\Delta stpA::FRT ROD_11771::3xFLAG-Km$	Este estudio
JPCR4 pmfC-FLAG	DBS100 $\Delta stpA::FRT ROD_11791::3xFLAG-Km$	Este estudio
JPCR2	DBS100 $\Delta pehH::Km$	Caballero <i>et al</i> , 2015
$\Delta cicR$	DBS100 $\Delta cicR::Km$	Isidro-Coxca (Datos no publicados)
JPCR5	DBS100 $\Delta ler::Km$	Caballero <i>et al</i> ,

		2015
<i>E. coli</i>		
DH10β	F- <i>endA1 deoR⁺ recA1 galE15 galK16 nupG rpsL</i> $\Delta(lac)X74 \phi 80lacZ\Delta M15 araD139 \Delta(ara,leu)76$ <i>97 mcrA \Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC) Str^R λ⁻</i>	Grant <i>et al.</i> , 1990
E2348/69	EPEC silvestre O127:H6 Sm ^r	Levine <i>et al.</i> , 1978
E2348/69 EcpB-FLAG	EPEC <i>ecpB::3XFLAG-Km</i>	Martínez-Santos, Tesis de Doctorado, 2012
PLÁSMIDOS	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pKK232-8	Contiene el gen reportero <i>cat</i> sin promotor	Pharmacia Biotec
pMPPM-K3	Vector de clonación derivado del pACYC177 (p15A <i>ori</i>) con un casete de resistencia a Kanamicina y el sitio múltiple de clonación del pBSKS.	Mayer <i>et al.</i> , 1995
pMPPM-T3	Vector de clonación derivado del pACYC177 (p15A <i>ori</i>) con un casete de resistencia a Tetraciclina y el sitio múltiple de clonación del pBSKS.	Mayer <i>et al.</i> , 1995
pKD46	Codifica para las proteínas del sistema recombinasa λ red	Datsenko y Wanner, 2000
pKK-CRF1_A	Fusión <i>crf1-cat</i> de -393 a +37	Ortiz, Tesis de Licenciatura, 2018
pKK-CRF3	Fusión <i>crf3-cat</i> de -221 a +55	Ortiz, Tesis de Licenciatura, 2018
pKK-CRF3_1	Fusión <i>crf3-cat</i> de -437 a +189	Este estudio
pKK-CRF3_1A141 G-cat	Fusión <i>crf3-cat</i> de -437 a +189 con cambio de A por G en la posición -141	Este estudio
pKK-TssF-H	Fusión <i>tssF-H-cat</i> de -781 a +120	Este estudio
pKK-TssFint	Fusión <i>tssFint-cat</i> de -2048 a -1439	Este estudio
pKK-TssF-H_1-cat	Fusión <i>tssF-H_1-cat</i> de -781 a +7	Este estudio
pKK-TssF-H_3-cat	Fusión <i>tssF-H_3-cat</i> de -324 a +120	Este estudio
pKK-TssF-H_4-cat	Fusión <i>tssF-H_4-cat</i> de -290 a +120	Este estudio
pKK-TssF-H_9-cat	Fusión <i>tssF-H_9-cat</i> de -290 a +173	Este estudio
pKK-TssF-H_10-cat	Fusión <i>tssF-H_10-cat</i> de -324 a +173	Este estudio
pKK-TssF-H_13-cat	Fusión <i>tssF-H_13-cat</i> de -548 a -173	Este estudio
pKK-TssH-F-cat	Fusión <i>tssH-F-cat</i> de -410 a +491	Este estudio
pK3-pmfA	pMPPM-K3 que codifica para el gen <i>pmfA</i>	Este estudio

	etiquetado con FLAG.	
pK3-<i>pmfC</i>	pMPM-K3 que codifica para el gen <i>pmfC</i> etiquetado con FLAG.	Este estudio
p-T3-<i>pmfA</i>	pMPM-T3 que codifica para el gen <i>pmfA</i> etiquetado con FLAG.	Este estudio
pT3-<i>pmfC</i>	pMPM-T3 que codifica para el gen <i>pmfC</i> etiquetado con FLAG.	Este estudio

6.2. Diseño de oligonucleótidos y reacciones en cadena de la polimerasa.

Todos los oligonucleótidos utilizados se enlistan en la Tabla 7. Éstos se diseñaron utilizando el software “IDT-DNA oligo analyzer” (www.idtdna.org) y aquellos utilizados para la generación de fusiones transcripcionales, incluyeron sitios de restricción correspondientes a las enzimas BamHI y HindIII. Los oligonucleótidos se sintetizaron en la Unidad de Síntesis de DNA del Instituto de Biotecnología-UNAM. Las reacciones de PCR se prepararon utilizando buffer 1X (200 mM Tris HCl pH 8.4, 500 mM KCl), 5 µM de MgCl₂, 200 µM de dNTP's, 1 µL de Taq polimerasa (Fermentas), 40 pM de cada oligonucleótido, 100 ng de DNA templado y agua libre de nucleasas para aforar las reacciones a 100µL. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador “PCR system 9700” (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 5 min a 95°C; 30 ciclos de 95°C-30 s, 56°-64°C-30 s y 72°C-30-150 s dependiendo del tamaño de la región a amplificar; y una extensión final de 10 min a 72°C.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

OLIGO	SECUENCIA	USO
Fusiones transcripcionales		
27801 CAT FW	AGAAA <u>GGATCC</u> TACCAAAGATAGGCAGT GCAC	<i>Fusión crf3-cat</i>
27801 CAT RV	AGTCTA <u>AAGCTT</u> ACGTTGATACGCTCGCC ATC	<i>Fusión crf3-cat</i>
CRF3 CAT FW	TTT <u>GGATC</u> TAGGTCGCGTCACCGTTATA	<i>Fusión crf3_1-cat</i>
CRF3 CAT RV	CGTC <u>AAGCTT</u> TGACTTAGCCAGAGTCTGA A	<i>Fusión crf3_1-cat</i>
tssF-H CAT FW	GGT <u>GGATC</u> TTAAGGCGATGGAGTTCCAG	<i>Fusiones tssF-H-cat, tssF-H_1-cat y TssF-H_2-cat</i>

tssF-H CAT RV	AACC <u>AAGCTT</u> TTCAACGTAAGGATTACCG C	Fusiones <i>tssF-H-cat</i> , <i>tssF-H_3-cat</i> , <i>tssF-H_4-cat</i> y <i>tssF-H_5-cat</i>
tssH-F-cat-FW	AACC <u>GGATCC</u> TTCAACGTAAGGATTACCG C	Fusión <i>tssH-F-cat</i>
tssH-F-cat-RV	GGT <u>AAGCTT</u> TTAAGGCGATGGAGTTCCA G	Fusión <i>tssH-F-cat</i>
tssG-int CAT FW	TACC <u>GGATC</u> CACCAGGCCAAAAAGATAC G	Fusión <i>tssF-int-cat</i>
tssG-int CAT RV	ACAC <u>AAGCTT</u> AGCGACACCGGTAATTTTG G	Fusión <i>tssF-int-cat</i>
tssF-H_1-RV	CAC <u>AAGCTT</u> GACTCATCCCTTTTAAATTC G	Fusiones <i>tssF-H_1-cat</i> , <i>tssF-H_6-cat</i> , <i>tssF-H_7-cat</i> y <i>tssF-H_8-cat</i>
tsF-H_2-RV	GAA <u>AAGCTT</u> ACTCAGAGGGGATTCCTAAT	Fusiones <i>tssF-H_2-cat</i> , <i>tssF-H_9-cat</i> y <i>tssF-H_10-cat</i>
tssF-H_3-FW	ATT <u>GGATC</u> CCCGTCAATTTTCGCGACTTG	Fusiones <i>tssF-H_4-cat</i> , <i>tssF-H_7-cat</i> y <i>tssF-H_9-cat</i>
tssF-H_4-FW	TTT <u>GGATC</u> CTCTCCGGTGAAATTAGGAAT CC	Fusiones <i>tssF-H_5-cat</i> y <i>tssF-H_8-cat</i>
tssF-H_5-FW	TA <u>GGATC</u> CGCAGTTTCTATCCCC	Fusiones <i>tssF-H_3-cat</i> , <i>tssF-H_6-cat</i> y <i>tssF-H_10-cat</i>
tssF-H_6_FW	TC <u>GGATC</u> CGGCGCATTGTAATTCGGGTA	Fusiones <i>tssF-H_12-cat</i> y <i>tssF-H_13-cat</i>
pKK-SEQ2-F	GAGGCCCTTTCGTCTTCAAG	Verificación por PCR y secuenciación de fusiones <i>cat</i>
pKK-SEQ1-R	CAACGGTGGTATATCCAGTG	Verificación por PCR y secuenciación de fusiones <i>cat</i>
pKK-BHIF	GGAATTCTCGGGGAT	Verificación por

		PCR de fusiones a <i>cat</i>
pKK-HD3R	GTTTTGTCCCTACTCAAGC	Verificación por PCR de fusiones a <i>cat</i>
RT-PCR		
ROD_11761-11771_FW	CTCTATGGATCCTCCTAACACCCTGCACG GTAC	RT-PCT operón <i>pmf</i>
ROD_11761-11771_RV	GCGTGACAATAATGGACGAA	RT-PCT operón <i>pmf</i>
ROD_11771-11781_FW	TAATATCCGTCAGGATTTACC	RT-PCT operón <i>pmf</i>
ROD_11771-11781_RV	CGGATAAATACTGGTATCAAAG	RT-PCT operón <i>pmf</i>
ROD_11781-int_FW	CCGTTTGATCTACAACACCCT	RT-PCT operón <i>pmf</i>
ROD_11781-int_RV	GTGCTTTGCAGTTCCGTTTT	RT-PCT operón <i>pmf</i>
ROD_11781-11791_FW	AACTACATCGTGACCAGCG	RT-PCT operón <i>pmf</i>
ROD_11781-11791_RV	TGCATCAGCACCGCCATTT	RT-PCT operón <i>pmf</i>
ROD_11791-11801_FW	CACCCGTTTATTTGCGCAACA	RT-PCT operón <i>pmf</i>
ROD_11791-11801_RV	TGCTGCCTATCACCTTAAACA	RT-PCT operón <i>pmf</i>
RT_TssF-H-FW	GTATTAACGCGAAGTAGCCAG	RT-PCT operón <i>tsf</i>
RT_TssF-H-RV	GCACTCTCCACGCTTTTAAAC	RT-PCT operón <i>tsf</i>
RT_TssH-Pil_FW	GATATTGAGATGCAACTGGAG	RT-PCT operón <i>tsf</i>
RT_TssF-Pil_RV	GTAAACGTTACGGTACCCTG	RT-PCT operón <i>tsf</i>
RT_Pil-Ch-FW	CTC TGT AGG TAA GGT TTA CGC	RT-PCT operón <i>tsf</i>
RT_Pil-Ch-RV	AATATAGTCATCCCGGCAAGG	RT-PCT operón <i>tsf</i>
RT_Ch-Ut-FW	AATTAGTAGCGTTGAGGTCCG	RT-PCT operón <i>tsf</i>
RT_Ch-Ut-RV	TAA GAA TAT GGC GTA TCA CCG	RT-PCT operón <i>tsf</i>
RT_Ut-Ad_FW	CCTGTGCACGATTTATTCCAG	RT-PCT operón <i>tsf</i>
RT_U-Ad_RV	CAC AGG TTT CGT CGG TAT AGG	RT-PCT operón <i>tsf</i>

RT_Ad-TssB-FW	TAGCGAGCTATTATGCGAAGG	RT-PCT operón <i>tsf</i>
RT_Ad-TssB-RV	TCGTACTIONCAATTTGTACGCGC	RT-PCT operón <i>tsf</i>
ETIQUETAS FLAG		
11771-FW-FLAG	TAATATCCGTCAGGATTTACC	<i>ROD_11771::3x</i> FLAG-Km
11771-RV-FLAG	CGGATAAATACTGGTATCAAAG	<i>ROD_11771::3x</i> FLAG-Km
11791-FW-FLAG	CACCCGTTTATTTGCGCAACA	<i>ROD_11791::3x</i> FLAG-Km
11791-RV-FLAG	TGCTGCCTATCACCTTAAACA	<i>ROD_11791::3x</i> FLAG-Km
ROD_27771_H1-FLAG	GGTAAGGTTTACGCGCAGGCGGCTTATA CCATCGCGTATCCG GACTACAAAGACCATGACGG	
ROD_27771_H2-FLAG	AACAGGGGCGATTTCTCGCCCCGGATTTA ATCCTGACGGCAA CATATGAATATCCTCCTTAG	
ROD_27771_FW-FLAG	TGACAAACCAGTTCAAGGGGGA	
ROD_27781_RV-FLAG	TTCAGAACCGGGAAAAATGACCCG	
TssH_H1-FLAG	GAAATTGATATTGAGATGCAACTGGAGGG AAAACAAAACATT GACTACAAAGACCATGACGG	
TssH_H2-FLAG	GACCCTAAGATCGCTCCTGGGTTATTACA TATTTCTGTAGA CATATGAATATCCTCCTTAG	
TssH_FW-FLAG	GAGATGACGCTTAACTTCAGCG	
TssH-Pilina_RV-FLAG	AATCCGCGGCAATTTACAGGT	
K1-Rev	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	Casete de kanamicina
K2-Fw	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	Casete de kanamicina
CLONACIÓN DE LOS GENES ETIQUETADOS		
11771-HindIII-FW	GCTAAAGCTTTGCTGGTTGCTGATTT	Clonar <i>pmfA</i> - FLAG en pMPM-K3 y T3
11791-HindIII-Fw	CCTCAAGCTTGGCTCTGTAAGATTGA	Clonar <i>pmfC</i> - FLAG en pMPM-K3 y T3

FLAG-Rv-BH1-Sac	TAAGAGCTCGGATCCGAAGCAGCTCCAG CCTAC	Clonar <i>pmfA</i> -FLAG y <i>pmfC</i> -FLAG en pMPM-K3 y T3
pMPM-T3/K3-Fw	TGTGGAATTGTGAGCGGATAAC	Secuenciación de genes clonados en estos vectores.
pMPM-T3/K3-Rv	AAGGCGATTAAGTTGGGTAACG	Secuenciación de genes clonados en estos vectores.

6.3 Construcción de fusiones transcripcionales al gen *cat*.

Independientemente de su uso, los productos de PCR se purificaron con el estuche "High pure PCR Product Purification Kit" (Roche). Los fragmentos destinados a la generación de fusiones se digirieron con las enzimas de restricción BamHI y HindIII (Thermo Scientific) utilizando el buffer Tango (Thermo Scientific) durante 5 horas a 37°C. Los productos digeridos se precipitaron con etanol absoluto, limpiaron con etanol al 70% y resuspendieron en 30 µl de agua estéril. Los fragmentos digeridos se visualizaron en geles de agarosa al 1% mediante tinción con bromuro de etidio. Estos fragmentos se ligaron al vector pKK232-8, el cual contiene el gen *cat* sin promotor, previamente digerido con las mismas enzimas. La reacción de ligación se llevó a cabo con 2µl de buffer y 2µl de ligasa (Thermo Scientific) y aproximadamente 500 ng de inserto y 100 ng de vector en un volumen final de 20 µl. La reacción se incubó toda la noche a 15°C, posteriormente se precipitó con etanol absoluto y glucógeno y se resuspendió en 10 µl de agua estéril. Se usaron 10 µl de cada reacción de ligasa para transformar, por electroporación, células competentes de la cepa *E. coli* DH10β, las cuales fueron preparadas a partir de cultivos de 100 mL crecidos a una D.O_{600nm} de 0.6 a 0.8. Después de centrifugarlos, las pastillas celulares se sometieron a 3 lavados con 15 mL de agua estéril y glicerol a 4°C y se resuspendieron al final en 1 mL de agua que se dividió en alícuotas de 50 µl. Una vez sometidas a electroporación, las células transformantes fueron seleccionadas en placas de LB agar con 100 µg/ml de ampicilina. La presencia de posibles clones positivas se evaluó

inicialmente por PCR utilizando los oligonucleótidos pKK-SEQ-1-R y pKK-SEQ-2-F (Tabla 7), que corresponden a secuencias que flanquean el sitio de clonación del vector pKK232-8, asegurándonos que las candidatas portaban plásmidos con los insertos de interés. Posteriormente se mandó a secuenciar en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN del Instituto de Biotecnología-UNAM.

6.4 Predicción de promotores.

Para identificar la presencia de posibles promotores dentro de la región intergénica entre los operones divergentes del SST6, así como de la región intergénica del gen *tssH* y la pilina del operón *tsf*, se utilizó el programa BPROM disponible en el servidor web Softberry (<http://www.softberry.com>). 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).

