



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Análisis de la función y regulación del operón fimbrial *gcfFGABCDE*
de *Citrobacter rodentium*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

Gustavo Gilberto Caballero Flores

TUTOR PRINCIPAL:

José Luis Puente García (Instituto de Biotecnología-UNAM)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dimitris Georgellis (Instituto de Fisiología Celular-UNAM)
David Romero Camarena (Centro de Ciencias Genómicas-UNAM)

MÉXICO, D. F. Febrero, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

“ARRÓJATE EN LOS BRAZOS DEL MUNDO Y EL AIRE TE SUJETARÁ.
DUDA Y EL MUNDO TE SALTARÁ POR DETRÁS”

PAUL AUSTER (“TOMBUCTÚ”)

DEDICATORIA

A mi papá por enseñarme con sus acciones el valor de la humildad y del esfuerzo. A mi mamá por esa confianza infinita en mi persona y por apoyar siempre cada una de mis locuras.

A mis hermanos: Deysi, a quien admiraré siempre por su coraje, determinación y fortaleza; Paty, mi gemelita querida, por celebrar conmigo cada éxito y por reconfortarme en los tropiezos; y Zuriel, mi administrador favorito, a quien le confiaría no solo mi empresa, sino la vida misma.

A mis sobrinos: Edgar, Fer e Ireri por contagiarme siempre de su inocencia; y Ángel, por considerarme un amigo antes que su tío.

A mi nueva familia, Leonor, Jaime, Ulises y Diana, por hacerme parte de sus vidas y por juzgarme por una sola cosa: por cuánto amo a su pequeña Violeta.

Al Dr. José Luis Puente García, un excelente jefe y mejor persona, gracias por confiar en mí y por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo. Nunca olvidaré esas charlas de “cinco minutos” en su oficina que al final se convertían en horas llenas de discusión, ideas y sugerencias, pero también de consejos, risas y votos de confianza.

A todos mis compañeros del laboratorio Calva-Puente: Abraham, Ale, Amapola, Carmen, Claudia Paredes, Claudia Silva, Crispín, Deyanira, Diego, Edmundo, Emilio, Emma, Esteban, Gerardo, Haydee, Inés, Ismael, Lili, Lore, Lucía, Magda, Marcos, Mario, Pancho, Ramón, Rebeca, Richard, Rosalva, Rubiceli, Vero, Victor Bustamante y Víctor Osio. Por toda su ayuda y por hacer de mi estancia en el laboratorio toda una experiencia de vida y aprendizaje.

A todos mis amigos del IBT: a Josué, Oscar “Chu”, Omar “la mamá” y Emiliano, por tantas pláticas y risas durante aquellas interminables horas de comida; a mis amigos pamboleros de los equipos de fútbol “Poder del Northern”, “Selección Natural” y “Timbarrel”, sin duda extrañaré compartir la cancha con ustedes; y a mis amigos deportistas de la clase de defensa personal que sufrieron conmigo tantos ejercicios de “calentamiento”.

Y finalmente, a la mujer que entró sin permiso a mi ordenada vida para convertirla en un viaje sin regreso con la felicidad como único destino. Contigo a mi lado se que podría conquistar el mundo entero, o no hacerlo, y nada cambiaría. Gracias por compartir conmigo tus horas, sueños, dudas y anhelos, y por brindarme esa calma de la que tantas veces adolezco...

“Porque lo único que no se compra en la tierra es la vida. Entonces hay que ser avaro en la forma de gastarla” (José Mújica)... Y porque mi vida, la quiero compartir contigo. Te amo Viol.

AGRADECIMENTOS

Un enorme agradecimiento a los miembros de mi comité tutorial, Dimitris Georgellis y David Romero, por todos sus comentarios y observaciones que hicieron de este un mejor trabajo. Igualmente a mis sinodales Susana López, Bertha González, Cinthia Núñez, Jesús Silva y Adrián Ochoa por darse el tiempo de leer esta tesis y por sus comentarios que fortalecieron su escritura.

También agradezco a Lucía Perezgasga, Marcos Fernández, Alejandra Vázquez y Francisco J. Santana Estrada por el apoyo técnico brindado para la realización de este trabajo.

Por otro lado, quiero agradecer enormemente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (232554) para la realización de mis estudios de doctorado, así como a la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA-IN209713) y al CONACyT (154287 y 239659) por los donativos otorgados para el desarrollo del presente proyecto.

Finalmente, agradezco al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM) por los recursos económicos otorgados que me permitieron presentar los avances de mi proyecto en los siguientes congresos:

- “Análisis de la expresión y función del operón *cfbABCDE* de *Citrobacter rodentium*” **Caballero-Flores, G.**, Martínez-Cruz, V. y Puente, J. L. III Congreso de la Rama de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias. 3 al 7 de octubre del 2013. Cuatro Ciénegas, Coahuila.
- “Regulation and functional analysis of the *gcf* fimbrial operon of *Citrobacter rodentium*”. **Caballero-Flores, G.**, Croxen, M. C., Martínez-Santos, V., Bustamante, V. H., Finlay, B. B. y Puente, J. L. Molecular Genetics of Bacteria and Phages Meeting 2014. 5 al 9 de agosto del 2014. Madison, E.U.A.
- “Identification and regulation of a novel *Citrobacter rodentium* gut colonization fimbriae (Gcf)” **Caballero-Flores, G. G.**, Croxen, M. A., Martínez-Santos, V. I., Finlay, B. B. y Puente, J. L. 6th Congress of European Microbiologists. 7 al 11 de junio del 2015. Maastricht, Holanda.
- “Identification and regulation of a novel *Citrobacter rodentium* gut colonization fimbria (Gcf)”. **Caballero-Flores, G. G.**, Croxen, M. A., Martínez-Santos, V. I., Finlay, B. B. y Puente, J. L. IV Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias. 4 al 8 de octubre del 2015. Atlixco, Puebla.

EL DESARROLLO DEL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO #2 DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, BAJO LA ASESORÍA DEL Dr. JOSÉ LUIS PUENTE GARCÍA Y COMO PARTE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS DE LA MISMA UNIVERSIDAD.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS.....	4
ABSTRACT.....	11
RESUMEN	12
1.- INTRODUCCIÓN	13
1.1.-Patógenos A/E	13
1.2.-La isla de patogenicidad LEE.....	16
1.3.- <i>Citrobacter rodentium</i> como modelo de estudio.....	17
1.4.- Fimbrias	18
1.4.1- Concepto	18
1.4.2.- Clasificación	19
1.4.3.- Fimbrias chaperona/usher	21
1.4.3.1-Concepto.....	21
1.4.3.2.- Ensamblaje.....	21
1.4.3.3- Subclasificación.....	23
1.4.3.4- Regulación.....	24
1.5.- Regulación negativa por H-NS.....	27
2.- ANTECEDENTES	29
2.1.- Factores de virulencia de <i>C. rodentium</i>	29
2.2.- Operones fimbriales en <i>C. rodentium</i>	32
2.3.- Las fimbrias CFC y Kfc	33
2.4.- El operón <i>gcfFGABCDE</i>	34
3.- JUSTIFICACIÓN.....	35
4.- HIPÓTESIS	36
5.- OBJETIVOS.....	36

6.- MATERIALES Y MÉTODOS	37
6.1.- Cepas y condiciones de crecimiento.....	37
6.2.- Técnicas de manipulación de ADN.....	37
6.3.- Oligonucleótidos y reacciones en cadena de la polimerasa (PCR).....	39
6.4.- Construcción de fusiones transcripcionales	43
6.5.- Obtención de cepas mutantes y etiquetadas	44
6.6.- Ensayos de actividad de la cloranfenicol acetil-transferasa (CAT)	45
6.7.- Mutagénesis sitio dirigida.....	46
6.8.- Extracción de ARN y “RT-PCR”	46
6.9.- “Primer extension” y secuenciación tipo “Sanger”.....	47
6.10.- Ensayos de “Western blot”	48
6.11.- Purificación de la proteína H-NS-MycHis y ensayos de retardo en la movilidad electroforética (“EMSA”).....	49
6.12.- Ensayos de colonización en ratón	50
6.13.- Detección de bioluminiscencia bacteriana en ratones infectados	52
7.-RESULTADOS	54
APARTADO I.- ANÁLISIS FUNCIONAL DE Gcf.....	54
7.1.- La fimbria Gcf es importante durante las etapas tempranas del proceso de colonización en ratón.....	54
7.2.- La cinética de colonización de <i>C. rodentium</i> es dosis-dependiente.	56
APARTADO II.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL OPERON <i>gcf</i>	58
7.3.- El operón <i>gcf</i> se expresa en niveles bajos en <i>C. rodentium</i>	58
7.4.- La expresión del operón <i>gcf</i> es reprimida por H-NS y se regula diferencialmente por el medio de cultivo en <i>E. coli</i> K12.....	61
7.5.- <i>C. rodentium</i> expresa cinco proteínas homólogas a H-NS.....	62

7.6.- La expresión del operón <i>gcf</i> es reprimida por H-NS1 y se regula diferencialmente por el medio de cultivo en <i>C. rodentium</i>	64
7.7.- Identificación de las regiones promotoras de <i>gcf</i>	66
7.8.- Identificación del promotor <i>gcfF-P1</i>	68
7.9.- Los genes <i>gcf</i> se transcriben como operón a partir de la región promotora de <i>gcfF</i>	74
7.10.- H-NS se une a la región reguladora río arriba de <i>gcfF</i>	75
APARTADO III.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL OPERÓN <i>gcf</i> DENTRO DEL HOSPEDERO	77
7.11.- El operón <i>gcf</i> se expresa dentro del ratón durante el proceso de infección por <i>C. rodentium</i>	77
7.12.- El operón <i>gcf</i> se expresa específicamente en el colon del ratón durante el proceso de infección por <i>C. rodentium</i>	79
8.- DISCUSIÓN	81
9.- PERSPECTIVAS	88
10.- BIBLIOGRAFÍA	89
11.- ANEXO I.- ARTÍCULOS PUBLICADOS Y COLABORACIONES	96
12.- ANEXO II.- PREMIOS Y RECONOCIMIENTOS	119

ÍNDICE DE FIGURAS

1.- INTRODUCCIÓN

Figura 1.- Lesión A/E característica provocada por <i>C. rodentium</i>	13
Figura 2.- Modelo esquemático del mecanismo de infección por patógenos A/E.	14
Figura 3.- Organización genética de la isla de patogenicidad LEE	15
Figura 4.- Las fimbrias BFP y Lpf.....	18
Figura 5.- Vía de ensamblaje fimbrial tipo Chaperona/Usher.	22

Figura 6.- Clasificación de los operones fimbriales chaperona/usher. 23

Figura 7.- Mecanismos de silenciamiento génico por H-NS..... 28

2.- ANTECEDENTES

Figura 8.- Papel en colonización del operón fimbrial *kfcHGFEDC*..... 33

Figura 9.- Operón fimbrial *gcfFGABCDE* de *C. rodentium*..... 34

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 10.- Fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*. 42

7.- RESULTADOS

APARTADO I.- ANÁLISIS FUNCIONAL DE Gcf

Figura 11.- Ensayos de colonización en ratón con la mutante $\Delta gcfA::Km$ 54

Figura 12.- Efecto de la concentración del inóculo en la cinética de colonización por *C. rodentium*. 56

APARTADO II.- REGULACIÓN DE LA EXPRESION DEL OPERON *gcf*

Figura 13.- Expresión del operón *gcf* en un fondo de *E. coli* K12 $\Delta hns::Km$... 61

Figura 14.- Expresión de los homólogos de H-NS identificados en *C. rodentium*..... 63

Figura 15.- Expresión del operón *gcf* en los fondos mutantes en los genes ortólogos de *hns* de *C. rodentium*..... 65

Figura 16.- Identificación de regiones promotoras en el operón *gcf*..... 67

Figura 17.- Predicción *in silico* del promotor *gcfF-P1* 68

Figura 18.- Determinación de la región mínima reguladora del promotor *gcfF-P1* 71

Figura 19.- Ensayos de “Primer extensión” para los promotores *gcfF-P1* y *gcfF-P2*. 71

Figura 20.- Mutagénesis del promotor *gcfF-P1*..... 72

Figura 21.- Análisis por “RT-PCR” de la organización transcripcional de *gcf*. 74

Figura 22.- Ensayos de unión de H-NS a la región reguladora de <i>gcfF</i>	75
APARTADO III.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL OPERÓN <i>gcf</i> DENTRO DEL HOSPEDERO	
Figura 23.- Determinación de la expresión de <i>gcf</i> dentro del hospedero.....	77
Figura 24.- Determinación de la expresión de <i>gcf</i> en el tracto gastrointestinal del ratón.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

1.- INTRODUCCIÓN

Tabla 1.- Mecanismos comunes de regulación de fimbrias chaperona/usher....	25
--	----

2.- ANTECEDENTES

Tabla 2.- Factores de virulencia, no relacionados a LEE, de <i>C. rodentium</i>	31
Tabla 3.- Operones fimbriales identificados en <i>C. rodentium</i>	32

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 4.- Cepas y plásmidos utilizados.....	37
Tabla 5.- Oligonucleótidos empleados.....	39

7.- RESULTADOS

APARTADO II.- REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL OPERÓN *gcf*

Tabla 6.- Expresión del operón <i>gcfFGABCDE</i> en <i>C. rodentium</i> silvestre.....	58
Tabla 7.- Proteínas homólogas a H-NS identificadas en <i>C. rodentium</i>	62

ABSTRACT

Citrobacter rodentium is a mouse pathogen that is used as a model for studying the human pathogens enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, for which there is no animal model of disease. These three bacteria adhere to the host intestinal epithelium by means of surface structures termed fimbria and then inject effector proteins through a type III secretion system, leading to the formation of attaching and effacing lesions. Although *C. rodentium* has 19 fimbrial operons, their role during the infectious process has only been studied for three of them. Here, we identified and characterized a novel *C. rodentium* virulence factor termed gut colonization fimbria (Gcf) that is required by the bacterium for the efficient colonization of the mouse gastrointestinal tract. Gcf is encoded by the fimbrial operon *gcfFGABCDE* and was transcribed from a promoter starting transcription 158 bp upstream of the start codon of *gcfF*. This promoter was not active in wild type *C. rodentium* under several *in vitro* growth conditions that sustain the expression of other fimbrial operons; however, it was readily expressed in a *C. rodentium* Δ *hns1* mutant lacking the closest ortholog of the *E. coli* histone-like nucleoid structuring protein (H-NS), but not in mutants of the other four genes encoding H-NS homologs. EMSA experiments showed that H-NS binds to the regulatory region of *gcf*, further supporting its direct role as a repressor of the *gcf* operon. Interestingly, even in the absence of H-NS1, the *gcf* promoter was differentially expressed in response to the growth medium, suggesting that a second H-NS-independent regulatory mechanism modulates *gcf* expression. In addition, despite being poorly expressed under *in vitro* growth conditions, the *gcf* promoter was expressed within the mouse gastrointestinal tract during the infectious process, suggesting that its expression is restricted to the host environment.

RESUMEN

C. rodentium es un patógeno de ratones utilizado como modelo de estudio para entender los mecanismos de virulencia de los patógenos de humanos *Escherichia coli* enteropatógena y *E. coli* enterohemorrágica, para los cuales no existe un modelo animal de infección. Estas tres bacterias se adhieren al epitelio intestinal mediante estructuras de superficie denominadas fimbrias e inyectan proteínas efectoras a través de un sistema de secreción tipo III, dando lugar a la formación de lesiones de adherencia y esfacelamiento. Aunque *C. rodentium* posee 19 operones fimbriales, su papel durante el proceso de infección en el ratón se ha estudiado solo para tres de ellos. En este trabajo identificamos y caracterizamos un nuevo factor de virulencia de *C. rodentium*, la fimbria de colonización intestinal Gcf, el cual es codificado por el operón *gcfFGABCDE* y es requerido por la bacteria para colonizar el tracto gastrointestinal del ratón. El promotor de *gcf*, cuyo inicio de transcripción se localizó 158 pares de bases río arriba del codón de inicio de *gcfF*, se expresó muy poco en *C. rodentium* bajo condiciones de cultivo *in vitro* que promueven la expresión de otros operones fimbriales; sin embargo, dicho promotor se activó en una mutante carente del gen *hns1* que codifica para el ortólogo más cercano de la proteína H-NS (“histone-like nucleoid structuring protein”) de *E. coli*. Si bien *C. rodentium* posee cuatro ortólogos más de H-NS, ninguno de estos participó en la regulación de *gcf*. Aunque H-NS se unió a la región reguladora de *gcf*, apoyando su papel directo como represor del operón, la actividad del promotor *gcf* respondió diferencialmente a las condiciones de cultivo, aun en ausencia de H-NS1, indicando que un mecanismo adicional regula su expresión. A pesar de expresarse poco en condiciones de cultivo *in vitro*, el promotor *gcf* se activó en *C. rodentium* durante la infección del tracto intestinal del ratón, sugiriendo que su expresión está restringida al hospedero.

1.-INTRODUCCIÓN

1.1.- Patógenos A/E

Las bacterias patógenas de humanos *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) son dos de los principales agentes causantes de diarrea alrededor del mundo. EPEC causa infecciones gastrointestinales principalmente en niños menores de 6 meses en países en vías de desarrollo (Nataro y Kaper, 1998; Croxen, *et al.* 2013); mientras que EHEC es un patógeno emergente en países desarrollados que, debido a su capacidad de producir toxinas tipo Shiga, puede provocar una complicación clínica conocida como síndrome urémico hemolítico, padecimiento que provoca daño renal agudo e incluso la muerte (Karmali *et al.* 1983; Croxen, *et al.* 2013).