6.5 Ensayos de actividad transcripcional (Cloranfenicol acetil transferasa, CAT).

La cuantificación de la actividad específica del gen *cat* se realizó siguiendo el protocolo descrito por Puente *et al.*, (1996). A partir de preinóculos con las cepas conteniendo las fusiones de interés crecidas en medio LB durante toda la noche, se inocularon tubos con 5 mL de medio de cultivo LB, DMEM o MM-N con 100 μ L del pre-inóculo y se incubaron a 37°C en estático en presencia de 5% de CO₂ y se dejaron crecer durante 12 horas. Transcurrido este tiempo se colectaron 1.5 mL de cada cultivo en tubos Eppendorf y la pastilla celular se cosechó por centrifugación a 13500 rpm. Se retiró todo el sobrenadante y se lavó la pastilla con 800 μ L de buffer TDTT (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, DTT 3 μ M), se centrifugó nuevamente y se resuspendió en 300 μ L de este mismo buffer. Cada muestra se sonicó durante 3 minutos en el equipo "Soniprep 150" (Vibra Cell) con una amplitud de 35% durante 10 segundos con periodos de 5 segundos de descanso. Las muestras sonicadas se centrifugaron 35 minutos a 13000 rpm y el sobrenadante se transfirió a tubos Eppendorf limpios. Para cuantificar proteína se cargaron 10 μ L de cada extracto en placas de 96 pozos

más 200 μ L de “BCA Protein Assay Reagent” (Pierce). 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 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 nitrobenzoico (DTNB) 1 mM en 0.1 M Tris-HCl pH 7.8. Inmediatamente se cuantifica 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 Etiquetado de proteínas con el epítoto FLAG

DNA genómico de las cepas de *C. rodentium* que contienen los genes *pmfA* y *pmfC* etiquetados con el epítoto 3xFLAG-Km (Tabla 6), fue utilizado como DNA molde para amplificar por PCR con los oligonucleótidos 11771-FW-FLAG y 11771-RV-FLAG para *pmfA* y 11791-FW-FLAG y 11791-RV-FLAG para *pmfC* (Tabla 7) un fragmento que contiene la región con la etiqueta, el casete de Km y secuencias aledañas. Los productos de PCR se limpiaron y concentraron mediante extracciones con fenol-cloroformo y precipitación con etanol absoluto y glucógeno y se resuspendió en 12 μ L de agua estéril. Se usaron 6 μ L para electroporar las cepas *C. rodentium* Δ *hns*::FRT y Δ *stpA*::FRT (Tabla 6) conteniendo el plásmido pKD46 (Tabla 6), 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 en presencia de este antibiótico se sometieron a tres pases de crecimiento en placas con kanamicina a 37°C y posteriormente se replicaron en cajas de LB agar con y sin ampicilina de donde se seleccionaron aquellas que ya no crecieron en presencia del antibiótico, 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.

6.7 Clonación de los genes etiquetados en los plásmidos pMPPM-K3 y pMPPM-T3 para su sobreexpresión.

A partir de DNA genómico de las cepas de *C. rodentium* que contienen los genes *pmfA* y *pmfC* etiquetados con el epítotope 3xFLAG (Tabla 6), se amplificaron por PCR los genes completos utilizando los oligos 11771-HindIII-FW, 11791-HindIII-FW y FLAG-Rv-BH1-Sac (Tabla 7), que incluyen sitios de restricción para las enzimas BamHI y HindIII. Los fragmentos resultantes fueron purificados como se describe anteriormente, digeridos con BamHI y HindIII y posteriormente ligados a los plásmidos pMPPM-K3 y pMPPM-T3 (Tabla 6), digeridos con las mismas enzimas. La clonación en estos sitios posiciona a los genes etiquetados corriente abajo del promotor *plac* del vector, el cual está aledaño al sitio de multiclonación, permitiendo su expresión, la cual puede ser incrementada por inducción con IPTG. Los plásmidos resultantes (Tabla 6) se transformaron en la cepa de *E. coli* DH10 β .

6.8. Western Blot.

Las cepas etiquetadas de *C. rodentium* DBS100 *pmfA*::3xFLAG-Km, *pmfC*::3xFLAG-Km, DBS100 Δ *hns*::FRT *pmfA*::3xFLAG-Km, DBS100 Δ *hns*::FRT *pmfC*::3xFLAG-Km, DBS100 Δ *stpA*::FRT *pmfA*::3xFLAG-Km y DBS100 Δ *stpA*::FRT *pmfC*::3xFLAG-Km, junto con las cepas de *E. coli* DH10 β p-K3-*pmfA*, DH10 β pT3-*pmfA*, DH10 β pK3-*pmfC* y pT3-*pmfC* fueron crecidas en 5 mL de los medios DMEM, MM-N y LB hasta alcanzar densidades ópticas (D.O₆₀₀) de 0.6 y 1.0. Como controles se incluyeron las cepas etiquetadas en los genes que codifican para la pilina y la chaperona del operón fimbrial *ecp* de *C. rodentium* (DBS100 *ecpA*::3XFLAG-Km) y de EPEC (E2348/69 *ecpB*::3XFLAG-Km) (Tabla 6).

Diferentes volúmenes de cada cultivo (1.5 mL, 6 mL y 12 mL) se centrifugaron para coleccionar la pastilla bacteriana. Las pastillas obtenidas se trataron de dos formas. Por un lado, se resuspendieron en 240 μ L de una solución que contiene urea 8M y 80 μ L de buffer de carga (Glicerol 50% v/v, SDS 4% w/v, Tris HCl 200 mM pH 6.8, β -mercaptoetanol 10% v/v, azul de bromofenol 0.04% w/v) y por otro, se resuspendieron en 300 μ L de buffer PBS 1X para posteriormente sonicar durante 3 minutos en el equipo "Soniprep 150" (Vibra

Cell) con un amplitud de 35% durante 10 segundos con periodos de 5 segundos de descanso. En ambos casos, las muestras se hirvieron 5 minutos a 96°C antes de ser cargadas en el gel. Pasado este tiempo, las proteínas se resolvieron por electroforesis en un gel de poliacrilamida 12% (acrilamida 30% y bisacrilamida 0.8%) y se corrieron en cámaras verticales conteniendo amortiguador Tris-Glicina.

Para la transferencia, el gel y una membrana de nitrocelulosa (Amersham) se sumergieron en buffer de transferencia (Tris base 2.5 mM, glicina 19.2 mM y metanol 20%). La transferencia de las proteínas a la membrana se realizó en una cámara BioRad a 17V durante 43 minutos siguiendo las instrucciones del fabricante. Para verificar la transferencia, la membrana se tiñó con Rojo Ponceau, dicha tinción nos permite detectar 1.250 - 500 ng de proteína.

Posteriormente, se lavó la membrana 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 desechó la solución de bloqueo y se hicieron tres lavados con PBS-T, dejando pasar 10 minutos entre cada lavado. Se preparó una dilución del anticuerpo primario (α -GroEL, 1:25,000; α -FLAG, 1:2,500) (Sigma) en PBS-T donde se incubó la membrana durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente; posteriormente se hacen tres lavados con PBS-T y se procede a incubar en la dilución correspondiente con el anticuerpo secundario (α -IgG de ratón o de conejo acoplado a peroxidasa a una dilución de 1:10,000) (Rockland) por 2 horas 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 periodos cortos de tiempo que abarcaron desde 10 segundos hasta 7 minutos. El revelado de la película se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante.

6.9. Perfil de secreción

Se prepararon cultivos de las cepas etiquetadas de *C. rodentium* DBS100 *pmfA::3xFLAG-Km*, *pmfC::3xFLAG-Km*, DBS100 Δ *hns::FRT pmfA::3xFLAG-Km*, DBS100 Δ *hns::FRT pmfC::3xFLAG-Km*, DBS100 Δ *stpA::FRT pmfA::3xFLAG-Km* y DBS100 Δ *stpA::FRT pmfC::3xFLAG-Km* crecidas a 37°C con 5% de CO₂ en los medios LB y DMEM. 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 (TCA) 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 resuspendieron en 15 µL de buffer de carga (Laemmli) 1X, las muestras se corrieron en geles de acrilamida al 15% y visualizadas mediante tinción con azul de Coomassie.

6.10. Extracción de RNA

Se extrajo RNA a partir de cultivos de la cepa JPCR13 (Tabla 6) a una D.O.₆₀₀ de 0.3, 0.4 y 0.6 crecidas en medio DMEM en matraces de 250mL. Se cosecharon 80 mL de cultivo y la pastilla celular se recuperó por centrifugación, se resuspendió en 1 mL de solución A: SDS (0.5%), acetato de sodio 3M pH 4.8 (20 mM), EDTA 0.5 M pH 8 (10 mM) y agua tratada con dietil pirocarbonato (DEPC) y se mezcló con 600 µL de fenol ácido a 62°C durante 10 minutos en agitación. Las muestras se centrifugaron a 12200 rpm durante 2.5 minutos. El sobrenadante se pasó a tubos que contenían 1 mL de etanol absoluto, los cuales se centrifugaron a 13500 rpm durante 5 minutos para recuperar el RNA precipitado. La pastilla se lavó con etanol al 70% y se resuspendió en 400 µL de solución A. Se repitieron los lavados con etanol absoluto y etanol al 70%. Posteriormente, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 60 µL de agua tratada con DEPC. Una vez cuantificado en el Nanodrop, 5 µg de RNA fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa 1.5%. Dependiendo de la cantidad de DNA contaminante observado, se hicieron digestiones con la enzima DNasa I (Thermo Scientific). Se utilizó 1u de enzima por cada 50 µg de RNA y se incubó a 37°C durante 45 minutos. Posteriormente, se inactivó la reacción incubando a 72°C durante 15 minutos. Se corrieron 3 µg de las

muestras digeridas en geles de agarosa 1.5%. Finalmente, se corroboró la ausencia de DNA por PCR, utilizando como templado el RNA digerido y oligonucleótidos que permiten la amplificación de diferentes genes.

6.11 RT-PCR

Partimos de RNA libre de DNA para sintetizar cDNA. Se mezcló 1 μ L de oligonucleótido reverso (25 pMoL), 1 μ g de RNA, 1 μ L de dNTP's (10 mM) y agua DEPC para llevar a un volumen final de 12 μ L. La mezcla se calentó a 65°C durante 5 minutos, posteriormente se agregaron 4 μ L de buffer RT 5X FS (Invitrogen) y 2 μ L de DTT (0.1 M) (Invitrogen), esta nueva mezcla se incubó a 37°C durante 2 minutos. Transcurrido este tiempo se agregaron 200 U de M-MLV (Invitrogen) y se incubó a 37°C durante 60 minutos. La reacción se inactiva incubando a 75°C durante 15 minutos.

El cDNA sintetizado se utilizó como templado para una reacción de PCR utilizando los oligos específicos para evaluar los transcritos de interés (Tabla 7).

7. RESULTADOS

7.1. Resultados del operón *pmf*.

7.1.1. Regulación de *pmf* por H-NS, StpA, CicR, pehH y Ler.

Previamente se había demostrado que H-NS y StpA regulan negativamente la expresión de operón *pmf* cuando *C. rodentium* es crecida a 37°C en agitación, tanto en medio LB, como en DMEM y MM-N (Figura 13). H-NS y StpA son proteínas del nucleóide bacteriano homólogas capaces de interactuar entre sí y formar heterómeros (Leonard *et al.*, 2009). Además de StpA, *C. rodentium* codifica para otras 3 proteínas homólogas a H-NS: Ler, que es el regulador maestro de la isla de patogenicidad LEE, y CicR y PehH de las que no se sabe su función. Considerando el hecho de que el promotor del operón *pmf* es regulado por H-NS y StpA, se evaluó la posible participación de las otras tres en su expresión, determinando la actividad específica de *cat* dependiente de la fusión pKK-CRF1_A-*cat* (Tabla 6) en los fondos mutantes en *cicR*, *ler* y *pehH* (Figura 16).

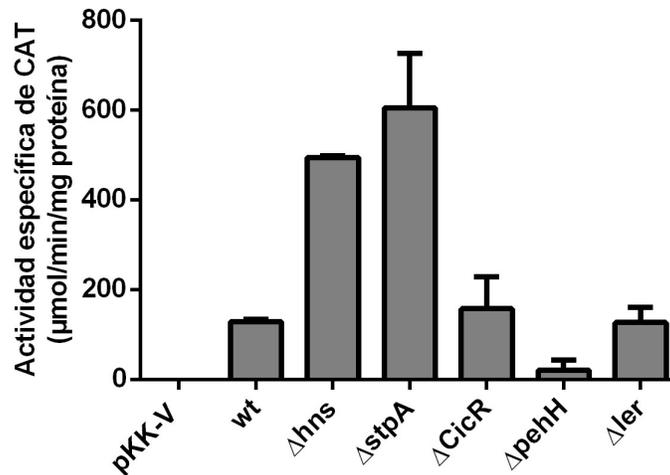


Figura 16. CicR, PehH y Ler no participan en la regulación de *pmf*. Actividad específica de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) obtenida a partir de extractos de *C. rodentium* DBS100 silvestre, Δhns , $\Delta stpA$, $\Delta cicR$, $\Delta pehH$ y Δler conteniendo la fusión CRF1_A-*cat*. Los cultivos se hicieron en tubos con 5 mL de MM-N en crecimiento estático en presencia de 5% de CO_2 durante 8 hrs. Cada barra muestra el promedio y desviación estándar de tres experimentos independientes por duplicado.

El promotor del operón *pmf* se expresa preferencialmente en MM-N, a 37°C en agitación en la cepa mutante en *hns* y en menor cantidad en la cepa mutante en *stpA* (Figura 13); sin embargo, en cultivos crecidos en condiciones estáticas con 5% de CO_2 , los niveles de des-represión alcanzados son muy similares en ambas mutantes. En la cepa mutante en *pehH* la actividad transcripcional disminuye, comparado con la actividad de la cepa silvestre, sugiriendo que la proteína PehH podría tener un efecto positivo en la expresión del operón *pmf*. Por su parte, la actividad en las mutantes en *cicR* y *ler* fue muy similar a la observada en la cepa silvestre en las condiciones evaluadas (Figura 16).

7.1.2. Etiquetado de proteínas codificadas en el operón *pmf* con el epítoto FLAG

Con el propósito de determinar si la expresión de los genes del operón *pmf* da lugar a proteínas, previamente etiquetamos en la cepa silvestre de *C. rodentium* los genes *pmfA* y *pmfC*, que codifican para la chaperona y la proteína hipotética del operón *pmf*, respectivamente; sin embargo, no se logró detectar a las proteínas por ensayos de *western blot* (Ortiz, Tesis de

Licenciatura, 2018). Debido a que el promotor del operón *pmf* muestra mayor expresión en las cepas Δhns y $\Delta stpA$, como se mostró anteriormente (Figura 13 y 16), se etiquetó a ambos genes *pmfA* y *pmfC* en estos fondos con la finalidad de favorecer su expresión. Para confirmar que las cepas generadas presentan el fenotipo asociado a la ausencia de H-NS y StpA, las cuales reprimen la expresión de la isla de patogenicidad LEE (Martínez-Plascencia, datos no publicados), realizamos perfiles de secreción de clonas candidatas obtenidas a partir de la mutagénesis realizada con el fragmento que lleva la etiqueta en los genes en estudio (Figura 17).

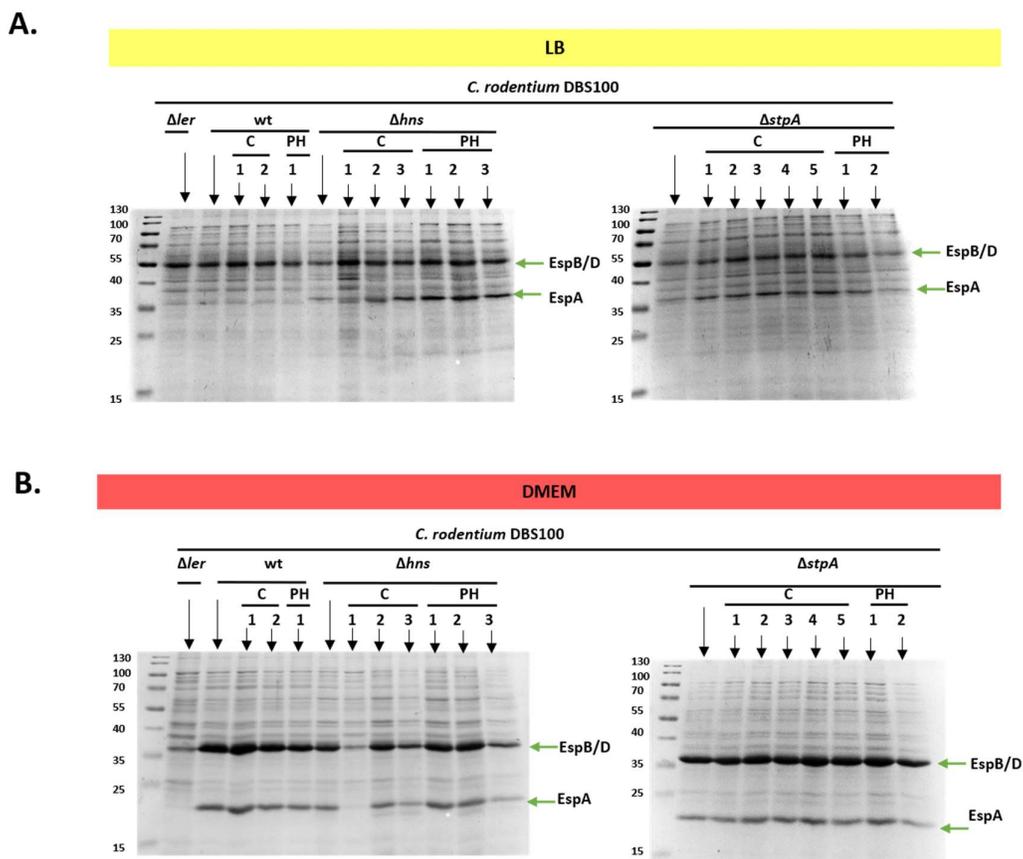


Figura 17. Perfil de proteínas secretadas de las cepas etiquetadas con el epítipo FLAG. El perfil de secreción de proteínas correspondiente a las cepas etiquetadas en el gen de la chaperona (*pmfA*::3xFLAG) y de la proteína hipotética (*pmfC*::3xFLAG) en los fondos wt, Δhns y $\Delta stpA$. En el panel A se ilustra el perfil de secreción de proteínas de las cepas crecidas en medio LB, condiciones que reprimen la expresión del SST3. En el panel B se ilustran las muestras obtenidas de cultivos en medio DMEM, el cual favorece la expresión de la isla de patogenicidad LEE y por tanto la secreción mediada por el SST3. C=chaperona, PH= proteína hipotética.