EPEC y EHEC, al igual que los patógenos de animales EPEC de conejos (REPEC) (Takeuchi *et al.* 1978), EPEC de cerdos (PEPEC) (An *et al.* 2000) y el patógeno específico de ratones *Citrobacter rodentium* (Luperchio *et al.* 2000), pertenecen al grupo de bacterias enteropatógenas denominado A/E, cuyos miembros producen lesiones de “adherencia y esfacelamiento” o A/E (del inglés “Attaching and Effacing”) en el epitelio intestinal de sus respectivos hospederos.

Las lesiones A/E se caracterizan por la unión estrecha de las bacterias a la membrana celular de las células epiteliales del intestino (enterocitos), la eliminación de las microvellosidades intestinales y la formación de estructuras tipo pedestal ricas en actina justo en el sitio de unión de las bacterias a la superficie celular (Wong *et al.* 2011; Lai *et al.* 2013). En la **Figura 1** se presenta una micrografía que muestra las lesiones A/E generadas por *C. rodentium* en el colon de un ratón infectado.

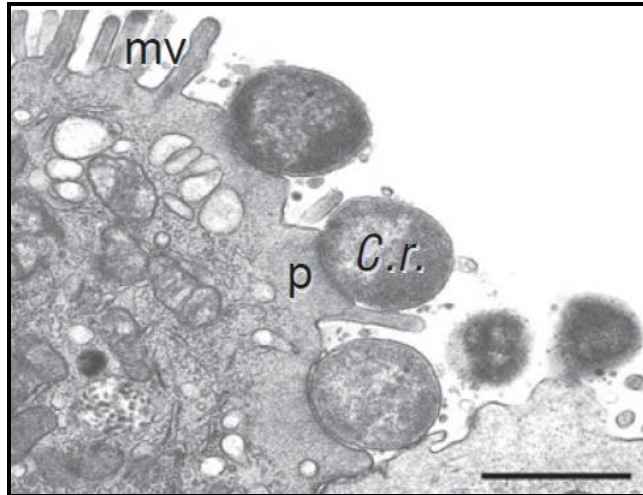


Figura 1.- Lesiones A/E características provocadas por *C. rodentium*. Micrografía electrónica que muestra una sección del colon de un ratón infectado con *C. rodentium* (C.r.). La adherencia estrecha entre la bacteria y la célula blanco (enterocito) provoca la destrucción de las microvellosidades (mv), así como la generación de estructuras ricas en actina en forma de pedestales (p) (Yang *et al.* 2010). Barra, 1 μ m.

Se ha propuesto que el mecanismo de patogénesis entre los diferentes miembros del grupo A/E está conservado y que dicho proceso incluye varias etapas. Inicialmente, ocurre la adherencia inicial de la bacteria al epitelio intestinal mediada por adhesinas fimbriales, al menos por la fimbria BFP (del inglés “bundle-forming pili”) en el caso de EPEC (**Figura 2A**); posteriormente, la síntesis y ensamblaje de un sistema de secreción tipo III (SST3) a través del cual se translocan hacia el citoplasma de la célula hospedera diversas proteínas efectoras (**Figura 2B**). Una de las moléculas secretadas es la proteína Tir, la cual una vez translocada se inserta en la membrana de la célula blanco y funciona como un receptor para una adhesina bacteriana de membrana externa denominada Intimina (Schmidt *et al.* 2010; Lai *et al.* 2013). La unión entre las proteínas Tir e Intimina genera una adherencia más estrecha entre la bacteria y el enterocito (**Figura 2C**).

En adición a su papel como un receptor translocado para la Intimina, Tir también es responsable de reclutar a las proteínas requeridas para el ensamblaje de actina y otros componentes del citoesqueleto de la célula eucarionte, lo cual da lugar a la formación de los pedestales de actina polimerizada, característicos de

las lesiones A/E, justo debajo del sitio donde la bacteria se encuentra adherida (Wong *et al.* 2011; Stevens y Frankel, 2014) (**Figura 2C**).

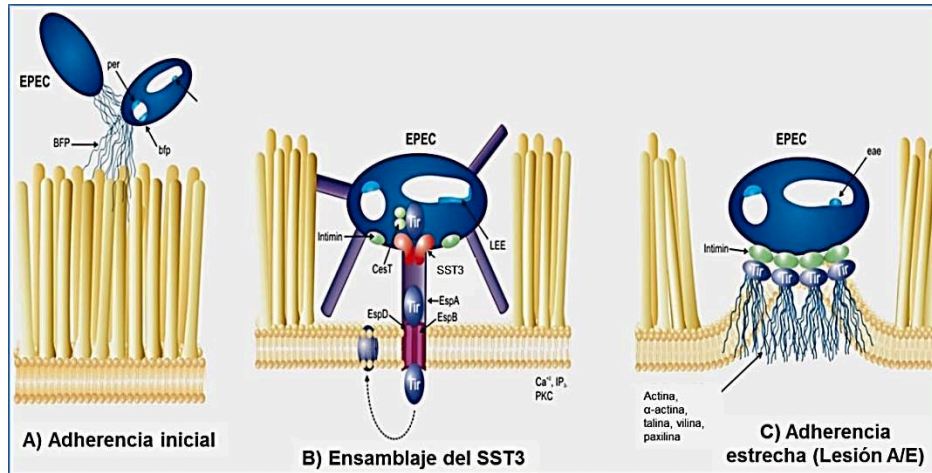


Figura 2.- Modelo esquemático del mecanismo de infección por patógenos A/E. Modelo propuesto para EPEC. **A)** La adherencia inicial de la bacteria al epitelio intestinal es mediada por la fimbria BFP, codificada en el plásmido EAF. **B)** La bacteria sintetiza un sistema de secreción tipo III (SST3) mediante el cual inyecta diversas proteínas efectoras hacia el citoplasma de la célula blanco. **C)** La proteína translocada Tir se inserta en la membrana de la célula eucarionte y funciona como un receptor para la adhesina bacteriana Intimina. La unión Tir-Intimina genera una adherencia estrecha que conlleva al reclutamiento de proteínas del citoesqueleto eucarionte y a la formación de la lesión A/E (modificado de <http://www.fernness.com/science-13.html>).

Por su parte, las proteínas efectoras translocadas a través del SST3 promueven la infección bacteriana al secuestrar varios procesos celulares dentro de la célula eucarionte; por ejemplo, Map, EspM, EspT y EspH modulan la señalización por Rho-GTPasas favoreciendo la manipulación del citoesqueleto de actina; NleH, NleD y EspZ promueven la supervivencia celular; EspF, Map y Cif causan apoptosis; EspB y EspJ contrarrestan la fagocitosis de la bacteria por las células del sistema inmune, mientras que NleB, NleC y NleE inhiben la respuesta inflamatoria del hospedero; a su vez, NleA inhibe el transporte de proteínas celulares del retículo endoplásmico al aparato de Golgi y elimina las uniones

estrechas de los enterocitos, funcionando como un modulador de la virulencia en EPEC, EHEC y *C. rodentium* (Wong *et al.* 2011; Stevens y Frankel, 2014).

1.2.- La isla de patogenicidad LEE

Todos los genes requeridos para la síntesis del SST3, así como para la formación de las lesiones A/E en el hospedero, están codificados en una isla de patogenicidad denominada LEE (del inglés “Locus of Enteroocyte Effacement”), la cual es una inserción cromosomal de ~40 kilobases (kb) que se propone fue adquirida por los patógenos A/E mediante transferencia horizontal (Müller *et al.* 2009; Chandry *et al.* 2012).

Como se ilustra en la **Figura 3**, los genes del LEE están organizados en cinco operones policistrónicos (*LEE1* a *LEE5*), dos operones bicistrónicos (*grlR-grlA* y *espG-rorf1*) y algunos otros genes (*etgA*, *cesF*, *map* y *escD*) (**Figura 3**).