El medio DMEM se considera un medio de inducción para la expresión del LEE de los patógenos A/E, lo cual se refleja en el enriquecimiento de proteínas secretadas por el SST3 codificado en el LEE, mientras que el medio LB se usa como un medio que establece una condición de represión ya que mantiene la expresión del LEE en valores significativamente menores a los observados en DMEM. Ler es un anti-represor que desplaza a H-NS permitiendo la transcripción del LEE. En condiciones de represión el perfil de secreción de la cepa silvestre es muy parecido al de la cepa Δler , al no secretar proteínas que son sustrato del SST3, particularmente las proteínas translocadoras EspA, EspB y EspD que son las más evidentes del perfil. En ausencia de H-NS y StpA, las cuales regulan negativamente la expresión de la isla LEE, las respectivas cepas mutantes en estos reguladores expresan de manera casi constitutiva a los genes de la región LEE y por tanto del SST3, aún en condiciones de represión. Estos fenotipos fueron reproducidos por las cepas etiquetadas (Figura 17; EspA, EspB y EspD están indicadas en flechas verdes). En condiciones de inducción (DMEM), debemos observar a las proteínas del SST3 en los tres fondos: silvestre, Δhns y $\Delta stpA$ (Figura 17). A partir de este resultado se eligieron cepas representativas de cada uno de los fondos para los experimentos posteriores.

Las cepas seleccionadas fueron crecidas en tubos de 5 mL con medio LB, DMEM Y MM-N a 37° y en agitación. A partir de 1.5 y 6 mL de estos cultivos se prepararon proteínas para su análisis por *western blot* usando el anticuerpo que reconoce FLAG; sin embargo, no logramos detectar a las proteínas etiquetadas en ninguna de las cepas (datos no mostrados). A pesar de que las fusiones transcripcionales al gen *cat* indican que el promotor del operón *pmf* es significativamente activo en las cepas mutantes, dicha actividad no es suficiente para detectar a las proteínas por *western blot* en las condiciones probadas. Este resultado plantea diferentes posibilidades incluyendo que el transcrito está sujeto a regulación post-transcripcional dando lugar a cantidades de proteína que están por debajo del nivel de detección del ensayo, o que la transcripción que detectamos con las fusiones se aborta desde el primer gen, o que los transcritos no se traducen. Para evaluar esta última opción los genes etiquetados se clonaron en los plásmidos pMPPM-K3 y pMPPM-T3, que nos

permiten sobreexpresar estos genes al inducir su transcripción con IPTG. Las regiones clonadas en estos plásmidos se ilustran en la Figura 18.

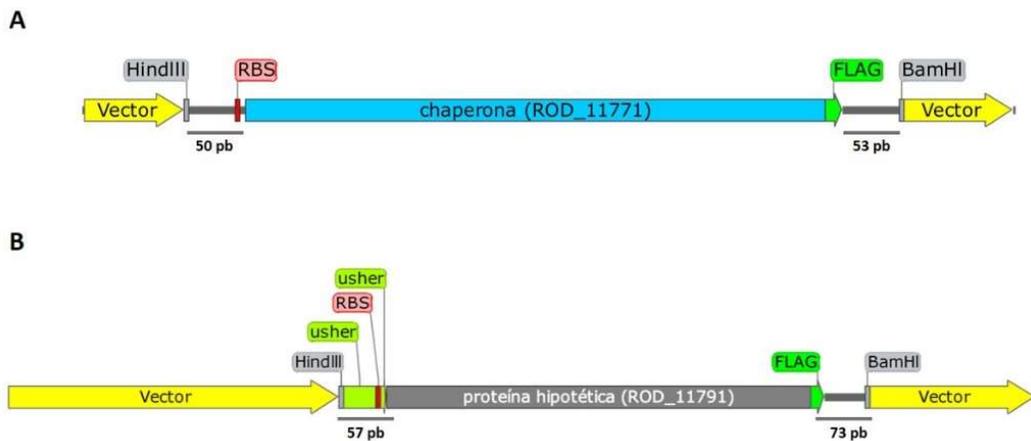


Figura 18. Esquema de los genes clonados en los plásmidos pMPM-K3 y pMPM-T3. En el panel A se ilustra la región clonada de la cepa etiquetada en el gen de la chaperona (*pmfA*) y en el panel B del gen de la proteína hipotética (*pmfC*) en los plásmidos pMPMK3 y pMPM-T3. En ambos casos se clonó al gen completo con la secuencia de la etiqueta FLAG, además de su sitio de unión a ribosoma (ilustrado en rojo) y alrededor de 50 pb río arriba y 50 pb río abajo de cada gen, pero sin incluir al promotor.

La presencia de los insertos de interés se corroboró por PCR utilizando los oligos pMPM-T3/K3-Fw y pMPM-T3/K3-Rv (Tabla 7), que alinean con secuencias de los plásmidos pMPM-K3 y pMPM-T3. Las colonias candidatas se secuenciaron utilizando los mismos oligos. Realizamos ensayos de *western blot* creciendo tanto a las cepas de *C. rodentium* etiquetadas como a *E. coli* DH10 β portando los diferentes plásmidos, en los tres medios de cultivo en los que ya se había demostrado actividad transcripcional del operón *pmf*, LB, DMEM y MM-N (Figura 13). En un principio, los ensayos se hicieron partiendo de 1.5 mL de cultivo y sonicando, condiciones en las que fue posible detectar la proteína hipotética PmfC pero no a la chaperona PmfA. Posteriormente, se prepararon extractos celulares a partir de 6 y 12 mL de cultivo, siendo el de 12 mL el que nos permitió detectar a ambas proteínas (Figura 19 y 20).

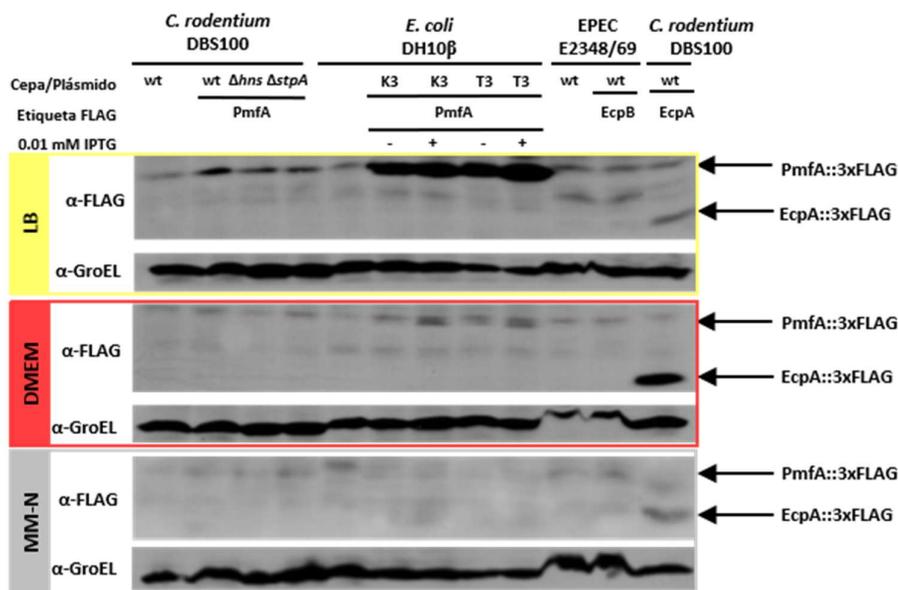


Figura 19. Expresión de la chaperona PmfA. Western blot con extractos totales de *C. rodentium* DBS100 silvestre, Δhns , y $\Delta stpA$ conteniendo el gen *pmfA::3xFLAG* codificante para la chaperona del operón *pmf*, así como de *E. coli* DH10 β portando los plásmidos derivados de los vectores pMPM-K3 o pMPM-T3 con el gen etiquetado. Como controles positivos se utilizaron extractos de las cepas *C. rodentium* DBS100 *ecpA::3XFLAG*-Km y EPEC *ecpB::3XFLAG*-Km, que expresan la subunidad fimbrial del operón ECP (EcpA), o la chaperona EcpB etiquetadas con FLAG, respectivamente. Los cultivos se crecieron en 5 ml de LB, DMEM o MM-N a 37°C con agitación hasta una D.O de 0.6. La detección de las proteínas etiquetadas se realizó con un anticuerpo α -FLAG y como control de carga se detectó GroEL con el anticuerpo α -GroEL. Esta figura es representativa del resultado de tres experimentos independientes.

La chaperona PmfA es una proteína de aproximadamente 30 kDa que no fue posible observar en las cepas de *C. rodentium* en ninguno de los medios evaluados, pero sí cuando se sobreexpresó en *E. coli*. De manera interesante, a pesar de que se partió de 12 mL de cultivo crecido a una D.O.₆₀₀ de 0.6, la chaperona no se expresa igual en los medios evaluados; su expresión se ve favorecida en LB, mientras en DMEM apenas es posible observarla y en MM-N no se detecta la chaperona. Esto nos sugiere que algo en el medio afecta la síntesis de la proteína, ya que además, si fuera un efecto directo sobre la actividad del *p/ac* de los plásmidos pMPM-K3 y pMPM-T3, veríamos el mismo patrón para la expresión de la proteína hipotética, pero eso no ocurre; esta proteína se expresa bien en los tres medios evaluados, aunque en MM-N se observa en menor cantidad (Figura 20), lo cual nos sugiere que la síntesis de

ambas proteínas está sujeta a regulación post-transcripcional, traduccional o post-traduccional en el fondo heterólogo *E. coli* DH10 β .

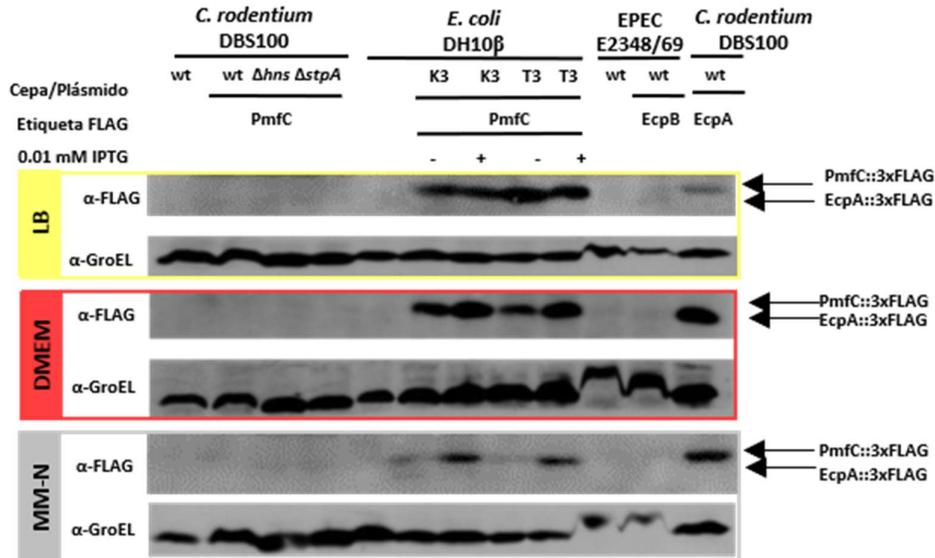


Figura 20. Expresión de la proteína hipotética PmfC. Western blot con extractos totales de *C. rodentium* DBS100 silvestre, Δhns , y $\Delta stpA$ conteniendo el gen *pmfC*::3xFLAG codificante para la chaperona del operón *pmf*, así como de *E. coli* DH10 β portando los plásmidos derivados de los vectores pMPM-K3 o pMPM-T3 con el gen etiquetado. Como controles positivos se utilizaron extractos de las cepas *C. rodentium* DBS100 *ecpA*::3XFLAG-Km y EPEC *ecpB*::3XFLAG-Km, que expresan la subunidad fimbrial del operón ECP (EcpA), o la chaperona EcpB etiquetadas con FLAG, respectivamente. Los cultivos se crecieron en 5 ml de LB, DMEM o MM-N a 37°C con agitación hasta una D.O de 0.6. La detección de las proteínas etiquetadas se realizó con un anticuerpo α -FLAG y como control de carga se detectó GroEL con el anticuerpo α -GroEL. Esta figura es representativa del resultado de tres experimentos independientes.

En estos experimentos se incluyó la cepa de *C. rodentium* DBS100 *ecpA*::3XFLAG-Km (Tabla 7) como control positivo para el anticuerpo α -FLAG en el western blot, esto debido a que la detección de EcpA-FLAG, que es la subunidad fimbrial del operón ECP, es un control muy consistente. Además, nos permite observar las diferencias de expresión en los diferentes medios, ya que ECP se expresa preferencialmente en DMEM, lo cual se observa en ambos experimentos (Figura 19 y 20).

La cepa EPEC *ecpB*::3XFLAG-Km también se incluyó como control para tener como referencia los niveles de expresión de una chaperona que, en principio,

se expresa cerca de 500 veces menos que la pilina, de la que se requieren alrededor de 1000 subunidades para formar el filamento que da lugar a la fimbria, mientras que solo se requieren un par de chaperonas periplásmicas (Allen *et al.*, 2012). Por lo anterior, EcpA es más abundante que EcpB, la cual no se detecta en las condiciones de crecimiento usadas en el experimento, ya que el operón *ecp* se expresa mejor a 30°C (Isidro-Coxca Tesis de Maestría, 2018).

7.1.3. Análisis de la organización transcripcional del operón *pmf*.

Sabemos que el operón *pmf* posee un promotor funcional (Ortiz-Tesis de Licenciatura, 2018), por lo que es de nuestro interés determinar si los tres genes, incluyendo el que codifica para la proteína hipotética que está sobrelapado con el que codifica para la proteína *usher*, se transcriben como un operón. Para analizar la organización transcripcional de *pmf* se diseñaron oligonucleótidos (Tabla 7) para amplificar cinco regiones a lo largo del presunto operón (Figura 21A). Por un lado, se generaron cDNAs utilizando el oligo reverso correspondiente a cada región, los cuales fueron entonces utilizados como templado para la reacción de PCR con los oligos Fw (*forward*) de las mismas regiones (Figura 21B y 21C). La región 1, que incluye la región intergénica entre la chaperona y el gen río arriba más próximo al operón *pmf* (*ROD_11761*), se incluyó como control negativo. Aunque para este caso no hay amplificación de una banda del tamaño esperado, esta reacción produjo bandas inespecíficas de diferente tamaño de las que aún desconocemos su origen (Figura 21B y 21C). La región 2, que incluye parte de la secuencia 3' del gen *pfmA* (chaperona), así como parte de la secuencia 5' del gen *pfmB* (*usher*), sí dio lugar a una banda del tamaño esperado, lo cual indica que ambos genes se co-transcriben (Figura 21B y 21C). Los oligos de la región 3 comprenden la parte interna de *pfmB*; sin embargo, el resultado de estos ensayos no deja claro si se está expresando, ya que se observa una banda muy tenue del tamaño esperado, junto con algunas otras bandas inespecíficas (Figura 21B y 21C). La región 4, que incluye la región intergénica entre los genes *pfmB* y *pfmC* (proteína hipotética), muestra una banda del tamaño esperado en el experimento ilustrado en la figura 21B, pero no así en el experimento de la figura 21C, donde hay bandas inespecíficas. Interesantemente, observamos la

presencia de una banda correspondiente a la región 5, que incluye la región intergénica entre el gen *pfmC* y un gen anotado como proteína de unión a peptidoglicano (*ROD_11801*), que va en sentido contrario al operón *pmf* (Figura 21B y 21C).

Para confirmar los resultados anteriores y resolver las ambigüedades observadas, se realizó un análisis por RT-PCR usando como templado el cDNA sintetizado a partir del oligonucleótido *ROD_11791-11801_RV* de la región 5, el cual es complementario a una secuencia dentro del gen *ROD_11801*. A partir de este cDNA se realizó la amplificación de las 5 regiones con los oligos Fw correspondientes (Figura 21D). Los resultados de este RT-PCR sugieren que una secuencia antisentido al gen *ROD_11801* se está transcribiendo junto con el operón *pmf*, o al menos con el gen *pfmC* que codifica la proteína hipotética. En este ensayo es clara la banda correspondiente a la región interna del gen *pmfB*. El dato para la región 2 no fue considerado porque tampoco hubo amplificación con el control positivo con DNA. Aunque estos resultados son hasta el momento preliminares y requieren de más replicas para ser confirmados, resulta interesante especular que el promotor *Ppmf* parece dar lugar a un transcrito que abarca los genes *pmfA* de la chaperona, *pmfB* de la proteína *usher*, y *pmfC* de la proteína hipotética, el cual además parece continuar hacia el primer gen localizado corriente abajo del operón que está en sentido opuesto. Estos resultados, de confirmarse, consolidan nuestro interés en entender la función de este operón fimbrial de características únicas. Sin embargo, tampoco se puede descartar que estos genes se transcriban en más de una unidad transcripcional ya que no hay consistencia entre los tres experimentos. Ante la posibilidad de que la transcripción de este grupo de genes sea modulada por diferentes elementos en *cis*, buscamos posibles terminadores, atenuadores y riboswitches a lo largo del clúster, encontrando un atenuador de la transcripción hacia el final del gen *pmfB* (Anexo 5), cuya funcionalidad queda por determinarse.

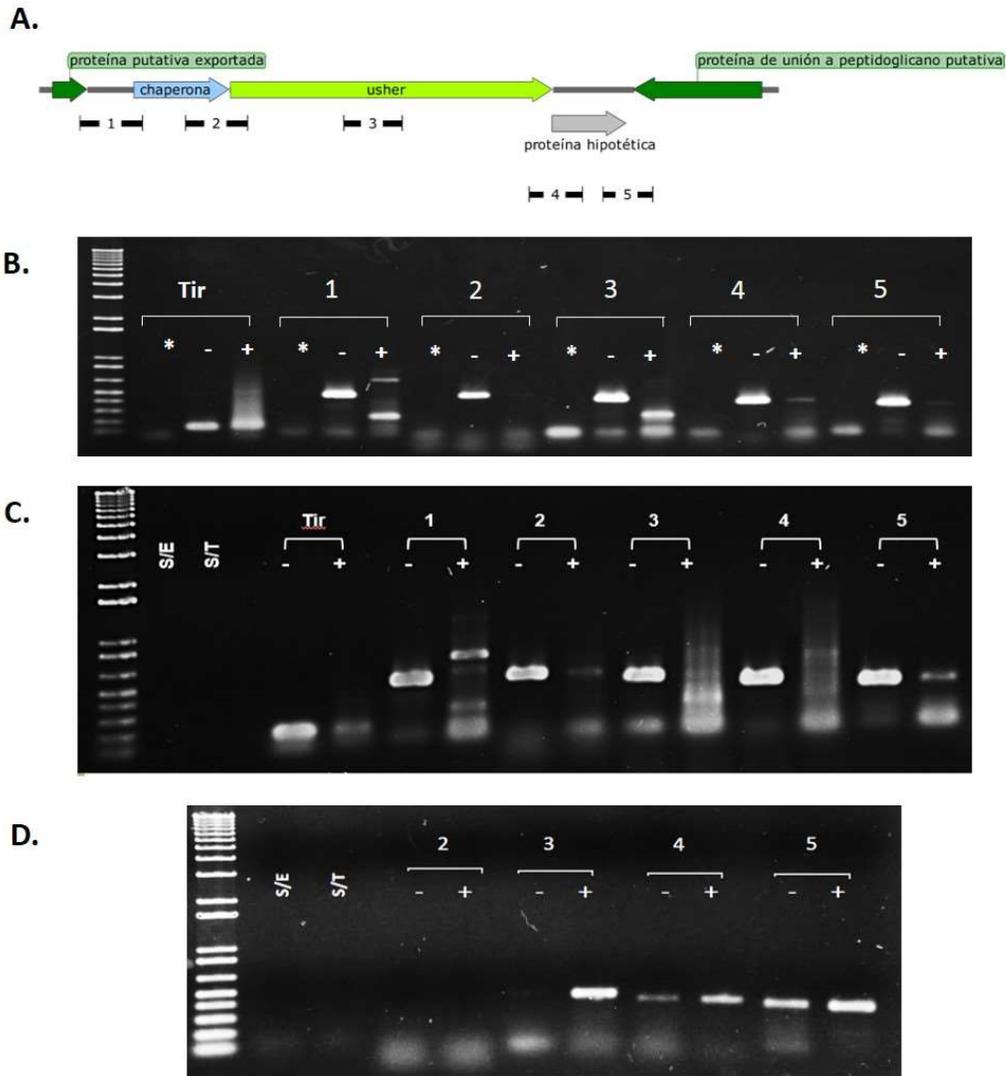


Figura 21. Organización transcripcional del operón *pmf*. A) Esquema de las regiones analizadas con los oligonucleótidos enlistados en la Tabla 7. B) RT-PCR utilizando como templado cDNA generado por cada oligonucleótido reverse (Tabla 7), se utilizó RNA total extraído de la cepa *C. rodentium* Δhns crecida en DMEM a una D.O₆₀₀ de 0.6. C) RT-PCR utilizando como templado cDNA generado por cada oligonucleótido reverse (Tabla 7), se utilizó RNA total extraído de la cepa *C. rodentium* Δhns crecida en DMEM a una D.O₆₀₀ de 0.4. D) RT-PCR utilizando como templado el cDNA sintetizado con el oligonucleótido ROD_11791-11801_RV (región 5). Se utilizó RNA total extraído de la cepa *C. rodentium* Δhns crecida en DMEM a una D.O₆₀₀ de 0.6. S/E: sin enzima Taq Polimerasa; S/T o *: sin templado; -: DNA como templado; +: cDNA como templado.

7.2. Resultados del operón *tsf*

7.2.1 La fusión *tssF-tssH-cat* es activa en ausencia de H-NS.

Para abordar nuestro primer objetivo e identificar la región mínima reguladora del operón *tsf*, se construyeron fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*. Debido a que éste se encuentra embebido en un operón que contiene genes para un SST6, también se construyó una fusión que incluye la región intergénica entre los dos operones divergentes del SST6 Cts1 y otra conteniendo una región más alejada río arriba del gen *tssH* (Figura 22).

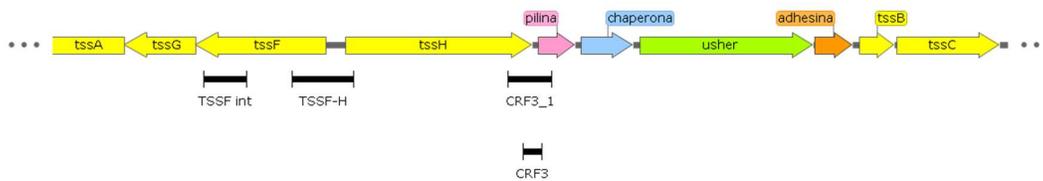


Figura 22. Regiones del operón fimbrial *tsf* y de los operones del SST6 *cts1L* y *cts1R* clonadas en el plásmido pKK232-8. Las barras negras indican las regiones incluidas en cada fusión. Los genes del SST6 se muestran en color amarillo. Nótese que estos genes se encuentran organizados en dos operones divergentes.

Previamente observamos que la fusión CRF3-*cat* mostraba actividad transcripcional a 37°C en presencia de 5% de CO₂ (Figura 14); sin embargo, los niveles de expresión eran muy bajos. En un intento de incluir posibles elementos reguladores que pudieran no estar contenidos en la fusión CRF3-*cat*, se construyó la fusión CRF3_1-*cat* que contiene la región -437 a +189 respecto al ATG del gen *tsfA* que codifica para la pilina. Al generar esta fusión, se obtuvo también una variante que contiene una mutación en la base -141, donde en vez de tener una adenina, se encuentra una guanina; a esta fusión se le nombró CRF3_1_{A141G}-*cat*. Por otro lado, con el propósito de determinar si el operón *cts1R* del SST6, encabezado por el gen *tssH*, posee un promotor activo, el cual por ende pudiera controlar también la expresión del operón *tsf*, se construyó la fusión TssF-H-*cat* que incluye la región intergénica entre los dos operones *cts1L* y *cts1R* del SST6. Además, utilizando la plataforma BPROM se predijeron algunos promotores dentro del gen *tssF* en dirección al

operón *cts1R* que inicia con el gen *tssH*, por lo cual se construyó la fusión TssFint-*cat* que los incluye (Figura 23).

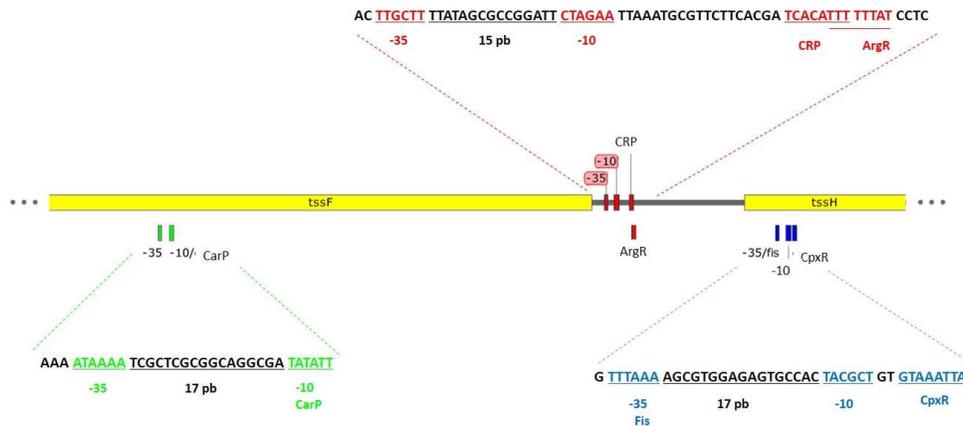


Figura 23. Promotores predichos con BROM de la región clonada en las fusiones TssF-int-*cat* y TssF-H-*cat*. El promotor 1 con mayor score (se ilustra en color rojo junto con el posible sitio de unión de los reguladores CRP y ArgR). Un segundo promotor se identificó dentro de la secuencia estructural del gen *tssH* con posibles sitios de unión de los reguladores Fis y CpxR (color azul). Un tercer promotor se identificó dentro de la región estructural del gen *tssF* con posible sitio de unión del regulador CarP (color verde). Las cajas promotoras azules abarcan la región de +60 a +89, las rojas de -265 a -237 y las verdes de -661 a -634 respecto al ATG de *tssH*.

En los ensayos con las fusiones descritas en la figura 22, pudimos observar que la actividad de la fusión CRF3_1-*cat* disminuye comparada con la fusión CRF3-*cat* y que la mutación en la base -141 no afecta la actividad del gen reportero. Por otro lado, la fusión TssF-int-*cat* no es activa sugiriendo que los promotores predichos (Figura 23) no son funcionales o no se activan bajo las condiciones de crecimiento probadas. De manera interesante, la fusión TssF-H-*cat*, aunque es inactiva en la cepa silvestre, es activa en ausencia de H-NS, y los niveles de expresión varían significativamente en función del medio de cultivo donde se crecen las bacterias, siendo el MM-N el medio donde se expresa mayormente (Figura 24).

Estos resultados son muy interesantes, ya que previamente se había reportado que los operones del SST6 Cts1 de *C. rodentium* son inactivos y su funcionalidad se evaluó forzando su expresión con promotores heterólogos inducibles (Gueguen y Cascales, 2013). La ausencia de expresión en la cepa silvestre y la fuerte represión ejercida por H-NS, plantea la posibilidad de que el SST6 Cts1 se exprese sólo bajo condiciones muy definidas, por ejemplo,

durante la infección o en co-cultivo con otras bacterias, y que la desrepresión sea mediada por un regulador específico que actúa bajo dichas condiciones.

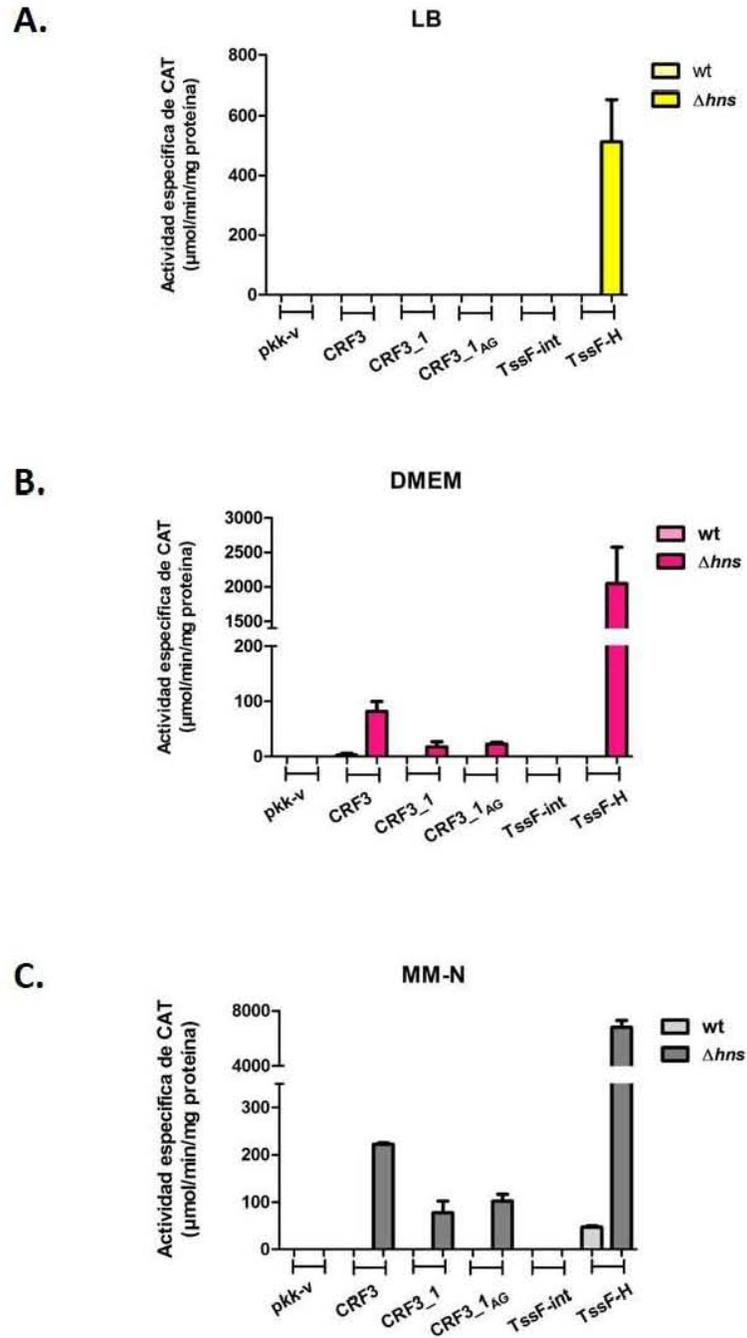


Figura 24. H-NS regula negativamente la expresión del operón *cts1R-tsf*. Actividad específica de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) obtenida a partir de extractos de *C. rodentium*

DBS100 silvestre o Δhns conteniendo las fusiones CRF3-*cat*, CRF3_1-*cat*, CRF3_1_{A141G}-*cat*, TssF-int-*cat* y TssF-H. Los cultivos se hicieron en tubos con 5 mL de medio LB, DMEM o MM-N y se dejaron crecer durante 8 horas en condiciones estáticas a 37°C con 5% de CO₂. Las gráficas representan los resultados de tres experimentos independientes por duplicado.

Considerando la diferencia de expresión de las fusiones CRF3-*cat* y TssF-H-*cat* en la cepa mutante en H-NS, nos pareció interesante evaluar si los promotores del operón *cts1R-tsf* son regulados diferencialmente por las proteínas homólogas a H-NS, como se observó para el promotor del operón *pmf* que es reprimido por H-NS y StpA y probablemente regulado positivamente por PehH (Figura 16). En la Figura 25 podemos observar que la actividad de la fusión CRF3-*cat* se incrementa en ausencia de H-NS, CicR y PehH y aunque en los tres fondos mutantes la expresión de *cat* es relativamente baja con respecto a otros promotores, pareciera que H-NS, CicR y PehH reprimen de manera cooperativa este promotor.

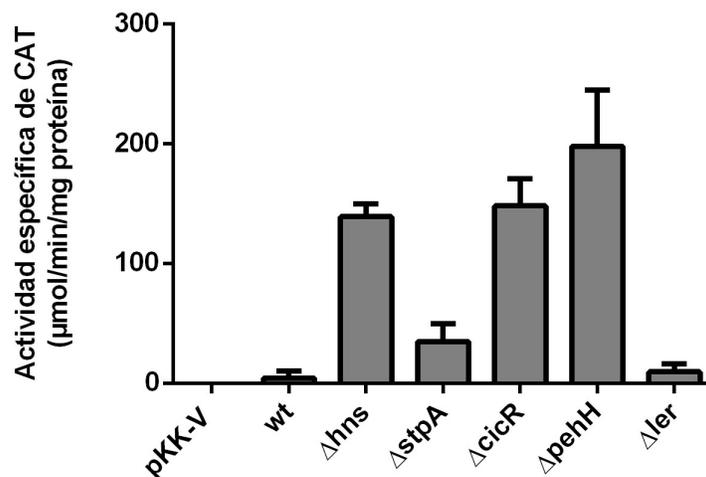


Figura 25. El promotor localizado en la región intergénica entre los genes *tssH* y *tsfA* es regulado negativamente por H-NS, CicR y PehH. Actividad específica de CAT (µmol/min/mg de proteína) obtenida a partir de extractos de *C. rodentium* DBS100 silvestre, Δhns , $\Delta stpA$, $\Delta cicR$, $\Delta pehH$ y Δler conteniendo la fusión CRF3-*cat*, crecidas en cultivos estáticos en tubos con 5 mL de MM-N en presencia de 5% de CO₂ a 37°C. Las gráficas muestran el promedio de tres experimentos independientes por duplicado.

Por su parte, mientras que la expresión de la fusión TssF-H-*cat* se incrementa en forma muy significativa en ausencia de H-NS y sólo moderadamente en ausencia de StpA, ésta no se ve afectada por la ausencia de CicR, PehH o Ler (Figura 26).