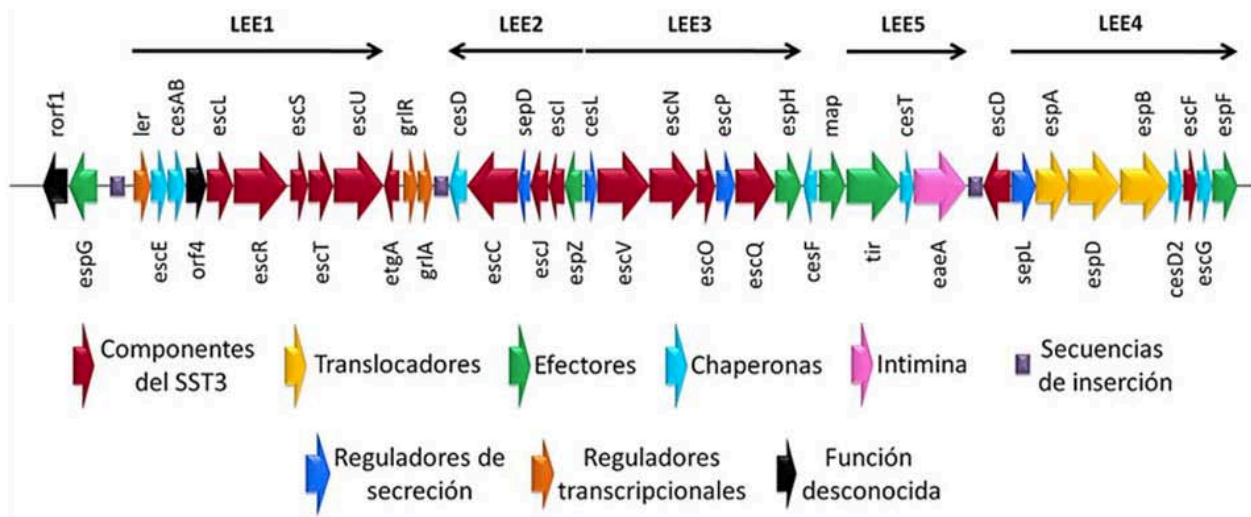


Figura 3.- Organización genética de la isla de patogenicidad LEE. Se muestra un esquema de la isla LEE de *C. rodentium*. Las flechas indican secuencias codificantes con sus respectivos nombres arriba. Abajo, código de colores con las funciones descritas o propuestas para cada gen. *LEE1* a *LEE5*, operones policistrónicos de la isla (modificada de Mundy *et al.* 2005).

Los operones *LEE1*, *LEE2* y *LEE3* codifican componentes requeridos para la síntesis y el ensamblaje del SST3; *LEE4* codifica principalmente para las proteínas del translocón y componentes extracelulares del SST3; *LEE5* contiene los genes *tir* y *eae* los cuales codifican para el receptor Tir y la Intimina, respectivamente (Stevens y Frankel, 2014). Además, en el operón *LEE1* está codificada la proteína Ler (“LEE encoded regulator”), el regulador maestro de la isla que activa la expresión del resto de los operones y genes del LEE antagonizando el efecto represor del regulador global H-NS (“histone-like nucleoid structuring protein”), incluyendo al operón *grlR-grlA* el cual codifica para un represor global de la expresión del LEE denominado GrlR (“global regulator of LEE repressor”), así como para el activador GrlA (“global regulator of LEE activator”) (Franzin y Sircili, 2015).

1.3.- *C. rodentium* como modelo de estudio

C. rodentium (inicialmente conocido como *C. freundii* biotipo 4280) es una bacteria Gram-negativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, se encuentra genéticamente relacionada con *E. coli* y es miembro del grupo de patógenos A/E (Petty *et al.* 2010). Este patógeno exclusivo de ratones se identificó por primera vez en medicina veterinaria como el agente causante de la hiperplasia colónica transmisible en estos animales, padecimiento caracterizado principalmente por la hiperproliferación de las células epiteliales en la parte distal del colon (Mundy *et al.*, 2005; Collins *et al.* 2014).

El desarrollo de la infección por *C. rodentium* inicia con la colonización de la superficie del tejido linfoide del ciego pocas horas después de la ingestión de la bacteria. Aproximadamente tres días después, las bacterias pueden encontrarse también en el colon distal y luego, entre los días 5 y 14 postinfección (pi), comienza a ser visible el engrosamiento del intestino, principalmente en el colon distal. Finalmente, entre los días 21-28 pi, las lesiones desaparecen completamente, *C. rodentium* es eliminado del tracto gastrointestinal y deja de ser detectable en las heces fecales de los animales infectados, los cuales desarrollan

inmunidad a una infección subsecuente por la misma bacteria (Mundy *et al.* 2005; Collins *et al.* 2014).

Aunque se han reportado patógenos A/E capaces de causar infecciones en modelos animales como vacas, cabras, ovejas, cerdos y conejos entre otros (revisado en Wales *et al.* 2005), *C. rodentium* es el único miembro conocido del grupo A/E capaz de causar enfermedad en ratones. Además, esta bacteria genera lesiones en el epitelio intestinal del ratón similares a las producidas por EPEC y EHEC en humanos, lo cual indica que estas tres bacterias comparten una estrategia común de virulencia y por lo tanto, que el modelo de infección *C. rodentium*-ratón resulta conveniente para el estudio *in vivo* de las bases moleculares y celulares de la patogénesis de estos padecimientos (Yang *et al.* 2010).

1.4.- Fimbrias

1.4.1- Concepto.

Las fimbrias son apéndices adhesivos que se proyectan desde la superficie de la bacteria, poseen diámetros que van de 2 a 8 nm y son más delgadas y numerosas que los flagelos. Están formadas por un filamento anclado a la membrana externa (varilla fimbrial) compuesto de varios cientos (o probablemente miles) de pequeñas subunidades principales o pilinas de ~15-25 kilodaltones (kDa), en cuya punta se localiza un factor de adherencia o adhesina requerida para el reconocimiento del receptor y por lo tanto, para la especificidad de unión (Proft y Baker, 2009).

Se ha propuesto que durante las etapas iniciales del proceso de infección, los patógenos A/E, al igual que otras bacterias patógenas, utilizan fimbrias para adherirse de manera específica y eficiente a los tejidos blanco dentro del hospedero, como se ha propuesto para las fimbrias BFP (Hicks *et al.* 1998; Cleary *et al.* 2004) y Lpf (“long polar fimbria”) (Torres *et al.* 2007; Torres *et al.* 2008) de EPEC y EHEC, respectivamente, las cuales son requeridas, junto con otras adhesinas fimbriales y no fimbriales, para la unión eficiente de la bacteria a la superficie de las células epiteliales del intestino.

En la **Figura 4** se presentan micrografías electrónicas que muestran la morfología característica de las fimbrias BFP y Lpf.

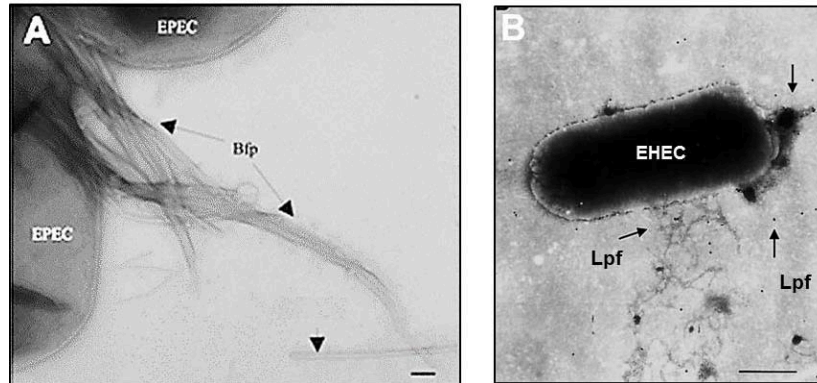


Figura 4.- Las fimbrias BFP y Lpf. Se muestran imágenes de microscopía electrónica de transmisión de células de EPEC E2348/69 (A) o EHEC EDL933 (B) expresando las fimbrias BFP o Lpf, respectivamente. Barras, 0.2 μm (A) y 0.5 μm (B). Modificado de Ramboarina *et al.* 2005 y Torres *et al.* 2008.

Por otra parte, además de participar en mecanismos de adhesión celular, las fimbrias también están involucradas en otros procesos biológicos como son evasión de la respuesta inmune del hospedero y formación de biopelículas bacterianas, así como transferencia de material genético por conjugación y, en algunos casos, movilidad bacteriana; por estas razones, estas estructuras bacterianas son consideradas factores de virulencia importantes en muchas enfermedades, en particular infecciones del tracto gastrointestinal, urinario y genital (Proft y Baker, 2009; Allen *et al.* 2012).

1.4.2.- Clasificación

A través de los años se han propuesto varios esquemas de clasificación para agrupar diferentes clases de fimbrias. Los primeros reportes trataron de clasificar estas estructuras basándose únicamente en características morfológicas y funcionales (Brinton, 1965; Ottow, 1975); sin embargo, dicho sistema no logró reflejar las relaciones filogenéticas reveladas posteriormente con los análisis de secuencia de los operones fimbriales correspondientes, razón por la cual este esquema dejó de ser utilizado. En la actualidad algunos términos de este sistema

siguen siendo ampliamente utilizados, por ejemplo, “fimbria tipo 1” que es usado para designar a los filamentos rígidos de *E. coli* uropatógena (UPEC) requeridos para la hemaglutinación de eritrocitos, así como el término “fimbrias tipo IV” que se emplea para definir una clase de apéndices polares involucrados en un tipo de movilidad bacteriana especializada (“twitching”), basada en la proyección y retracción del pilus.

Otro esquema clásico es el descrito por Paranchych *et al.* (1988), quienes propusieron una clasificación morfológica basada principalmente en los diámetros de las fimbrias; sin embargo, el amplio rango de tamaños entre las diferentes fimbrias reportadas a la fecha representa un serio inconveniente para la utilidad de este parámetro de clasificación. Además, el uso de criterios arbitrarios únicos como el diámetro, la morfología o la función pueden ser aplicados solamente a fimbrias caracterizadas experimentalmente, una desventaja importante dado el gran número de operones fimbriales identificados desde el nacimiento de la era genómica (Nuccio y Bäumlér, 2007).

Actualmente, el sistema de clasificación más aceptado es aquel que agrupa a las fimbrias con base en las características de sus vías de ensamblaje. Esta nomenclatura ha ganado popularidad debido a que define clases fimbriales en términos de ancestros y descendencia evolutiva. Además, los miembros de una clase particular pueden ser identificados rápidamente por homología de secuencia de sus genes biosintéticos, lo cual permite aplicar esta clasificación a operones fimbriales identificados por proyectos de secuenciación masiva aunque estos no estén caracterizados experimentalmente (Nuccio y Bäumlér, 2007). Con base en este esquema de clasificación, las fimbrias pueden ser agrupadas en cuatro clados distintos: las ensambladas por los mecanismos chaperona/usher, nucleación/precipitación extracelular (fimbrias curli), chaperona/usher alternativo (familia CS1) y las denominadas fimbrias tipo IV.

Considerando que 13 de los 19 operones fimbriales identificados en el genoma de *C. rodentium*, incluyendo el operón *gcf* objeto de este estudio, codifican para fimbrias ensambladas por la vía chaperona/usher, esta clase de estructuras se describe con mayor detalle a continuación.

1.4.3.- Fimbrias chaperona/usher

1.4.3.1- Concepto

La vía chaperona/usher es el mecanismo más común de ensamblaje fimbrial, representa la clase con el mayor número de representantes y es el sistema mejor caracterizado a la fecha (Nuccio y Bäumler, 2007). Las fimbrias ensambladas por este proceso poseen de 2 a 10 nm de diámetro y de 1 a 3 μm de largo y pueden dividirse en dos clases principales según su arquitectura: fibras rígidas de diámetros anchos similares a bastones, así como fibras delgadas, flexibles y amorfas, originalmente descritas como “cápsulas afimbriales”. Ambas subclases son altamente frecuentes en miembros de γ -proteobacterias (incluyendo *E. coli*, *Salmonella* y *Yersinia*), β -proteobacterias, cianobacterias y *Deinococcus-Thermus* (Nuccio y Bäumler, 2007; Thanasi *et al.* 2012).

La vía chaperona/usher debe su nombre a los componentes de su maquinaria de secreción y ensamblaje, la cual consiste de una chaperona periplásmica requerida para el plegamiento y acoplamiento de los diferentes componentes fimbriales a una proteína denominada “usher” que se encuentra anclada a la membrana externa y funciona como soporte para el ensamblaje y anclaje de los componentes de la fimbria. Además de estas dos proteínas, dichas estructuras están mayoritariamente compuestas por una subunidad principal o pilina que polimeriza y forma el cuerpo de la fimbria, así como por una adhesina localizada en la punta del filamento que confiere especificidad de unión al receptor (Thanasi *et al.* 2012).

1.4.3.2.- Ensamblaje

Como se ilustra en la **Figura 5A**, el proceso de ensamblaje de las fimbrias chaperona/usher consta de varios pasos. Inicialmente, todas las proteínas requeridas para el ensamblaje de la fimbria son exportadas al periplasma vía el sistema general de secreción, Sec. Una vez en el espacio periplásmico, la interacción de la chaperona con las diferentes subunidades fimbriales promueve el plegamiento correcto de las mismas, evita interacciones prematuras entre subunidades y mantiene a las proteínas en un estado competente para el

ensamblaje. Posteriormente, la interacción de la proteína de soporte (“usher”) con los complejos chaperona-pilina facilita la liberación de las subunidades fimbriales y su posterior secreción a través del canal del “usher”. Las proteínas de la punta de la fimbria (adhesinas) son secretadas primero, seguidas de las proteínas adaptadoras y, finalmente, de las subunidades principales que forman el cuerpo de la fimbria (Nuccio y Bäumler, 2007).

Todas las subunidades fimbriales poseen un dominio incompleto de inmunoglobulina (Ig), el cual no contiene la séptima lámina- β del dominio canónico, la ausencia de este dominio genera en su lugar una región altamente hidrofóbica expuesta al solvente (**Figuras 5B y C**) (Allen *et al.* 2012). La chaperona estabiliza la estructura Ig incompleta de las subunidades fimbriales insertando una de sus láminas- β (denominada G1) en la región hidrofóbica de la pilina (**Figura 5B**), dicha interacción es conocida como complementación de la cadena donadora (DSC por sus siglas en inglés). Luego, durante el ensamblaje de la fimbria, las diferentes subunidades se unen entre sí mediante un mecanismo similar a la interacción DSC, en el cual una extensión amino terminal (Nte) de la subunidad desplaza a la lámina- β G1 de la chaperona (**Figura 5C**), proceso conocido como intercambio de la cadena donadora (DSE por sus siglas en inglés).

En ambos mecanismos, DSC y DSE, las cadenas donadoras confieren especificidad durante el ensamblaje de cada fimbria y, a su vez, las proteínas usher solo pueden ser activadas por su correspondiente adhesina o primera subunidad exportada a través de esta. Por lo tanto, la fimbria es ensamblada a través de plegamientos tipo Ig con cada subunidad unida no covalentemente a su pilina vecina mediante interacciones tipo DSE (Thanasi *et al.* 2012).

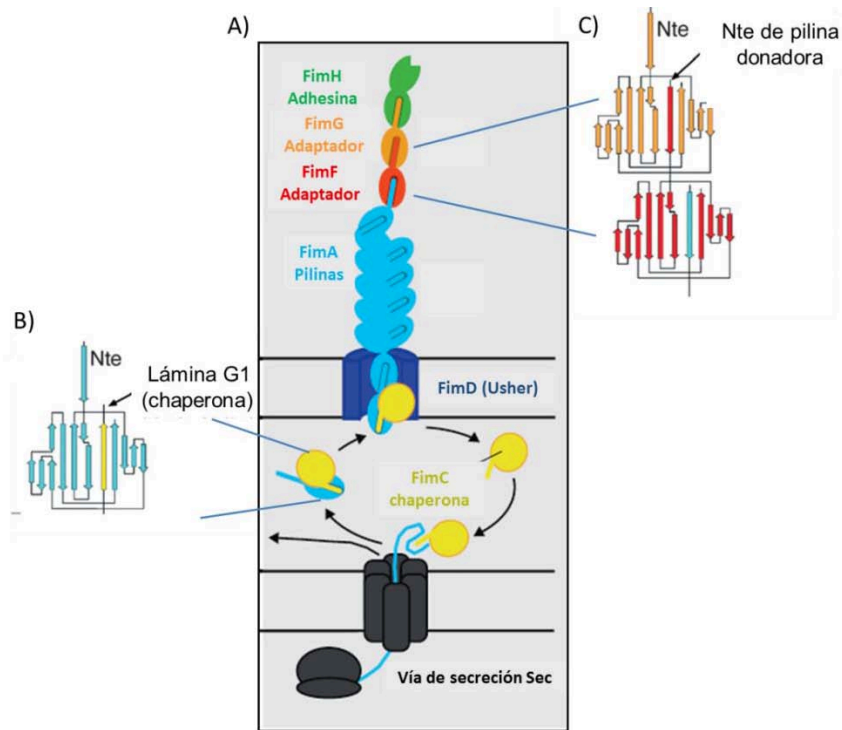


Figura 5.- Vía de ensamblaje fimbrial tipo Chaperona/Usher. **A)** Ensamblaje del pilus Fim de *E. coli* uropatógena. Las subunidades que forman la punta de la fimbria (FimF, FimG y FimH), así como el cuerpo fimbrial (FimA), son translocadas al periplasma por el sistema Sec y se acoplan con la chaperona FimC. Los complejos chaperona-pilina interactúan con la proteína “usher” promoviendo la liberación de las pilinas y su interacción para formar un multicomplejo que da lugar al cuerpo fimbrial. **B)** Complementación de la cadena donadora. La chaperona estabiliza los dominios Ig incompletos de las pilinas (flechas azules) al ceder su lámina- β G1 (flecha amarilla). **C)** Intercambio de la cadena donadora. La interacción entre pilinas se da por el intercambio de extensiones amino terminales (Nte) de proteínas vecinas (Allen *et al.* 2012).