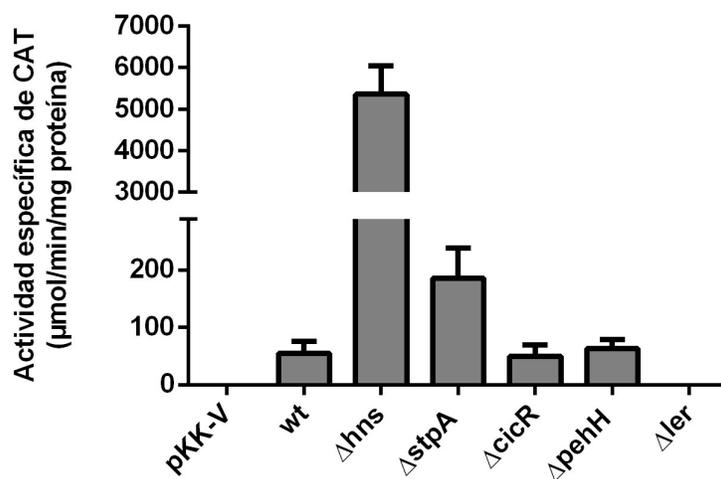


Figura 26. H-NS regula negativamente la expresión del operón *cts1R-tsf*. Actividad específica de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) obtenida a partir de extractos de las cepas *C. rodentium* DBS100 silvestre, Δhns , $\Delta stpA$, $\Delta cicR$, $\Delta pehH$ y Δler conteniendo la fusión TssF-H-*cat*, crecidas en cultivos estáticos en tubos con 5 ml de MM-N en presencia de 5% de CO_2 a 37°C . Las gráficas muestran el promedio de tres experimentos independientes por duplicado.

Por otro lado, para delimitar la región mínima reguladora del operón *cts1R-tsf* que incluye tanto genes del SST6 como del operón fimbrial *tsf*, se diseñaron 13 fusiones que contienen recortes de la secuencia contenida en la fusión TssF-H-*cat* (Figura 27 A). En un primer intento, se obtuvieron colonias candidatas de todas las fusiones transcripcionales; sin embargo, algunas de ellas presentaban mutaciones, por lo que se excluyeron de los experimentos posteriores. Con las fusiones TssF-H-1, TssF-H-3, TssF-H-4, TssF-H-9, TssF-H-10 y TssF-H-13 disponibles, decidimos empezar con los ensayos de actividad de CAT en la mutante en H-NS, que es donde la fusión TssF-H-*cat* mostró actividad significativa (Figura 22). Las fusiones TssF-H-2, TssF-H-5, TssF-H-6, TssF-H-7, TssF-H-8 y TssF-H-13 aún están en construcción. Por otro lado, también nos pareció interesante evaluar si la región clonada en la fusión TssF-H-*cat* era activa en las mismas condiciones, pero en sentido contrario, es decir, en dirección al operón divergente *cts1L* que también codifica para componentes del SST6 Cts1 (Figura 15), por lo cual construimos otra fusión con estas características y a la cual nombramos TssH-F-*cat*. Esta fusión desafortunadamente presentó una mutación en la posición +338 respecto al ATG del gen *tssF*, pero la incluimos en el ensayo mientras se genera la fusión correcta.

Al evaluar la actividad transcripcional de las fusiones pudimos observar que la fusión TssF-H_1-*cat* que incluye la región de -781 a +7 respecto al ATG del gen *tssH* disminuye la actividad transcripcional en la mutante en H-NS respecto a la fusión TssF-H-*cat* que abarca la región -781 a +120. Esto sugiere que la región estructural del gen *tssH* de +7 a +120 contiene al menos un elemento de regulación positiva que al ser eliminado afecta la activación de la fusión. Esta observación concuerda con la predicción *in silico* de un promotor en dicha región (Figura 23 y 27 A). La fusión TssF-H_3-*cat* que consta de la región -324 a +120 mantiene la misma actividad en la mutante en H-NS respecto a la fusión TssF-H-*cat*, sugiriendo que la región estructural del gen *tssF* de -781 a -424 no incluye elementos de regulación que influyan la expresión del promotor del operón *cts1R-tsf*. La fusión TssF-H_4-*cat* que incluye la región de -290 a +120 es activa en ausencia de H-NS, pero disminuye su expresión comparada con las fusiones TssF-H-*cat* o TssF-H_3-*cat*, sugiriendo que en la región -324 a -290 no incluida en TssF-H_4-*cat*, contiene sitios de regulación positiva, que al ser eliminados, afectan la expresión del clúster *cts1R-tsf*. La fusión TssF-H_9-*cat* abarca la región entre las posiciones -290 a -173 que incluyen la secuencia predicha como posible promotor P1 del operón *cts1R-tsf*; no obstante, la actividad de CAT es casi nula en la cepa mutante en H-NS. A pesar del resultado, no podemos descartar al promotor predicho, ya que dicha fusión podría carecer de elementos de regulación positiva que favorezcan su transcripción, como los propuestos anteriormente para la región -324 a -290. En el caso de la fusión TssF-H_10-*cat* que consta de la región -324 a -173, podemos observar un incremento en la actividad en la cepa mutante en H-NS respecto a la fusión TssF-H_9-*cat*, que resulta consistente con la observación de elementos que activan la transcripción en la región -324 a -290. De manera interesante, en la fusión TssF-H_10 podemos observar actividad en la cepa silvestre, sugiriendo que en la región de -173 a +7 se incluyen posibles sitios de unión a H-NS, que al ser eliminados desreprimen la expresión del *cts1-tsf*. Por su parte, la fusión TssF-H_13-*cat* muestra niveles de expresión en la mutante en H-NS muy parecidos a los observados en la fusión TssF-H_10-*cat*, pero no es activa en la cepa silvestre, lo cual nos lleva a considerar que, quizás el elemento de regulación positiva sugerido en la región de -424 a -290, en realidad abarca secuencia más río arriba (Figura 27 B).

En este mismo ensayo incluimos la fusión TssH-F-*cat* para evaluar si los promotores de ambos operones divergentes del SST6 Cts1 son reprimidos por H-NS. Los resultados muestran que la actividad transcripcional de la región reguladora divergente es considerablemente menor hacia el operón *cts1L* (Figura 27 B), lo cual sugiere, entre otras posibilidades, que el operón *cts1L* pudiera ser regulado negativamente por otro represor, o que la menor actividad pudiera estar relacionada a que se trata de un operón con menos genes. Estas posibilidades tienen que ser exploradas, ya que la fuerza de un promotor es una función multifactorial, y los niveles de expresión de un operón también están asociados a las cantidades que de cada uno de los componentes del SST6 se requieran.

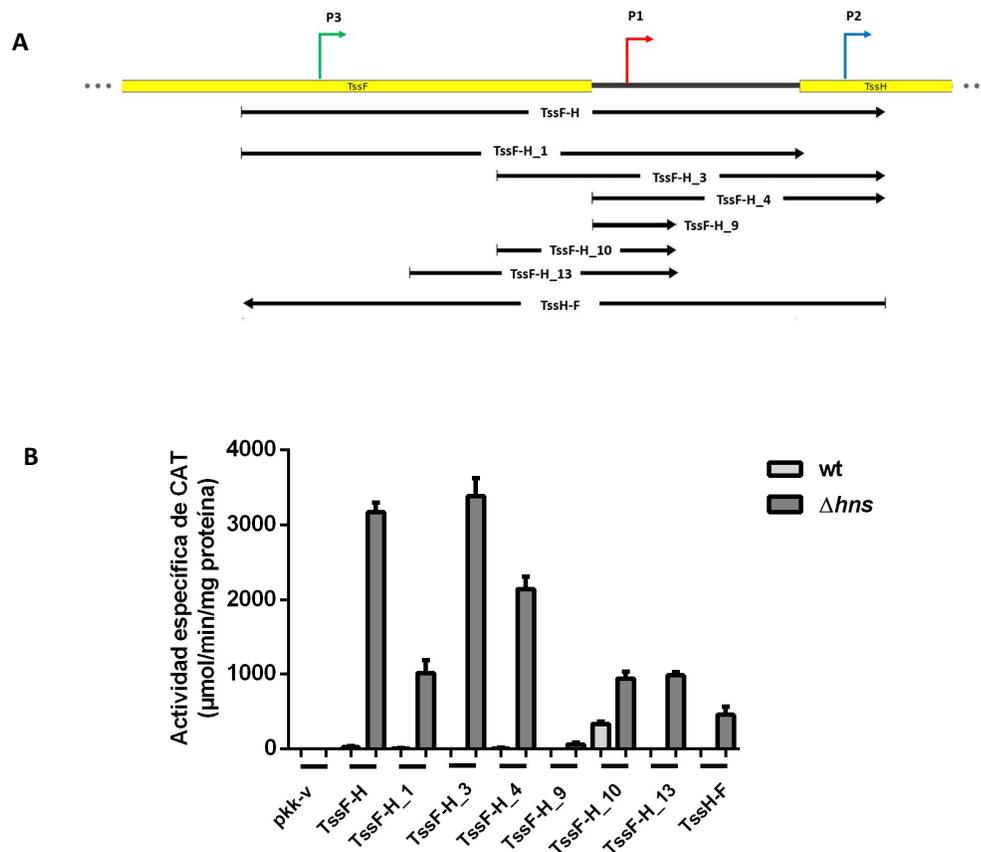


Figura 27. Identificación de la región mínima reguladora del operón *cts1R-tsf*. Esquema representando las fusiones que abarcan diferentes segmentos de la región reguladora del operón *cts1R-tsf*. Se indica la ubicación de los promotores predichos. La gráfica muestra el promedio de la actividad específica de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) obtenido de tres ensayos independientes por duplicado de *C. rodentium* DBS100 silvestre o Δhns conteniendo las fusiones que se indican en la gráfica. Las cepas fueron crecidas en cultivos estáticos en tubos con 5 mL de medio MM-N por 8 horas a 37°C con 5% de CO₂.

8. DISCUSIÓN

C. rodentium es un patógeno específico de ratones de bioterio que ha sido utilizado como modelo para entender de manera indirecta el mecanismo de patogenicidad de los patógenos A/E de humano EPEC y EHEC para los que no se cuenta con un modelo animal. *C. rodentium* comparte 2940 genes con EPEC y EHEC (Petty *et al.*, 2010), entre los que destacan la isla de patogenicidad LEE, la cual le confiere el fenotipo A/E a estos patógenos. Muchos de estos genes compartidos entre los patógenos A/E han sido estudiados en *C. rodentium* para determinar su función y su importancia durante la infección (Deng *et al.*, 2004; Bishop *et al.*, 2007). *C. rodentium* también se ha utilizado como sistema heterólogo para el estudio de algunos genes que sólo están presentes en EPEC y/o EHEC. Por ejemplo, la construcción de una cepa de *C. rodentium* que expresa toxinas tipo Shiga, las cuales son sintetizadas naturalmente por EHEC, que son responsables de la producción del Síndrome Urémico Hemolítico en humanos, permite el estudio *in vivo* del mecanismo de acción de estas toxinas (Mallick *et al.*, 2012). *C. rodentium* también ha sido utilizado para estudiar a los reguladores positivos PerC (por sus siglas en inglés: “*Plasmid-encoded regulator C*”) y Pch (por sus siglas en inglés: “*PerC homologue*”) presentes en EPEC y EHEC, respectivamente, los cuales activan la expresión del gen *ler* que codifica para el regulador maestro de la isla de patogenicidad LEE. De manera interesante, al expresarlos en *C. rodentium* ambas proteínas pueden activar la expresión de *ler* (Bustamante *et al.*, 2011). *C. rodentium* como modelo de estudio no sólo ha sido útil para comprender mejor la patogenicidad A/E, sino que también ha sido utilizado para estudiar otras enfermedades como lo son la enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa y cáncer de colon (Chandrakesan *et al.*, 2014; Higgins *et al.*, 1999). Ha también aportado al entendimiento de fenómenos celulares como la 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), así como del papel de la microbiota en un fenómeno denominado resistencia a la colonización (Keeney *et al.*, 2014; Collins *et al.*, 2014). Las enterobacterias cuentan con un gran repertorio de factores de virulencia que les permiten colonizar a sus hospederos; uno de estos factores son las fimbrias. De manera

particular, las fimbrias de la familia CU son muy abundantes dentro de estas bacterias (Tabla 1) y funcionan como factores de virulencia (Wurpel *et al.*, 2013). Se ha estudiado el papel de diversas estructuras fimbriales CU en enterobacterias y se ha encontrado una gran variedad de funciones: adhesión celular, evasión de la respuesta inmune y formación de biopelícula. Además, cada fimbria cumple aparentemente con una función particular y su expresión responde a estímulos específicos en el ambiente y, por ende, se regulan de manera diferencial. Tal es el caso de lo que ocurre con las fimbrias Psa (por sus siglas en inglés: “*pH six antigen*”) y Caf (por sus siglas en inglés: “*cluster fraction 1 antigen*”) de *Y. pestis*, Ipf (por sus siglas en inglés: “*Infantis plasmid encoded fimbria*”) y Klf (por sus siglas en inglés: “*K88-like fimbria*”) de *S. Infantis*, y Fim y Pap en UPEC, por mencionar solo unos ejemplos. *Y. pestis* es una enterobacteria causante de peste, la cual contiene 9 operones CU (Tabla 1). Esta bacteria produce dos adhesinas CU importantes para su virulencia: Psa y Caf (Galyov *et al.*, 1990; Lindler *et al.*, 1993). De manera interesante, las adhesinas Psa y Caf no forman parte de fimbrias independientes sino de un filamento delgado o de una cápsula, respectivamente. Caf favorece la virulencia al evitar la fagocitosis y al evadir al sistema inmune innato al unirse a la citosina pro-inflamatoria interleucina-1 durante los estadios tempranos de infección (Du *et al.*, 2002; Zav’yalov *et al.*, 1995). Por su parte, Psa también evade la respuesta inmune (Zav’yalov *et al.*, 2009) y promueve la formación de biopelícula (Felek *et al.*, 2011). Estas adhesinas son un ejemplo de diversidad funcional dada a partir de diferencias en el ensamblaje del filamento. Por su parte, *S. enterica* sv *Infantis* es uno de los serovares que más prevalecen en el mundo y está asociado con casos de gastroenteritis. Este serovar contiene 12 operones fimbriales CU (Tabla 1). Algunas cepas de *S. Infantis* poseen el plásmido pESI que le confiere resistencia a antibióticos. En este plásmido se encuentran los operones que codifican para dos fimbrias CU: Ipf y Klf. La expresión del operón *klf* es regulada negativa y positivamente por KlfL y KlfB, respectivamente; ambos reguladores se encuentran codificados dentro del mismo plásmido pESI. El operón *ipf* se encuentra regulado negativamente por Fur y es activado por OmpR. Ambos operones son preferencialmente activos en condiciones de microaerobiosis a 41°C respecto a 37°C *in vitro*, lo cual es consistente con que ambos operones muestran mayor expresión en pollos

comparado con ratones, estas fimbrias son un ejemplo de cómo la expresión de éstas varía de un hospedero a otro en respuesta a condiciones fisiológicas, como lo es la temperatura corporal (Aviv *et al.*, 2017). De manera interesante, el operón *klf* se encuentra muy conservado en EHEC, a excepción de la adhesina, la cual presenta variaciones que probablemente cambien las propiedades de adhesión de ambas fimbrias permitiéndole colonizar a cada bacteria hospederos distintos (Zhang *et al.*, 2007). En el caso de UPEC, este patotipo codifica para 12 operones CU (Tabla 1), de los cuales la fimbria Pap y Fim son las mejor estudiadas y en muchos casos se habla de éstas para referenciar a las fimbrias CU en general. La fimbria Pap codifica para una adhesina PapG la cual reconoce glucolípidos Gal α 1-4Gal presentes en la superficie de las células renales, permitiendo que UPEC se adhiera a este órgano causando pielonefritis. Por su lado, la fimbria Fim o Tipo I incluye la adhesina FimH que es capaz de reconocer receptores manosilados presentes en la superficie de las células de la vejiga provocando cistitis (Allen *et al.*, 2012). Estas dos fimbrias ilustran de manera clara cómo distintas adhesinas presentes en la misma bacteria pueden proporcionar especificidad por diferentes nichos dentro de un mismo hospedero. A su vez, diferentes mecanismos regulan la expresión de estas fimbrias en respuesta al entorno donde se encuentra la bacteria (Figuras 6, 7 y 8).

A pesar de los ejemplos citados, sigue siendo una pregunta abierta ¿por qué las enterobacterias poseen un repertorio variable de operones CU? Recientemente, se reportó el primer estudio integral del papel de cada uno de los operones fimbriales CU en *S. Typhi*, un patógeno específico de humano causante de la fiebre tifoidea que contiene 12 operones (*stg*, *sth*, *bcf*, *fim*, *saf*, *sef*, *sta*, *stb*, *stc*, *std*, *ste*, y *tcf*) pertenecientes a esta familia (Dufresne *et al.*, 2018) (Tabla 1). En este estudio notaron que los operones fimbriales se expresan preferencialmente en medios mínimos y que los promotores respondían a diferentes condiciones de crecimiento, sugiriendo que diferentes mecanismos de regulación controlan su expresión; sin embargo, su función pareciera ser redundante para algunos operones, mientras que otros sí proveen diferencias funcionales. Las fimbrias Fim, Saf, Sta, Stb, Std y Tcf están involucradas en la capacidad de invasión de *S. Typhi* a células epiteliales y

participan durante la fagocitosis por macrófagos, a excepción de *Std* cuya ausencia únicamente afecta la supervivencia en macrófagos, mientras que *Fim* es la única fimbria que afecta la movilidad. De manera interesante, aun los operones que incluyen pseudogenes (*stc*, *bcf*, *stg*, *ste* y *sef*) contribuyen a la patogénesis de *S. Typhi*. Cada fimbria juega un papel durante la interacción con células epiteliales y en la producción de biopelícula, excepto por *Sta* y *Sth* que parecen no tener una función en particular; sin embargo, *Sta* pudiera estar involucrada en la especificidad de hospedero, pues es la única fimbria presente en todas las cepas que tienen como único hospedero al humano, mientras que *Sth* pudiera tener un papel durante la adherencia a superficies abióticas. Aunque este estudio nos permite imaginar lo que pudiera estar ocurriendo con otros patógenos, es importante resaltar que *S. Typhi* es un patógeno específico de humano y que los resultados obtenidos en ese estudio quizás no se reproduzcan si se usan otro tipo de líneas celulares, como hepatocitos o células de la vesícula biliar, donde *S. Typhi* también invade. En este sentido, *C. rodentium* es un modelo ideal para estudiar de manera integral la funcionalidad de cada operón CU, tanto de manera individual como conjunta, debido a que es un patógeno específico de ratón y se pueden realizar estudios *in vivo*.