1.4.3.3- Subclasificación

Los genes fimbriales de la familia chaperona/usher usualmente están agrupados en operones, los cuales, como ya se mencionó, codifican generalmente para una subunidad principal, una chaperona periplásmica, el “usher” y en algunos casos, adhesinas, proteínas reguladoras o adaptadoras, o incluso proteínas de función aún desconocida (**Figura 6**). Sin embargo, el gen que codifica para el “usher” es el único que se encuentra en una sola copia en todos los operones fimbriales de esta familia identificados a la fecha. Por esta razón, la secuencia primaria de esta proteína se ha utilizado para generar árboles filogenéticos con los

que se han logrado definir seis clados de esta familia de fimbrias, denominados α , β , γ , κ , π y σ , así como los subclados γ_1 , γ_2 , γ_3 y γ_4 (**Figura 6**) (Nuccio y Bäumler, 2007). Los nombres de las diferentes clases fimbriales se asignaron con base en características particulares de cada clado fimbrial o en un miembro representativo del mismo, por ejemplo, la clase α designa a la familia chaperona/usher alternativa; κ , a los miembros relacionados con la fimbria K88 de *E. coli*; π , a las fimbrias P asociadas a pielonefritis; y σ , por la proteína U que cubre la espora de *Myxococcus xanthus*; mientras que las términos β y γ fueron asignados arbitrariamente (Nuccio y Bäumler, 2007).

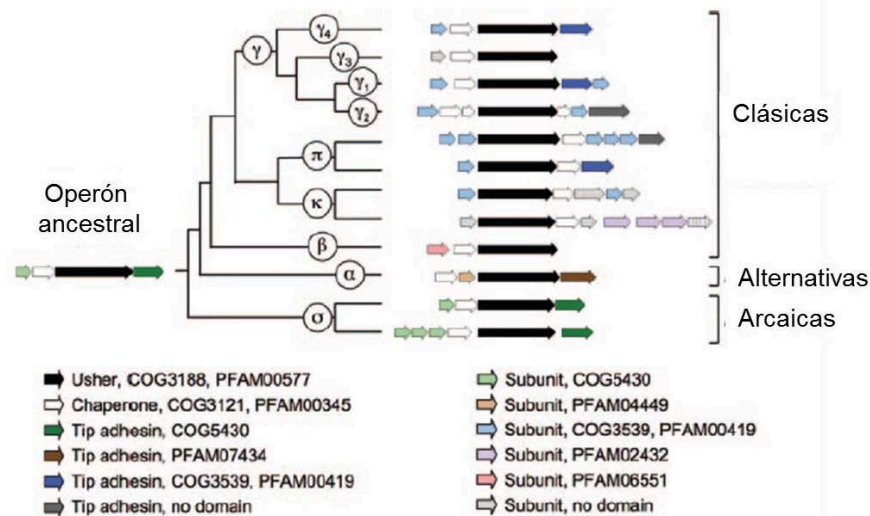


Figura 6.- Clasificación de los operones fimbriales chaperona/usher. El árbol filogenético fue construido a partir de la secuencia de aminoácidos de las proteínas “usher” y de un operón ancestral hipotético. Las funciones asignadas a cada gen (flechas) se indican abajo mediante un código de colores con sus respectivos números de acceso. α , β , γ , κ , π y σ , clados; γ_1 , γ_2 , γ_3 y γ_4 , subclados (Nuccio y Bäumler, 2007).

1.4.3.4- Regulación

La gran mayoría de los operones fimbriales de la familia chaperona/usher no se expresan constitutivamente, sino en respuesta a condiciones ambientales específicas (Clegg *et al.* 2011). Diversos estudios han demostrado que la regulación de los genes que codifican para las subunidades principales o pilinas, y por lo tanto, para el resto del operón, determinan la adecuada síntesis espacio-temporal de estos apéndices bacterianos. En la **Tabla 1** se presentan algunos de

los miembros representativos de esta clase de fimbrias, así como sus mecanismos de regulación y las proteínas reguladoras que participan en su regulación.

Uno de los mecanismos de regulación fimbrial más estudiados es el correspondiente a la fimbria Fim de *E. coli* (**Tabla 1**). En este caso, la transcripción de la subunidad principal (FimA) depende de la orientación correcta de un elemento de ADN invertible (*fimS*), el cual contiene el promotor de *fimA* flanqueado por dos secuencias repetidas invertidas de 9 pares de bases (pb). La transcripción ocurre cuando el elemento está orientado a favor de *fimA* (“on”), mientras que en la orientación contraria (“off”) no hay transcripción (Abraham et al, 1985; Holden et al. 2007). La inversión de *fimS* es mediada por dos recombinasas fimbriales sitio-específicas (FimB y FimE) que actúan independientemente y se unen a los elementos repetidos invertidos de 9 pb (Klemm, 1987; Holden et al. 2007). En adición a estas recombinasas, los reguladores positivos IHF (“integration host factor”) y Lrp (“leucine-responsive regulatory protein”) facilitan la inversión en la orientación “on”, mientras que H-NS mantiene a *fimS* en la orientación “off” (Corcoran y Dorman, 2009).

Otro mecanismo de regulación fimbrial ampliamente estudiado está basado en la metilación del ADN, como es el caso de la fimbria Pap (“pyelonephritis-associated pili”) de UPEC (**Tabla 1**), en donde la expresión de *pap* es dependiente del estado de metilación de dos sitios GATC ubicados río arriba de dicho operón fimbrial. En este caso, el regulador global Lrp y la metilasa bacteriana Dam compiten por la unión a dichos sitios. A altas concentraciones intracelulares de Lrp, esta proteína se une eficientemente al sitio GATC más cercano al promotor, lo que resulta en la inhibición de la transcripción; sin embargo, esta unión solo puede ocurrir si el sitio no ha sido metilado por Dam, revelando la competencia entre Lrp y la metilasa por la unión a dicho elemento. Por el contrario, a bajas concentraciones de Lrp, el regulador se une al sitio GATC hemimetilado más alejado del promotor, previniendo así la metilación de este sitio por Dam pero permitiendo la metilación completa del segundo sitio y, por consecuencia, la transcripción del operón *pap* (Peterson y Reich, 2008).

Las concentraciones intracelulares de c-di-GMP también han sido relacionadas con la regulación de la expresión de fimbrias, por ejemplo, la fimbria Mrk de *Klebsiella pneumoniae* (Tabla 1), cuya expresión responde de manera positiva a altas concentraciones de esta molécula. Lo anterior, mediante la acción de la proteína MrkH que está involucrada tanto en la unión a c-di-GMP como en la transcripción del resto de los genes *mrk* (Johnson y Clegg, 2010).

Tabla 1.- Mecanismos comunes de regulación de fimbrias chaperona/usher

Mecanismo de regulación	Organismo (fimbria)	Reguladores conocidos
Elementos de ADN invertibles	<i>E. coli</i> (CS18)	FotST
	<i>E. coli</i> (Fim)	FimBE, Lrp, IHF, H-NS
	<i>K. pneumoniae</i> (Fim)	FimK
	<i>K. pneumoniae</i> (Kpc)	Kpcl
	<i>P. mirabilis</i> (Mrp)	Mrpl
Metilación de ADN	<i>E. coli</i> (Pap)	PapI, Lrp
	<i>E. coli</i> (K88)	FaeA, Lrp
	<i>E. coli</i> (K99)	Mbf
	<i>E. coli</i> (Sfa)	SfaX
	<i>S. Typhimurium</i> (Pef)	PefI
	<i>S. Typhimurium</i> (Std)	SeqA, HdfR, RosE
c-di-GMP	<i>K. pneumoniae</i> (Mrk)	MrkJ
	<i>P. aeruginosa</i> (CupA)	PA1120, MorA, PvrR, MvaT
	<i>P. aeruginosa</i> (CupB)	RocS1, RocA1, MvaT
	<i>P. aeruginosa</i> (CupC)	RocS1, RocA1, MvaT
	<i>P. aeruginosa</i> (CupD)	PvrR, RcsB, RcsC
Otros reguladores de unión a ADN	<i>B. pertussis</i> (Fha)	BvgAS
	<i>E. coli</i> (987P)	FasH
	<i>E. coli</i> (CFAI)	Rns
	<i>E. coli</i> (CS1)	Rns, H-NS
	<i>E. coli</i> (CS2)	Rns
	<i>E. coli</i> CS17	Rns
	<i>E. coli</i> CS19	Rns
	<i>E. coli</i> PCO71	Rns
	<i>E. coli</i> Lpf	Ler, H-NS
	<i>E. coli</i> ECP	H-NS, IHF, EcpR
	<i>C. rodentium</i> Kfc	RegA, H-NS
<i>S. Typhimurium</i> Fim	FimZYW	

Modificada de Clegg *et al.* 2011.

En adición a los mecanismos antes descritos, existen varios ejemplos de fimbrias que están bajo el control de reguladores fimbriales que no están asociados con procesos de inversión génica, metilación de ADN o metabolismo de segundos mensajeros, y cuya regulación depende de la expresión y unión a ADN de estas proteínas reguladoras bajo condiciones de crecimiento específicas. Tal es el caso de la fimbria Kfc (“K99-like factor involved in *Citrobacter* colonization”) de *C. rodentium* (Hart *et al.* 2008) (Tabla 1) que es regulada positivamente por RegA (“regulation factor A”) en respuesta a bicarbonato, un oxianión presente en altas concentraciones en el intestino de los mamíferos (Hart *et al.* 2008; Yang *et al.* 2008). RegA, además es un activador clásico que participa en la regulación de otros genes de virulencia en *C. rodentium*, incluyendo la isla de patogenicidad LEE (Yang, *et al.* 2010).