A la fecha, solo se ha descrito la importancia de dos operones CU de *C. rodentium* durante la patogénesis: GCF que participa en los primeros días de la colonización a ratón y KFC que es importante durante etapas tardías de la colonización (Caballero *et al.*, 2015; Hart *et al.*, 2008). Por lo anterior, en este trabajo nos propusimos iniciar la caracterización de otros dos operones fimbriales de la familia CU de *C. rodentium*, aquí denominados *pmf* y *tsf*.

pmfABC (*ROD_11771 a ROD_11791*) es un operón muy interesante porque carece de un gen que codifique para la subunidad fimbrial, pero posee los genes *pfmAB* (*ROD_11771 y ROD_11781*) que son aparentemente funcionales y codifican para una chaperona y un *usher*, respectivamente. En este estudio encontramos que el gen *pmfC* (*ROD_11791*), codificante para una proteína hipotética, también es parte del operón (Figura 21). Los ortólogos más cercanos del operón se encuentran en cepas del género *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Leclercia* y *Salmonella* (Anexo 2). De manera interesante, estos operones también carecen de un gen para la subunidad fimbrial y en su lugar

tienen genes que codifican para proteínas hipotéticas. Nuestros resultados indican que el operón *pmf* posee un promotor activo que es reprimido por H-NS y StpA, el cual parece transcribir a los tres genes del operón, los cuales, a su vez, pueden dar lugar a un transcrito que se traduce en proteínas, por lo menos en lo que respecta a las proteínas PmfA (chaperona) y PmfC (proteína hipotética). Por lo anterior, no podemos descartar la posibilidad de que los componentes de este operón tengan una función en *C. rodentium*.

Una posibilidad es que la chaperona PmfA y el *usher* PmfB exporten una pilina codificada en otro operón o a la proteína hipotética PmfC; sin embargo, en ambos casos no hay precedente. Si esto estuviese ocurriendo, probablemente la proteína hipotética no estaría funcionando como pilina, ya que los ortólogos más cercanos de este gen también son genes que codifican proteínas hipotéticas. Solo en un par de casos están anotadas como posible subunidad fimbrial, como el de un ortólogo presente en *S. Typhimurium* con la que comparte una identidad del 41% (Anexo 2); sin embargo, la proteína hipotética de *C. rodentium* no presenta motivos típicos de pilina, pero sí un motivo de glucosilación de la familia RolB/RolC y un motivo DUF1120 de función desconocida (Anexo 3). Se ha propuesto que RolC de *Agrobacterium rhizogenes* es una P-glucosidasa capaz de liberar citoquininas activas libres de sus conjugados glucosídicos inactivos y de alterar el crecimiento y desarrollo de plantas transgénicas, mientras que RolB hidroliza glucosidos (Estruch *et al.*, 1991a; 1991b). Por su parte, el motivo DUF1120 es abundante entre proteínas bacterianas hipotéticas pero su función no ha sido descrita. *E. ludwigii* EN-119 y *E. ludwigii* EcWSU1 codifican para una proteína hipotética que contiene ambos motivos RolB/RolC y DUF1120, además de un motivo MHC_I_2 y un motivo Candida_ALS_N. Llama la atención que al alinear la secuencia de aminoácidos de PmfC de *C. rodentium* con la proteína hipotética de *E. ludwigii*, pareciera también conservar algunos residuos pertenecientes a los motivos Candida_ALS_N y MHC_I_2 (Anexo 4). Los motivos MHC_I_2 están asociados con proteínas inducibles por ácido retinoico y fungen como ligandos para la activación del inmunoreceptor NKG2D, los cuales se expresan en células NK, células T y macrófagos (Zou *et al.*, 1996), mientras que los motivos Candida_ALS_N son los ligandos que permiten la unión de α -aglutininas en

levaduras (Linder y Gustafsson, 2007). Si la presencia de estos motivos en PmfC le confieren funciones adhesivas u otras funciones en *C. rodentium* es materia de estudios futuros, ya que no podemos descartar o confirmar que tenga una función. Patel (2016) sugiere tener en cuenta que, entre los genes anotados como codificantes de proteínas hipotéticas, se encuentran diversos genes de virulencia que en un principio no son reconocidos debido a que las condiciones de trabajo *in vitro* son muy distintas comparadas con las condiciones presentes dentro de un hospedero. En particular con respecto a la respuesta inmune, disponibilidad de nutrientes y la interacción con otras bacterias comensales o patógenas.

La organización transcripcional del operón *pmf* sugiere la transcripción de un gen codificante para una proteína de unión a peptidoglicano (ROD_11801), que de manera interesante se encuentra en dirección convergente al operón *pmf*, por lo que se buscó bioinformáticamente ORF's (por sus siglas en inglés: "Origin of Replication Frame's") distintos a los anotados en sentido al operón *pmf* y no se encontraron (Anexo 5). La importancia de la co-expresión de esta región con el operón *pmf* nos sigue sugiriendo funciones novedosas para esta fimbria y sin duda alguna sería muy interesante evaluar hasta donde continúa la transcripción del operón *pmf*.

Adicionalmente, el operón *pmf* es un ejemplo muy bonito de la regulación cooperativa ejercida por las proteínas asociadas al nucleóide H-NS y StpA. Se sabe que StpA es capaz de compensar, en algunos casos, la ausencia de H-NS al reprimir los genes que normalmente regula. Tal es el caso del operón *bgl* que le confiere a *E. coli* la habilidad de utilizar β -glucosidos (Ueguchi *et al.*, 1998). Este operón es regulado negativamente por H-NS (Schnetzer *et al.*, 1996), pero en su ausencia StpA puede reprimir su expresión (Free *et al.*, 1998). En contraste, en este estudio pudimos observar que la eliminación de H-NS o de StpA, permiten la activación del promotor del operón *pmf* a niveles muy similares (Figura 16), lo cual sugiere que a diferencia del operón *bgl* para el que StpA reemplaza a H-NS, para *pmf* estas proteínas actúan en sinergia para reprimir efectivamente su expresión. Queda por determinar si dicha cooperatividad involucra la formación de heterómeros o si se unen a sitios independientes sobre la región reguladora. El análisis de la expresión del

promotor de *pmf* en una doble mutante en H-NS y en StpA no es posible porque dicha mutante tiene problemas de viabilidad. Para solventar esta limitación, se transformó la cepa mutante $\Delta stpA$ conteniendo la fusión pKK-CRF1-*cat* con el plásmido pT6-HNS-G_{113D}, 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. En un estudio preliminar, pudimos notar que no aumentaba la expresión del operón *pmf* en esta cepa con respecto a las mutantes individuales (datos no mostrados), sugiriendo que H-NS y StpA reprimen en forma cooperativa la expresión de *pmf*, ya sea formando heterómeros o uniéndose simultáneamente al DNA. De manera interesante, además de la regulación transcripcional, la expresión de la chaperona PmfA pareciera estar sujeta también a regulación post-transcripcional, ya que se expresa bien en LB, pero no así en DMEM y MM-N a pesar de que se expresa a partir de un plásmido con un promotor inducible y en un fondo heterólogo (Figura 19).

El contexto genómico del operón *tsf* es muy interesante al estar dentro de un operón que codifica para genes del SST6 Cst1. *tsf* tiene sus ortólogos más cercanos en *Enterobacter cancerogenus*, *Cedecea lapagei*, *Pantoea alhagi*, *Cronobacter turicensis* y varias especies de *Yersinia* (Anexo 6). De manera interesante, en estas bacterias se conserva la organización estructural de los genes “core” del Cts1 en dos operones divergentes, así como la presencia del operón fimbrial entre los genes *tssH* y *tssB*. Sin embargo, hay otros ejemplos donde los operones ortólogos del SST6 Cts1 están similarmente organizados pero no incluyen un operón fimbrial. Tal es el caso del SST6 de *S. Typhimurium* que en su lugar contiene genes que codifican para un sistema toxina/antitoxina que no está presente en Cts1 (Anexo 7). Este sistema, al igual que Cts1, está regulado negativamente por H-NS (Figura 28) (Brunet *et al.*, 2015). La regulación mediada por proteínas tipo H-NS también se ha reportado en genes del SST6 de *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* HSI-2 y HSI-3, *P. putida*, *Vibrio parahaemolyticus* y *Edwardsiella tarda* (Castang *et al.*, 2008; Renzi *et al.*, 2011; Eijkelkamp *et al.*, 2013; Salomon *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014).

Entre el gen *tssH* del SST6 Cts1 de *C. rodentium* y el gen de la subunidad fimbrial de *tsf* (ROD_27771), se encuentran 83 pb de región intergénica. Un análisis con BPRM de dicha región arroja la presencia de un promotor con sitios de unión de NagC (Anexo 8), el cual responde a la presencia de N-acetylglucosamina (NAG) y ácido N-acetylneuramínico (NANA), que se ha reportado activa la expresión del operón *LEE1* y es esencial para que EHEC se adhiera a células epiteliales (Le Bihan *et al.*, 2017). Con las fusiones transcripcionales CRF3-*cat* y CRF3_1-*cat* que incluyen esta región, pudimos observar, con respecto a la cepa silvestre, un ligero incremento en su expresión en cepas mutantes en los genes que codifican para H-NS, CicR y PehH (Figura 25), sugiriendo la presencia de un promotor relativamente débil que es regulado de manera negativa por estas proteínas, aunque el mecanismo queda por ser definido ya que poco sabemos del modo de acción y función de CicR y PehH. Por otra parte, la organización de los genes *tssH* y *tsf*, plantearon la posibilidad de que se co-expresen a partir de un promotor localizado corriente arriba del gen *tssH*, en la región intergénica de los operones *cts1L* y *cts1R* del SST6. El análisis de la actividad asociada a fusiones transcripcionales con recortes de la región intergénica entre estos operones, reveló la presencia de dos posibles promotores que coinciden con los predichos por BPRM (Figura 23 y 28). Cabe hacer notar que el promotor 2, localizado dentro de la secuencia codificante de *tssH*, presenta mayor actividad que el promotor 1 localizado en la región intergénica. Esto plantea la posibilidad de que el promotor 2 sea el responsable de la activación del operón *tsf*, y el promotor 1 del gen *tssH*, así como de que ambos pudieran regularse diferencialmente, como lo sugiere la presencia de posibles sitios de unión para CRP y ArgR, mientras que para el promotor 2 se predicen sitios de unión para FIS y CpxR.

ArgR es un regulador transcripcional de la síntesis de arginina, que también juega un papel en la regulación de factores de virulencia; tal es el caso de su función como regulador negativo en la vía ADI (por sus siglas en inglés: “*arginina deiminasa*”) en *Listeria monocytogenes* (Xiong *et al.*, 2015). *L. monocytogenes* es un patógeno de humanos que tiene una alta resistencia a los ambientes ácidos, la cual está dada por la producción de amonio a partir de la vía ADI para neutralizar los protones intracelulares y así elevar el pH (Cheng

et al., 2013). Adicionalmente, ArgR responde a otros estímulos ambientales como cambios de temperatura y tensión oxigénica (Xiong *et al.*, 2015). Por su parte, CRP juega un papel importante durante la represión catabólica. La represión catabólica es un fenómeno en el cual la presencia de glucosa y sus análogos disminuye la concentración celular de cAMP, evitando la expresión de los operones *lac*, *ara*, *mal*, entre otros, que requieren de la formación del complejo cAMP-CRP para su activación (Ullmann y Danchin *et al.*, 1993).

Fis es una proteína del nucleoide bacteriano capaz de unirse a DNA, la cual entre sus funciones incluye que regula la replicación al unirse a *oriC* (Filutowicz *et al.*, 1992), la expresión de algunos genes regulados a su vez por RpoS (Xu y Johnson, 1995), y la actividad de HU y H-NS, otras proteínas asociadas al nucleoide bacteriano (Claret y Rouviere-Yaniv, 1996; Falconi *et al.*, 1996). También regula la expresión de operones involucrados en el catabolismo de azúcares y ácidos nucleicos los cuales, de manera interesante, también se encuentran regulados por CRP (González-Gil *et al.*, 1998). Por su parte, el sistema Cpx le permite a la bacteria detectar situaciones de estrés en membrana, identificar proteínas que no estén bien plegadas y regular la expresión de diversos genes para asegurar un estado de homeostasis en la envoltura celular (Raivio y Silhavy, 1999). Este sistema es activado por un sistema de dos componentes conformado por CpxA, una histidin cinasa, y CpxR, un regulador de respuesta citoplásmico (Vogt *et al.*, 2012). Cuando CpxR es fosforilado, activa o reprime la expresión de diversos genes al unirse directamente a su secuencia blanco en el DNA. Si el SST6 y TSF se co-expresan y co-localizan, cabe la posibilidad que se afecte la homeostasis de la membrana celular, lo cual haría sentido con que su expresión esté regulada de manera negativa por este sistema. Debido a que esto aún no se ha corroborado, queda como opción que la expresión de *tsf* y del *cts1* sea excluyente, y de ser así sería interesante evaluar de qué depende la expresión de un factor de virulencia o del otro. En caso de estarse co-expresando, también sería interesante estudiar la función que pudieran estar ejerciendo de manera conjunta, debido a que no hay un antecedente de esta interacción.

En conjunto, el estudio de los operones *pmf* y *tsf* nos ha permitido conocer más sobre la regulación de la expresión genética de los operones fimbriales en *C.*

rodentium y nos abre demasiadas interrogantes que sustentan estudios futuros sobre la función de estos dos operones que, sin duda alguna, son muy particulares. Además, este trabajo forma parte de un estudio más grande donde intentamos abordar de manera sistemática e integral el estudio de la función y regulación de los operones fimbriales CU presentes en *C. rodentium*, con el fin de comprender más sobre la diversidad funcionalidad de estas estructuras en bacterias patógenas y el papel que juegan los genes accesorios que se co-transcriben dentro de los operones fimbriales.

9. CONCLUSIONES

9.1 Conclusiones del operón *pmf*.

- a) El operón *pmf* es regulado negativamente por los reguladores globales H-NS y StpA y positivamente por PehH.
- b) El operón *pmf* incluye a la proteína hipotética (ROD_11791) y posiblemente a otros genes río abajo de este gen.
- c) Los componentes del operón se traducen a proteínas y podrían estar regulados post-transcripcionalmente.

9.2 Conclusiones del operón *tsf*.

- a) El promotor del operón fimbrial *tsf* es muy poco activo en las condiciones evaluadas y está regulado negativamente por H-NS, CicR y PehH.
- b) El promotor del operón *cts1R-tsf* es muy activo y fuertemente reprimido por H-NS.
- c) La región mínima reguladora del operón *cts1R-tsf* se encuentra contenida entre las posiciones -324 a +120 respecto al ATG del gen *tssH*.

10. PERSPECTIVAS

10.1. Perspectivas para el operón *pmf*.

- a) Corroborar el efecto positivo de PehH en la expresión de *pmf*.
- b) Evaluar la sobreexpresión de las proteínas en *C. rodentium* y estudiar la regulación post-transcripcional del operón *pmf*.
- c) Identificar la función de la proteína hipotética PmfC.

- d) Investigar qué genes río abajo se co-expresan dentro del operón *pmf*.
- e) Evaluar si el operón se expresa *in vivo* y si tiene un papel durante la patogénesis de *C. rodentium*.
- f) Determinar si PmfC es exportada a través de la proteína *usher* PmfB y la chaperona PmfA.

10.2 Perspectivas del operón *tsf*.

- a) Corroborar la funcionalidad de los dos posibles promotores identificados.
- b) Verificar si los reguladores predichos con BPRM tienen un papel durante la expresión del operón *cts1R-tsf*.
- c) Determinar si los genes del operón se traducen a proteínas.
- d) Determinar la co-expresión de genes del SST6 Cts1 junto con el operón *tsf*.
- e) Evaluar si el operón se expresa *in vivo* y si tiene un papel durante la patogénesis de *C. rodentium*.
- f) Analizar si Tsf se ensambla en un filamento en la superficie de la bacteria.

11. ANEXOS

Anexo 1. Esquema de la composición estructural de los operones CU de *C. rodentium*.

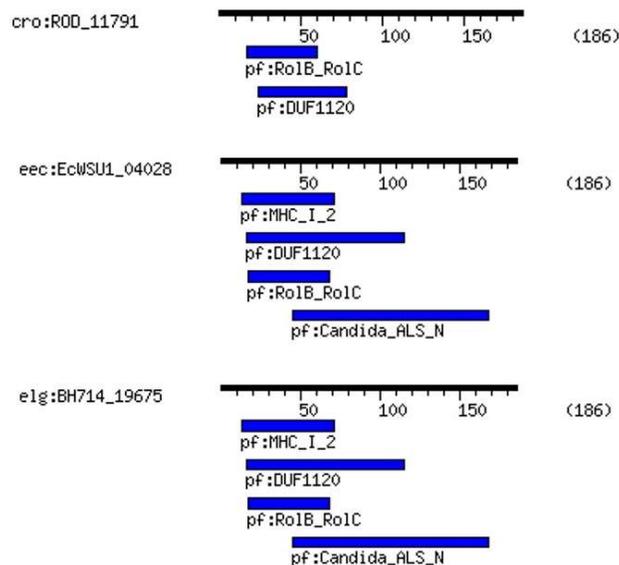
Los operones CU contienen al menos tres genes que codifican para las proteínas necesarias para el ensamblaje de la fimbria: una subunidad fimbrial, una chaperona y una proteína acomodadora o *usher*, ilustrados en rosa, azul y verde, respectivamente. Sin embargo, hay operones que contienen genes accesorios, como pueden ser otras subunidades fimbriales, chaperonas o reguladores transcripcionales. El gen *usher* es el único que se encuentra en una sola copia. De los 14 operones CU presentes en *C. rodentium* dos se encuentran localizados en plásmidos, *crf5* (ROD_p1161-1201) y ROD_p1291-1301.



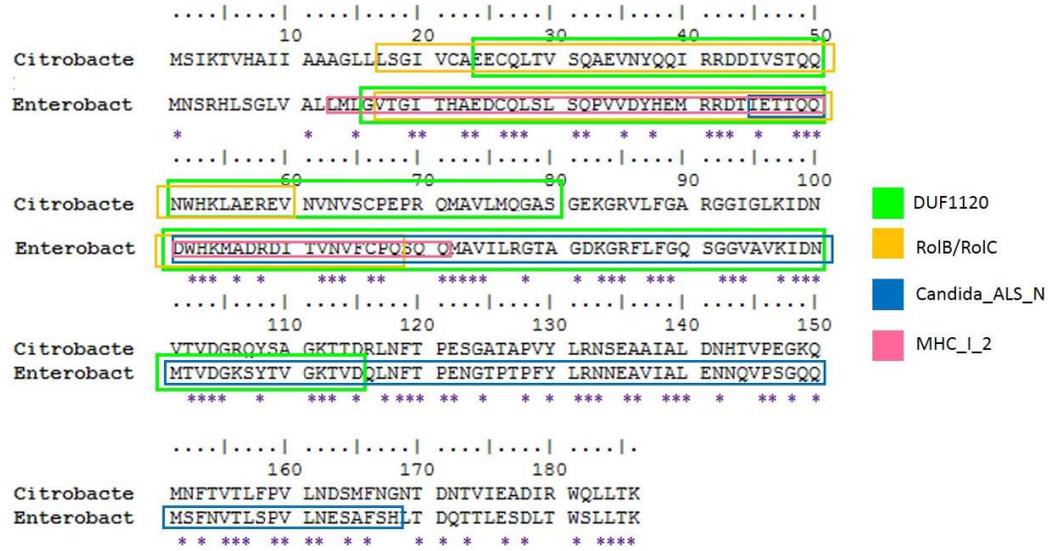
Anexo 2. Ortólogos del operón *pmf*. Los ortólogos más cercanos del operón *pmf* se encuentran en cepas del género *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Leclercia* y *Salmonella*. En la mayoría de los casos el gen ortólogo a *pmfC* (ROD_11791), se encuentra anotado también como proteína hipotética, a excepción del operón presente en *S. Typhimurium* con el que tiene mayor identidad, y donde este gen se encuentra anotado como posible subunidad fimbrial. También hay otros operones ortólogos, que incluyen a otros genes codificantes para proteínas hipotéticas e incluso para reguladores transcripcionales. La identidad entre las proteínas hipotéticas se ilustra sobre los recuadros.



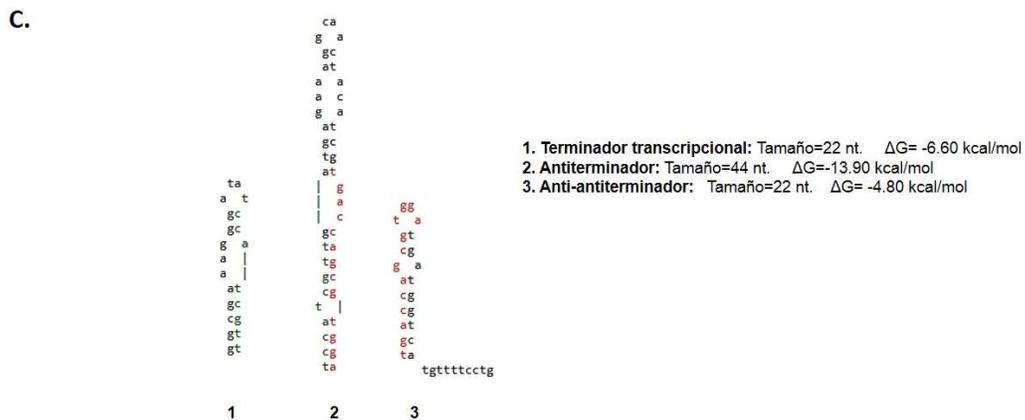
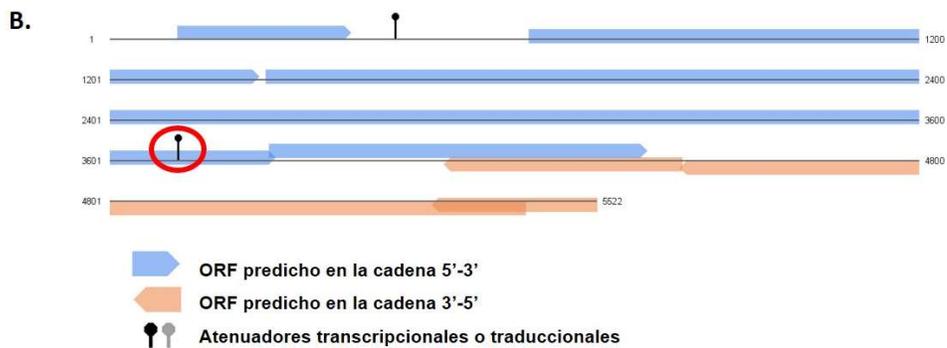
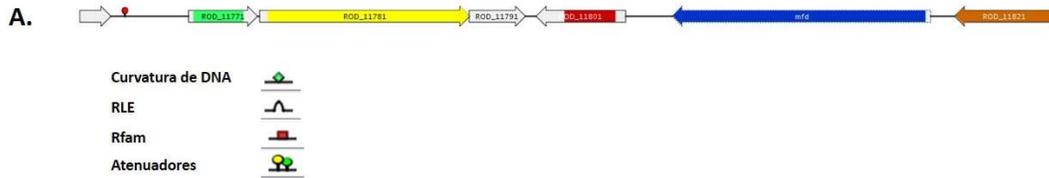
Anexo 3. Motivos presentes en la proteína hipotética *PmfC*. La proteína hipotética presenta dos motivos: un dominio de glucosilación RoIB_RoIC y DUF1120 de función desconocida. Otros genes que comparten ambos motivos se encuentran en las cepas de *Enterobacter ludwigii* EcWSU1 y EN-119. Adicionalmente, los genes presentes en *E. ludwigii* también incluyen un motivo MHC_I_2 y Candida_ALS_N.



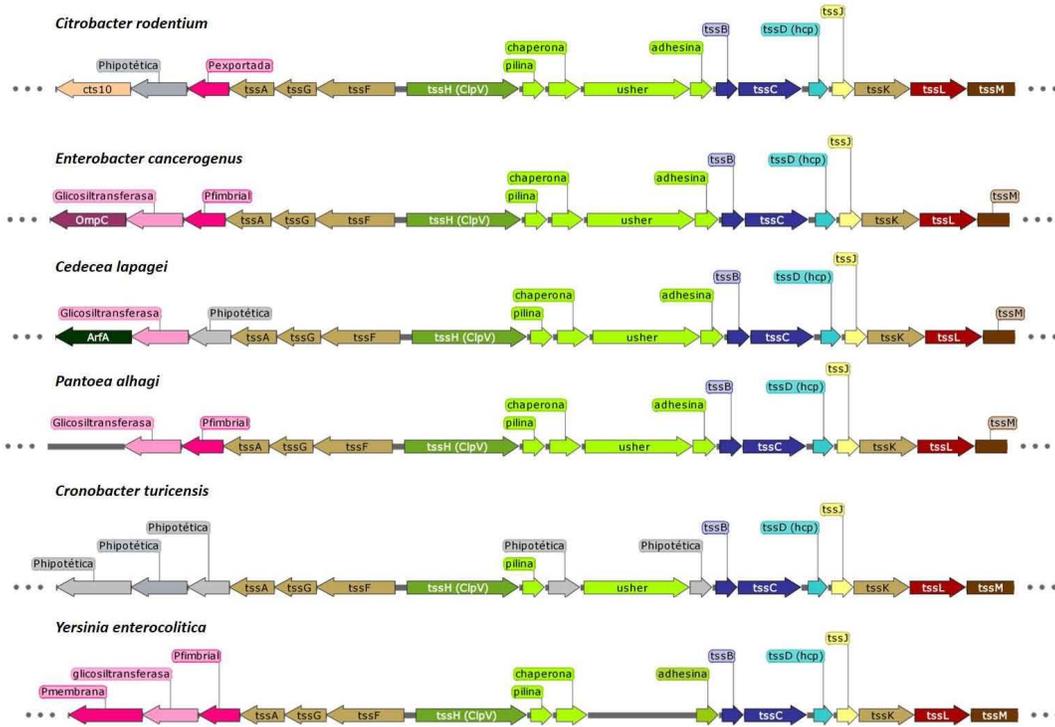
Anexo 4. Motivos presentes en la proteína hipotética PmfC (ROD_11791) de *C. rodentium* y en su ortólogo EcWSU1_04028 de *E. ludwigii*. PmfC y EcWSU1_04028 comparten los motivos DUF1120 y RoIb/RoIc ilustrados en color verde y naranja, respectivamente. Adicionalmente, Pfam identifica en EcWSU1_04028 los motivos Candida_ALS_N y MHC_I_2 ilustrados en azul y rosa, respectivamente; sin embargo, ambas proteínas tienen el mismo número de residuos (186), varios de ellos conservados (ilustrados con asteriscos morados), incluso en los motivos Candida_ALS_N y MHC_I_2, los cuales Pfam no anota para PmfC de *C. rodentium*.



Anexo 5. Búsqueda de elementos de regulación del operón *pmf*. A) Se utilizó la plataforma GeConT (Martínez-Guerrero *et al.*, 2008) la cual nos permite identificar curvaturas en el DNA, Ribosiwatches (RLE por sus siglas en inglés: “Ribosiwth like element”), familias de RNA’s (Rfam) y atenuadores transcripcionales y traduccionales pero ninguno de estos elementos se encontraron dentro del operón *pmf*. B) Se utilizó la plataforma RibEx (Abreu-Goodger y Merino, 2005) la cual nos permite identificar distintas familias de ribosiwatches, así como ORF’s y atenuadores. Se encontró un posible atenuador transcripcional en el gen del *usher* (círculo color rojo). C) Estructura del atenuador transcripcional encontrado en el gen *pmfB*.



Anexo 6. Ortólogos del operón *tsf*. El ortólogo más cercano al operón fimbrial *tsf* se encuentra en *Enterobacter cancerogenus*, pero también está presente en *Cedecea lapagei*, *Pantoea alhagi*, *Cronobacter turicensis* y *Yersinia enterocolitica* y en otros géneros bacterianos pero con menor identidad. En estas bacterias se conserva la estructura genómica del operón inserto en operones que contienen genes para un SST6. El operón *tsf* se ilustra en color verde mientras que los genes del SST6 conservan el código de color respecto al complejo que forman dentro del SST6 (Figura 10).



12. REFERENCIAS

- Abby, S., Cury, J., Guglielmini, J., Néron, B., Touchon, M. y Rocha, E. (2016). Identification of protein secretion systems in bacterial genomes. *Sci Rep* 6:23080.
- Abreu-Goodger, C. y Merino, E. (2005). RibEx: A web server for locating riboswitches and other conserved bacterial regulatory elements. *Nucleic Acids Research*, 33(SUPPL. 2), 690–692.
- 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.
- Anderson, M. C., Vonaesch, P., Saffarian, A., Marteyn, B. S., y Sansonetti, P. J. (2017). *Shigella sonnei* Encodes a Functional T6SS Used for Interbacterial Competition and Niche Occupancy. *Cell Host and Microbe*, 21(6), 769–776.e3.
- Aviv, G., Elpers, L., Mikhlin, S., Cohen, H., Zilber, S. V., Grassl, A. y Galmor, O. (2017). The plasmid-encoded lpf and klf fimbriae display different expression and varying roles in the virulence of *Salmonella enterica* serovar Infantis in mouse vs avian hosts, *PLoS Pathog* 13(8): e1006559.
- 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.
- Boyer, F., Fichant, G., Berthod, J., Vandenbrouck, Y., y Attree, I. (2009). Dissecting the bacterial type VI secretion system by a genome wide in silico analysis: what can be learned from available microbial genomic resources? *BMC Genomics.* 10:104.
- Bouladoux, N., Harrison, O. J. y Belkaid, Y. (2017). The Mouse Model of Infection with *Citrobacter rodentium*. *Current Protocols in Immunology.* 119: 19.15.1–19.15.25.
- Brodmann, M., Dreier, R. F., Broz, P., y Basler, M. (2017). *Francisella* requires dynamic type VI secretion system and ClpB to deliver effectors for phagosomal escape. *Nature Communications*, 8(May), 1–12.
- Busch, A. y Waksman, G. (2012). Chaperone-usheer pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Phil Trans R Soc B.* 367: 1112–1122.
- Busch, A., Phan, G., y Waksman, G. (2015). Molecular mechanism of bacterial type 1 and P pili assembly Subject Areas. *Phil.Trans.R.Soc.A* 373: 20130153.
- 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.

- Caballero, G., Croxen, M., Martinez, V., 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. M. (2003). Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157: H7. *Curr. Opin. Microbiol.* 6:82–90.
- Cascales, E., y Journet, L. (2016). The Type VI Secretion System in *Escherichia coli* and Related Species. *EcoSal Plus*, 7(1).
- Castang, S., McManus, H.R., Turner, K.H. y Dove, S.L. (2008). H-NS family members function coordinately in an opportunistic pathogen. *Proc Natl Acad SciUSA* 105:18947–18952.
- Cheng, C., Dong, Z., Han, X., Sun, J., Wang, H., Jiang, L. y Song, H. (2017). *Listeria monocytogenes* 10403S arginine repressor ArgR finely tunes arginine metabolism regulation under acidic conditions. *Frontiers in Microbiology*, 8(FEB), 1–12.
- Cianfanelli, F. R., Monlezun, L. y Coulthurst, S. J. (2006). Aim, load, fire: the type VI secretion system, a bacterial nanoweapon. *Trends Microbiol.* 24: 51–62.
- Chandrakesan, P., Roy, B., Jakkula, L. U., Ahmed, I., Ramamoorthy, P., Tawfik, O., Papineri, R., Houchen, C., Anant, S. y Umar, S. (2014). Utility of a bacterial infection model to study epithelial-mesenchymal transition, mesenchymal-epithelial transition or tumorigenesis. *Oncogene.* 33: 2639–2654.
- Chauhan, N., Wrobel, A., Skurnik, M., y Leo, J. C. (2016). Yersinia adhesins: An arsenal for infection. *Proteomics - Clinical Applications*, 10(9–10), 949–963.
- Chen, L., Zou, Y., She, P. y Wu, Y. (2015) .Composition, function, and regulation of T6SS in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Reserch.* 172: 19-25.
- 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. W., Keeney, K. M., Crepin, V. F., Rathinam, V. a K., Fitzgerald, K. a, Finlay, B. B., y Frankel, G. (2014). *Citrobacter rodentium*: infection, inflammation and the microbiota. *Nat Rev Microbiol*, 12(9), 612–623.
- Connolly, J. P., Finlay, B. B., y Roe, A. J. (2015). From ingestion to colonization: the influence of the host environment on regulation of the LEE encoded type III secretion system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Front. Microbiol.* 6:568.

- Crossman, L., Chaudhuri, R., Beatson, S., Wells, T., Desvaux, Cunningham, F., Petty, K., Mahon, V., Brinkley, C., Hobman, J., Savarino, S., Turner, S., Pallen, M., Penn, C., Parkhill, J., Turner, K., Johnson, T., Thomson, N., Smith, S., y Henderson, I. (2010). A commensal gone bad: complete genome sequence of the prototypical enterotoxigenic *Escherichia coli* strain H10407. *J Bacteriol* 192: 5822–5831.
- Dame, R.T., Wyman, C. y Goosen, N. (2000). H-NS mediated compaction of DNA visualised by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Res.* 28, 3504–3510
- 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.
- De Grado, M., Abe, A., Gauthier, A., Steele-Mortimer, O., DeVinney, R., y Finlay B. B. (1999). Identification of the intimin-binding domain of Tir of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 1:7–17.
- Decoin, V., Barbey, C., Bergeau, D., Latour, X., Feuilloley, M. G. J., y Orange, N. (2014). A type VI secretion system is involved in *Pseudomonas fluorescens* bacterial competition. *PLoS One.* 9: e89411.
- Deng, W., Li, Y., Vallance, B. A., y Finlay, B. 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., Puente, J. L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B. A., y Vázquez, A. (2004). Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101: 3597–3602.
- Deng, W., Li, P. R. Hardwidge, E. A. Frey, R. A. Pfuetzner, S. Lee, S. Gruenheid, Strynacka 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.
- Deng, W., de Hoog, C. L., Yu, H. B., Li, Y., Croxen, M. A., Thomas, N. A., Puente, J. L., Foster, L. J y Finlay, B. B (2010). A comprehensive proteomic analysis of the type III secretome of *Citrobacter rodentium*. *J. Biol. Chem.* 285: 6790–6800.
- Deng, W., Yu, H. B., de Hoog, C. L., Stoyanov, N., Li, Y., Foster, L. J., y Finlay B. B. (2012). Quantitative proteomic analysis of type III secretome of enteropathogenic *Escherichia coli* reveals an expanded effector repertoire for attaching/effacing bacterial pathogens. *Mol. Cell. Proteom.* 11: 692–709.
- Dorman, C. J., Hinton, J. C. D. y Free, A. (1999). Domain organization and oligomerization among H-NS-like nucleoid-associated proteins in bacteria. *Trends Microbiol* 7, 124–128.