1.5.- Regulación negativa por H-NS

H-NS fue descrita inicialmente en *E. coli* como una proteína termoestable asociada al nucleoide bacteriano (Falconi *et al.*, 1988). Es una proteína pequeña de ~136 aminoácidos que contiene un dominio de oligomerización en su extremo amino terminal, un dominio de unión a ADN en su extremo carboxilo terminal y una región flexible intermedia que conecta ambos módulos funcionales (Dorman, 2007 y 2014).

H-NS se une de manera inespecífica a regiones de ADN con un alto contenido de A + T y participa en el mantenimiento de la estructura del nucleoide, en la compactación del ADN y en la bipartición del cromosoma (Dorman, 2007 y 2014). Sin embargo, ya que las regiones de ADN que cumplen con las características requeridas para la unión de H-NS también se encuentran de forma común en promotores bacterianos, así como a lo largo de fragmentos de ADN adquiridos por transferencia horizontal, la unión de H-NS a dichas regiones da lugar a cambios en sus patrones de expresión génica.

Considerando que la unión de H-NS por lo general causa silenciamiento de sus genes blanco, esta proteína ha sido descrita como un represor global de la expresión génica en bacterias (Dorman, 2007 y 2014). A este respecto, se ha

reportado que H-NS regula negativamente ~5% de los genes en *E. coli*, la mayoría de los cuales participan en mecanismos de adaptación a estímulos ambientales (Bertin *et al.*, 1999; Hommais *et al.*, 2001).

También se ha demostrado que H-NS silencia de manera específica genes que han sido adquiridos por transferencia horizontal, incluyendo factores de virulencia, y se ha propuesto que su acción permite que estos elementos genéticos se encuentren silenciados hasta que sean integrados y controlados por las redes reguladoras pre-existentes en la bacteria receptora, disminuyendo de esta manera el costo energético para la bacteria (Navarre *et al.*, 2006).

Adicionalmente, H-NS se ha reportado como un regulador negativo de la expresión de fimbrias en patógenos A/E, como es el caso de ECP ("*E. coli* common pilus"), Lpf y Kfc de EPEC, EHEC y *C. rodentium*, respectivamente (**Tabla 1**).

Por otra parte, se propone que H-NS reprime la expresión de sus genes blanco uniéndose a sitios primarios de nucleación desde los cuales oligomeriza a lo largo del ADN, impidiendo así la interacción de la ARN polimerasa con la región promotora (**Figura 7A**) o bloqueando el proceso de elongación de la transcripción (**Figura 7B**).

Otro mecanismo de represión por H-NS consiste en la unión de la proteína a regiones adyacentes del ADN, donde la posterior oligomerización de las proteínas unidas en ambos sitios promueve un doblamiento en el ADN que da lugar a la formación de estructuras nucleopresoras denominadas "burbujas de represión", las cuales atrapan a la ARN polimerasa unida al ADN o evitan el acceso de esta al promotor, impidiendo así la formación del complejo abierto y el inicio de la transcripción (**Figura 7C**).

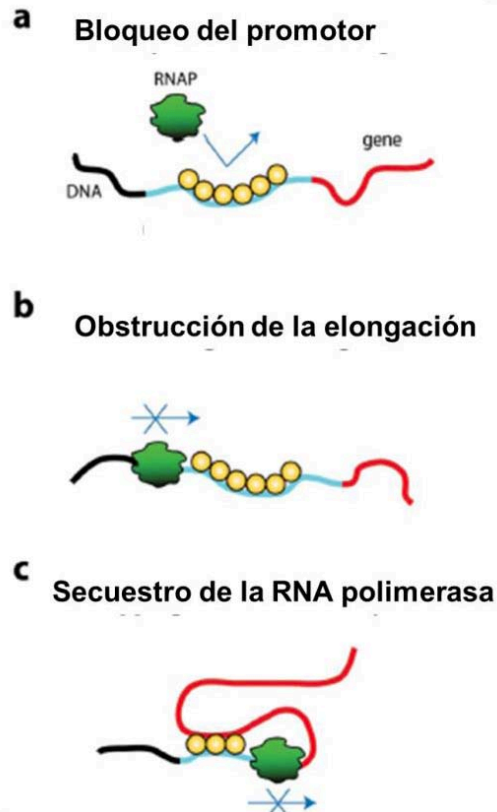


Figura 7.- Mecanismos de silenciamiento génico por H-NS. a) La polimerización de H-NS sobre los promotores bacterianos impide el acceso de la ARN polimerasa. **b)** Los nucleofilamentos de H-NS generados en regiones estructurales del gen pueden obstruir el proceso de elongación de la transcripción. **c)** Mediante unión a sitios distales en el ADN, H-NS puede mediar la formación de horquillas en el ADN que secuestran a la ARN polimerasa (*Lim et al., 2012*).

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Factores de virulencia de *C. rodentium*

Además del SST3 codificado en la isla de patogenicidad LEE y de las proteínas efectoras translocadas a través de este, los cuales han sido reportados como indispensables para la virulencia de *C. rodentium* (*Deng et al. 2004*; *Kamada et al. 2012*), se han identificado otros factores de virulencia adicionales en esta bacteria (**Tabla 2**). Dentro de estos, se encuentran las fimbrias CFC (“colonization factor of *Citrobacter*”) (*Mundy et al. 2003*) y Kfc (*Hart et al. 2008*), ambas requeridas para la colonización eficiente del intestino y por lo tanto, para el establecimiento exitoso de la infección en el ratón (**Tabla 2 y Apartado 2.3**).

De forma similar, la proteína LifA (“lymphocyte inhibitory factor A”), además de inhibir la producción de citosinas *in vitro*, también funciona como un factor de adherencia de *C. rodentium* requerido para la colonización y el desarrollo de la hiperplasia colónica en el ratón (Klapproth *et al.* 2005) (**Tabla 2**). Por otro lado, la adhesina no fimbrial AdcA (“adhesin involved in diffuse *Citrobacter* adhesion”) participa en la adhesión difusa de *C. rodentium* a células eucariontes en cultivo, sugiriendo su participación durante la adherencia intestinal (Hart *et al.* 2008) (**Tabla 2**). Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales estas adhesinas contribuyen al tropismo celular o su papel en la adherencia durante etapas específicas del proceso de infección siguen siendo inciertos.

Además de las adhesinas fimbriales y no fimbriales, el sistema de secreción tipo VI (SST6) denominado CTS1 (“*C. rodentium* type VI secretion system cluster 1”), también ha sido propuesto como otro probable determinante de patogenicidad en *C. rodentium* (**Tabla 2**), ya que se encontró que su expresión le confiere ventajas de crecimiento a la bacteria sobre otros microorganismos competidores, lo que sugiere un papel importante en la competencia del patógeno con las bacterias comensales de la mucosa intestinal durante el proceso de colonización del hospedero (Gueguen y Cascales, 2013).

Más recientemente, Thomassin *et al.* (2015) reportaron que un sistema regulador de dos componentes (CpxRA) es esencial para la virulencia de *C. rodentium* (**Tabla 2**), tanto en ratones C57BL6/J que sobreviven a la infección, como en la línea C3H/HeJ, en la cual la infección es letal. Además, mediante ensayos de “RT-PCR” se encontró que *cpxRA* se expresa en el colon de los ratones infectados y que su expresión es más alta durante las etapas tempranas de la infección. De esta manera, se propone que este sistema regulador podría participar en la activación de genes requeridos para la patogénesis. Sin embargo, por su carácter pleiotrópico no es claro hasta ahora si el sistema CpxRA regula genes que directamente participan en el proceso de infección o la atenuación es consecuencia de un defecto generalizado.

Adicionalmente, Sit *et al.* (2015) encontraron que un transportador de azúcares-fosfato denominado AfuABC (por “*Actinobacillus ferric uptake ABC transporter*”) posee un papel importante tanto en la virulencia de *C. rodentium* como en la capacidad de la bacteria de transmitir la infección de un animal infectado a uno sano (**Tabla 2**). En este trabajo, también se demostró que los sustratos de AfuABC, glucosa-6-fosfato, fructuosa-6-fosfato y pseudoheptulosa-7-fosfato, se encuentran presentes en el lumen intestinal del ratón y pueden ser utilizados como fuente de carbono por *C. rodentium*, lo que representa una ventaja con respecto a otras bacterias de la microbiota que carecen de este sistema de transporte.