- Du, Y., Rosqvist, R. y Forsberg, A., (2002). Role of fraction 1 anti- gen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infect. Immun.* 70, 1453–1460.
- Dufresne, K., Saulnier-Bellemare, J., y Daigle, F. (2018). Functional Analysis of the Chaperone-Usher Fimbrial Gene Clusters of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8.
- Eijkelkamp, B.A., Stroehler, U.H., Hassan, K.A., Elbourne, L.D., Paulsen, I.T. y Brown, M.H. (2013). H-NS plays a role in expression of *Acinetobacter baumannii* virulence features. *Infect Immun* 81:2574–2583.
- Estruch, J.J., Chriqui, D., Grossmann, K., Schell, J. y Spena, A. (1991). The plant oncogene rolC is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates. *EMBO J*; 10:2889-2895.
- Estruch, J.J., Schell, J. y Spena, A. (1991b). The protein encoded by the rolB plant oncogene hydrolyses indole glucosides. *EMBO J*; 10:3125-3128.
- Falconi, M., Brandi, A., La Teana, A., Gualerzi, C.O. y Pon, C.L. (1996). Antagonistic involvement of FIS and H-NS proteins in the transcriptional control of *hns* expression. *Mol. Microbiol.*, 19, 965–975.
- Felek, S., Jeong, J. J., Runco, L. M., Murray, S., Thanassi, G. y Krukons, E. (2011). Contributions of chaperone/usher systems to cell binding, biofilm formation and *Yersinia pestis* virulence. *Microbiology*.157, 805–818.
- Filutowicz, M., Ross, W., Wild, J. y Gourse, R.L. (1992). Involvement of FIS protein in replication of the *Escherichia coli* chromosome. *J. Bacteriol.*, 174, 398–407.
- 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. D., Rosenshine, I., Dougan, G., Kaper, J. B., y Knutton, S. (1998). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: More subversive elements. *Mol Microbiol.* 30: 911–921.
- Frankel, G. y Phillips, A. D. (2008). Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cell Microbiol.* 10:549–556.
- Free, A., Williams, R.M., y Dorman, C.J. (1998). The StpA protein functions as a molecular adapter to mediate repression of the *bgl* operon by truncated H-NS in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180: 994–997.
- 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.

Galyov, E. E., OYu, S., Karlishev, A. V., Volkovoy, K., Denesyuk, A.I., Nazimov, I.V., Rubtsov, K.S., Abramov, V.M., Dalvadyanz, S.M. y Zav'yalov, V.P. (1990). Nucleotide sequence of the *Yersinia pestis* gene encoding F1 antigen and the primary structure of the protein. Putative T and B cell epitopes. FEBS Lett: 277, 230–232.

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.

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

Grainger, D. C. (2016). Structure and function of bacterial H-NS protein. Biochemical Society Transactions, 44(6), 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. U.S.A. 87 4645-9.

González-Gil, G., Kahmann, R., y Muskhelishvili, G. (1998). Regulation of *crp* transcription by oscillation between distinct nucleoprotein complexes. EMBO Journal, 17(10), 2877–2885.

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.

Hahn, E., Wild, P., Hermanns, U. Sebbel, P., Glockshuber, R., Häner, M., Taschner, N., Burkhard, P., Aebi, U. y Müller, S. (2002). Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 pili. J Mol Biol 323: 845–857.

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.

Hengge R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. Nat Rev Microbiol; 7(4):263–73. Epub

Higgins, L. M., Frankel, G., Connerton, I., Goncalves, N. S., Dougan, G y MacDonald, T. T. (1999). Role of bacterial intimin in colonic hyperplasia and inflammation. Science 285:588–591.

Holden, N., Blomfield, I.C., Uhlin, B.E., Totsika, M., Kulasekara, D.H. y Gally, D.L. (2007). Comparative analysis of FimB and FimE recombinase activity. Microbiology 153:4138–4149.

Iguchi, A., Thomson, N., Ogura, Y., Saunders, D., Ooka, T., Henderson, I.R., Harris, D., Asadulghani, M., Kurokawa, K., Dean, P., Kenny, B., Quail, M.A.,

- Thurston, S., Dougan, G., Hayashi, T., Parkhill, J. y Frankel, G. (2009) Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *J Bacteriol* 191: 347–354.
- Jani, A. J. y Cotter, P. A. (2010). Type VI secretion: not just for pathogenesis anymore. *Cell Host Microbe*. 8:2–6.
- 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.
- Jones, G. W., y R. E. Isaacson. (1983). Proteinaceous bacterial adhesins and their receptors. *Crit. Rev. Microbiol*. 10:229–260.
- Keeney, K.M., Yurist-Doutsch, S., Arrieta, M.C., Finlay, B.B. (2014) Effects of antibiotics on human microbiota and subsequent disease. *Annu Rev Microbiol* 68:217–235.
- Korea, C.G., Ghigo, J. M., y Beloin, C. (2011). The sweet connection: solving the riddle of multiple sugar-binding fimbrial adhesins in *Escherichia coli*: multiple *E. coli* fimbriae form a versatile arsenal of sugar-binding lectins potentially involved in surface colonisation and tissue tropism. *BioEssays*. 33: 300–311.
- Kuan, L., Schaffer, J., Zouzias, C., Pearson, 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*. *Cellular Microbiology*, 15(11), 1796–1808.
- Le Bihan, G., Sicard, J.-F., Garneau, P., Bernalier-Donadille, A., Gobert, A. P., Garrivier, A. y Jubelin, G. (2017). The NAG Sensor NagC Regulates LEE Gene Expression and Contributes to Gut Colonization by *Escherichia coli* O157:H7. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1–10.
- Levin, M., Bergquist, E., Nalin, D., Waterman, D., Hornick, R., Yung, C. y Sotman, S. (1978). *Escherichia coli* strains that cause diarrhea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* 1: 1119-1122.
- 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.

- Lin, J., Zhang, W., Cheng, J., Yang, X., Zhu, K., Wang, Y., Shen, X. (2017). A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. *Nature Communications*, 8, 1–12.
- Linder, T. y Gustafsson, C.M. (2007). Molecular phylogenetics of ascomycotal adhesins-A novel family of putative cell-surface adhesive proteins in fission yeasts. *Fungal Genet Biol.*
- Lindler, L. E. y Tall, B. D. (1993). *Yersinia pestis* pH 6 antigen forms fimbriae and is induced by intracellular association with macrophages. *Mol. Microbiol.* 8, 311–324.
- Løbner-Olesen, A., Skovgaard, O., y Marinus, M. G. (2005). Dam methylation: Coordinating cellular processes. *Current Opinion in Microbiology*, 8(2), 154–160.
- 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.
- Luo, Y., Frey, E.A., Pfuetzner, R.A., Creagh, A.L., Knoechel, D.G., Haynes, C.A., et al. (2000). Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimina receptor complex. *Nat.* 405: 1073–1077.
- Luperchio, S. A. and Schauer, D. B. (2001). Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia. *Microbes Infect.* 3: 333–340.
- Ma, S., Narberhaus, F., y Lai, E. (2012). IcmF family protein TssM exhibits ATPase activity and energizes type VI secretion. *J. Biol. Chem.* 287, 15610–15621.
- Mallick, E. M., McBee, M. E., Vanguri, V. K., Melton-Celsa, A. R., Schlieper, K., Karalius, B. J. and Schauer, D. B. (2012). A novel murine infection model for Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation.* 122: 4012–4024.
- Martinez-Santos, V., Medrano-Lopez, A., Saldana, Z., Giron, 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.
- Martinez-Guerrero, C. E., Ciria, R., Abreu-Goodger, C., Moreno-Hagelsieb, G., y Merino, E. (2008). GeConT 2: gene context analysis for orthologous proteins, conserved domains and metabolic pathways. *Nucleic Acids Research*, 36(Web Server issue), 176–180.
- 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.

Nataro, J. P. y Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11: 142-201.

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

O'Loughlin, E. V. and Robins-Browne, R. M. (2001). Effect of Shiga toxin and Shiga-like toxins on eukaryotic cells. *Microbes Infect.* 3(6):493–507.

Papapietro, O., Teatero, S., Thanabalasuriar, A., Yuki, K., Diez, E., Zhu, L., Kang, E., Dhillon, S., Muise, A., Durocher, Y., Marcinkiewicz, M., Malo, D. y Gruenheid, S. (2013). R-spondin 2 signalling mediates susceptibility to fatal infectious diarrhoea. *Nat. Commun.* 4: 1898.

Patel, S. (2016). The urgency of annotating pathogen hypothetical genes, *Gene Reports*, 4: 233–234.

Patel, S., Mathivanan, N., y Goyal, A. (2017). Bacterial adhesins, the pathogenic weapons to trick host defense arsenal. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 93: 763–771.

Perna, N., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D, Rose, D., Mayhew, G., Evans, P., Gregor, J., Kirkpatrick, H., Pósfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E., Davis, N., Lim, A., Dimalanta, E., Potamousis, K., Apodaca, J., Anantharaman, T., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D., Welch, R., Blattner, F.. (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 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.

- 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.
- Raivio, T.L. y Silhavy, T.J. (1999). The sigmaE and Cpx regulatory pathways: overlapping but distinct envelope stress responses. *Curr Opin Microbiol* 2:159–165.
- Renzi, F., Rescalli, E., Galli, E. y Bertoni, G. (2010). Identification of genes regulated by the MvaT-like paralogues TurA and TurB of *Pseudomonas putida* KT2440. *Environ Microbiol* 12:254–263.
- Russell, A.B. et al. (2011) Type VI secretion delivers bacteriolytic effectors to target cells. *Nature* 475, 343–347.
- Russell, A.B. et al. (2013). Diverse type VI secretion phospholipases are functionally plastic antibacterial effectors. *Nature* 496, 508–512.
- Sauer, F., Fütterer, K., Pinkner, J.S., Dodson, K., Hultgren, S. y Waksman G. (1991). Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis. *Science* 285, 1058–1061.
- Salomon, D., Klimko, J.A. y Orth, K. (2014). H-NS regulates the *Vibrio parahaemolyticus* type VI secretion system 1. *Microbiology* 160:1867–1873.
- Schauer, D. B., y S. Falkow. (1993). Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect. Immun.* 61: 2486–2492.
- Schmidt, M. (2010). LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell Microbiol* 12: 1544–1552.
- Shneider, M., Buth, S., Ho, B., Basler, M. y Mekalanos, J. (2013). PAAR-repeat proteins sharpen and diversify the type VI secretion system spike. *Nature* 500, 350-353.
- 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.
- Scott, N.W. y Harwood, C.R. (1980) Studies on the influence of the cyclic AMP system on major outer membrane proteins of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 9, 95–98.
- 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.

- Stone, K., Zhang, H-Z., Carlson, L. y Donnenberg, M. (1996). A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Mol Microbiol* 20: 325–337.
- Tan, J., Wilksch, J., Hocking, D., Wang, N., Srikhanta, Y., Tauschek, M., Lithgow, T., Robins-Browne, R.M., Yang, J., Strugnell, R.A. (2015). Positive auto-regulation of mrkHI by the c-di-GMP-dependent MrkH protein in the biofilm regulatory circuit of *Klebsiella pneumoniae*. *J Bacteriol*. Epub 2015/03/04. JB.02615-14 [pii] doi: 10.1128/JB.02615-14 PMID:25733612.
- Tashiro, Y., Yawata, Y., Toyofuku, M., Uchiyama, H., Nomura, N. (2013). Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. *Microbes Environ*. 28:13–24.
- Thanassi, G., Stathopoulos, C., Dodson, K., Geiger, D., y Hultgren, S. J. (2002). Bacterial outer membrane ushers contain distinct targeting and assembly domains for pilus biogenesis. *Journal of Bacteriology*, 184(22), 6260–6269.
- Tobe, T., Beatson, S. A., Taniguchi, H., Abe, H., Bailey, C. M., Fivian, A., Younis, R., Matthews, S., Marches, O., Frankel, G. (2006). An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc Natl Acad Sci*. 103: 14941–14946.
- Torres, A., López-Sánchez, G., Milflores-Flores, L., Patel, S., Rojas- López, M., Martínez de la Pena, C., Arenas-Hernández, M., 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.
- Ullmann, A. y Danchin, A. (1983). Role of cyclic AMP in bacteria. *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, 15, 1–53.
- Ueguchi, C., Ohta, T., Seto, C., Suzuki, T. y Mizuno, T. (1998). The leuO gene product has a latent ability to relieve bgl silencing in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 180, 190–193.
- Vogt, S., Acosta, N., Wong, J., Wang, J.S. y Raivio, T. (2012). The CpxAR two-component system regulates a complex envelope stress response in Gram-negative bacteria, p 231–267. In Gross R, Beier D (ed), *Two-component systems in bacteria*. Caister Academic Press, Norfolk, United Kingdom.
- Waksman, G. y Hultgren, S. J. (2009). Structural biology of the chaperone–usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 7: 765–774.
- Wan, B., Zhang, Q., Ni, J., Li, S., Wen, D., Li, J., y Yao, Y. F. (2017). Type VI secretion system contributes to Enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence by secreting catalase against host reactive oxygen species (ROS). *PLoS Pathogens*, 13(3), 1–28.

Welch, R., Burland, V., Plunkett, G., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E., Liou, S., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G., Rose, D., Zhou, S., Schwartz, D., Perna, N., Mobley, H., Sonnenberg, M. y Blattner, F. (2002) Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 99: 17020–17024.

Wilksch, J., Yang, J., Clements, A., Gabbe, J.L., Short, K.R., Cao, H., Cavaliere, R., James, C., Whitchurch, C., Schembri, M., Chuah, M., Liang, Z., Wijburg, O., Jenney, A., Lithgow, T. y Strugnell, R. (2011) MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. PLoS Pathog. 7(8):e1002204. Epub 2011/09/09.

Wurpel, D. J., Beatson, S. A., Totsika, M., Petty, N. K., Schembri, M. A. (2013). Chaperone-usher fimbriae of *Escherichia coli*. PLoS One 8:e52835.

Xicohtencatl-Cortes, J., Monteiro-Neto, V., Ledesma, M. A., Jordan, D. M., Francetic, O., Kaper, J. B. (2007). Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J. Clin. Invest. 117: 3519–3529.

Xiong, L., Teng, J. L., Watt, R. M., Liu, C., Lau, S. K., y Woo, P. C. (2015). Molecular characterization of arginine deiminase pathway in *Laribacter hongkongensis* and unique regulation of arginine catabolism and anabolism by multiple environmental stresses. Environ. Microbiol. 17, 4469–4483. doi: 10.1111/1462-2920.12897.

Xu, J. y Johnson, R.C. (1995). Identification of genes negatively regulated by FIS: FIS and RpoS comodulate growth-phase dependent gene expression in *Escherichia coli*. J. Bacteriol., 177, 938–947.

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.

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

Zav'yalov, V. P., Chernovskaya, T. V., Navolotskaya, E. V., Karlyshev, A. V., MacIntyre, S., Vasiliev, A.M. y Abramov, V.M. (1995). Specific high affinity binding of human interleukin 1 α by Caf1A usher protein of *Yersinia pestis*. FEBS Lett. 371, 65–68.

Zav'yalov, V., Zavialov, A., Zav'yalova, G. y Korpela, T., (2009). Adhesive organelles of Gram-negative pathogens assembled with the classical chaperone/usher machinery: structure and function from a clinical standpoint. FEMS Microbiol. Rev. 34, 317–378.

Zhang, W., Zhao, M., Ruesch, L., Omot, A. y Francis, D. (2007). Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol* 123: 145–152.

Zhang, J., Xiao, J., Zhang, Y., Cui, S., Liu, Q., Wang, Q., Wu, H. y Zhang, Y. (2014). A new target for the old regulator: H-NS suppress T6SS secretory protein EvpP, the major virulence factor in the fish pathogen *Edwardsiella tarda*. *Lett Appl Microbiol* 59:557–564.

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

Zou, Z., Nomura, M., Takihara, Y., Yasunaga, T. y Shimada, K. (1996). Isolation and characterization of retinoic acid-inducible cDNA clones in F9 cells: a novel cDNA family encodes cell surface proteins sharing partial homology with MHC class I molecules. *J Biochem* 119:319-328.

Zoued, A., Durand, E., Brunet, Y. R., Spinelli, S., Douzi, B., Guzzo, M., Flaugnatti, N., Legrand, P., Journet, L., Fronzes, R., Mignot, T., Cambillau, C. y Cascales, E. (2016). Priming and polymerization of a bacterial contractile tail structure. *Nature* 531, 59–63.