Por otro lado, *C. rodentium* también expresa proteínas que funcionan como moduladores de la respuesta inmune del hospedero favoreciendo la infección por la bacteria (**Tabla 2**). Por ejemplo, Vijayakumar *et al.* (2014), generaron una cepa de *C. rodentium* mutada en un autotransportador con actividad de serinproteasa clase 1 (Crc1), el cual funciona como una toxina citopática que degrada espectrina, una proteína del citoesqueleto de la célula blanco. En dicho trabajo se reportó que la cepa mutante presentaba un fenotipo hipervirulento e hiperinflamatorio en el ratón con respecto a la cepa silvestre, por lo que los autores proponen que Crc1 podría favorecer la colonización del ratón por *C. rodentium* al poseer un papel inmunomodulador durante la infección, es decir, retardando la respuesta inmune del hospedero y evitando la muerte del mismo. Un caso similar fue reportado por Bhullar *et al.* (2015), quienes encontraron que una mutante afectada en otro autotransportador denominado Pic (“*Protein involved in colonization*”), presentaba un fenotipo hipervirulento dependiente de la activación del receptor de la respuesta inmune TLR2, e independiente de la actividad mucinasa propia de PicC; por lo tanto, los autores proponen que el papel principal de PicC podría ser limitar la estimulación del sistema inmune del hospedero durante la infección por *C. rodentium*.

En conjunto, estos datos claramente demuestran que el mecanismo de patogénesis de *C. rodentium* es un proceso altamente regulado, complejo y multifactorial, el cual requiere, además del SST3 codificado por el LEE, la acción

conjunta de otros factores de virulencia como el SST6 CTS1, adhesinas, proteínas moduladoras de la respuesta inmune del hospedero y una amplia batería de reguladores transcripcionales de genes de virulencia.

Tabla 2.- Factores de virulencia, no relacionados a LEE, de *C. rodentium*

Tipo	Nombre	Mecanismo	Ref.
Sistema de secreción tipo VI	CTS1	Posible ventaja de crecimiento sobre bacterias comensales	Gueguen y Cascales, 2013
Fimbrias	CFC Kfc	Adherencia al epitelio intestinal	Mundy <i>et al.</i> 2003 Hart <i>et al.</i> 2008
Adhesinas no fimbriales	LifA AdcA	Probable adherencia intestinal	Klapproth <i>et al.</i> 2005 Hart <i>et al.</i> 2008
Sistema de dos componentes	CpxRA	Probable activación de factores de virulencia <i>in vivo</i>	Thomassin <i>et al.</i> 2015
Transportador	AfuABC	Utilización de azúcares-fosfato como fuente de carbono	Sit <i>et al.</i> 2015
Autotransportadores	Crc1 PicC	Atenuación de la respuesta inmune del hospedero	Vijayakumar <i>et al.</i> 2014 Bhullar <i>et al.</i> 2015

2.2.- Operones fimbriales en *C. rodentium*

La secuenciación del genoma de *C. rodentium* reveló que esta bacteria posee un amplio repertorio de operones fimbriales, los cuales potencialmente codifican hasta para 19 fimbrias diferentes (Petty *et al.* 2010) (**Tabla 3**). Sin embargo, solamente dos de estos operones se han reportado como determinantes importantes durante el proceso de colonización en ratón: *cfcABCDEFGHIJPV*, que codifica para la fimbria tipo IV denominada CFC; y *kfcHGFEDC*, que pertenece a la familia chaperona/usher y codifica para la fimbria Kfc (revisar siguiente apartado); mientras que el operón *lpfABCDE*, al parecer no participa en la virulencia de *C. rodentium* (Tatsuno *et al.* 2006).

Tabla 3.- Operones fimbriales identificados en *C. rodentium*

No	No de acceso	Nombre asignado	Descripción
1	ROD_01101–01121	<i>hofCB-ppdD</i>	Fimbria tipo IV
2	ROD_03641–03671 ^c	<i>gcfFGABCDE^c</i>	Chaperona/usher ^c
3	ROD_10951–11021	<i>CsgGFEDBAC</i>	Fimbria curli
4	ROD_11771–11781 ^b		Chaperona/usher ^b
5	ROD_18141–18181	<i>lpfEDCBA</i>	Fimbria Lpf (chaperona-usher)
6	ROD_19341–19381		Chaperona/usher
7	ROD_22311–22341		Chaperona/usher
8	ROD_27771–27801		Chaperona-usher
9	ROD_29101–29191	<i>fimBEAICDFGHK</i>	Fimbria Fim (chaperona-usher)
10	ROD_29201–29241		Chaperona-usher alterna
11	ROD_29351–29391 ^a		Chaperona/usher
12	ROD_34961–35021		Chaperona-usher
13	ROD_41241–41291	<i>kfcHGFEDC</i>	Fimbria Kfc (chaperona/usher)
14	ROD_41381–41551	<i>tadZABCD,tadVEFG</i>	Locus Tad (fimbria tipo IV)
15	ROD_44281–44321	<i>hofMNOPQ</i>	Fimbria tipo IV
16	ROD_46461–46571	<i>cfcABCDEFGHJIPV</i>	Fimbria CFC (tipo IV)
17	ROD_50611–50651 ^a		Chaperona/usher
18	ROD_p1161–1201		Chaperona/usher
19	ROD_p1291–1301 ^{a,b}		Chaperona/usher ^{a,b}

^a, Contiene pseudogenes; ^b, operón incompleto; ^c, operón *gcf*. Modificado de Petty *et al.* 2010

2.3.- Las fimbrias CFC y Kfc

El papel del operón *cfc* en colonización se identificó mediante ensayos de infección en ratones con una librería de cepas mutantes de *C. rodentium*. De esta forma se encontró que una cepa mutante con una inserción en el gen *cfcH* (ATPasa) de este operón, mostraba fenotipos atenuados tanto en colonización como en daño al colon en comparación con la cepa silvestre, resultados que indicaron que la fimbria CFC es requerida por *C. rodentium* para colonizar el tracto gastrointestinal del ratón (Mundy *et al.* 2003).

En un trabajo posterior, Hart *et al.* (2008) reportaron que una cepa de *C. rodentium* mutada en el operón *kfcHGFEDC*, mostraba cuentas bacterianas en heces menores a las obtenidas con la cepa silvestre. Sin embargo, dicha diferencia solo fue evidente durante la etapa final del proceso de colonización

(días 16 a 20 post inoculación) (**Figura 8**), lo que sugiere que la fimbria Kfc es importante durante la fase tardía de la infección, aunque no es esencial.

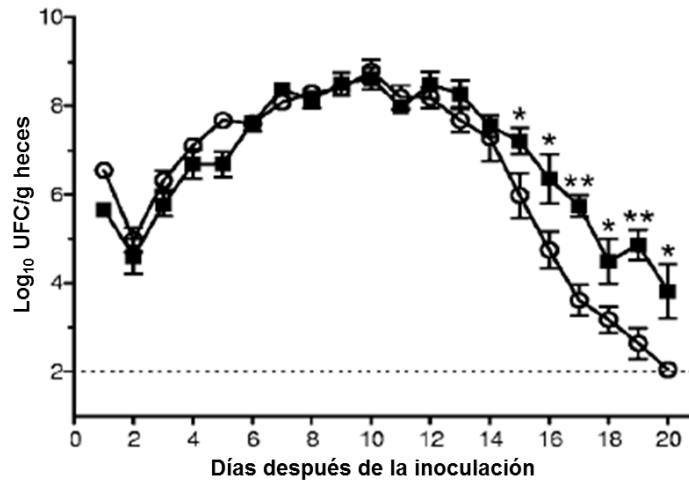


Figura 8.- Papel en colonización del operón fimbrial *kfchGFEDC* de *C. rodentium*. Se infectaron vía oral grupos de cinco ratones C57BL/6 con $\sim 2 \times 10^9$ unidades formadoras de colonias (UFC) de la cepa silvestre de *C. rodentium* (rectángulos) o de una mutante en la que fue eliminado el operón *kfchGFEDC* (círculos). La gráfica muestra el promedio y los errores estándar de las UFC presentes en las heces en los puntos de tiempo post-infección indicados. Línea punteada, límite de detección. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$ (prueba de t de Student) (Tomada de Hart *et al.* 2008).

2.4.- El operón *gcfFGABCDE*

En el grupo del Dr. Brett Finlay se generó una biblioteca de mutantes por transposición de *C. rodentium* y se evaluó la eficiencia en colonización de las mutantes obtenidas mediante ensayos de infección en ratones con suspensiones bacterianas conteniendo 95 mutantes diferentes cada una (Croxen *et al.* 2012, datos no publicados). Se encontró que una de las cepas atenuadas en colonización contenía una inserción en el gen *ROD_03661* que codifica para una chaperona y forma parte de un supuesto operón fimbrial (*ROD_03691* a *ROD_03631*) perteneciente a la familia chaperona/usher. Este locus genético, nombrado aquí *gcfFGABCDE* por “fimbria de colonización intestinal” (en inglés “gut colonization fimbria”) de *C. rodentium*, consta de un gen que codifica para la subunidad principal de la fimbria (*gcfA*) seguido de los genes *gcfB*, *gcfC* y *gcfD*

que codifican para la chaperona, el “usher” y la adhesina fimbrial, respectivamente (**Figura 9**). Adicionalmente, el operón *gcf* contiene tres genes putativos de función desconocida, *gcfF* y *gcfG* río arriba del gen *gcfA*, y *gcfE* río abajo de *gcfD*.

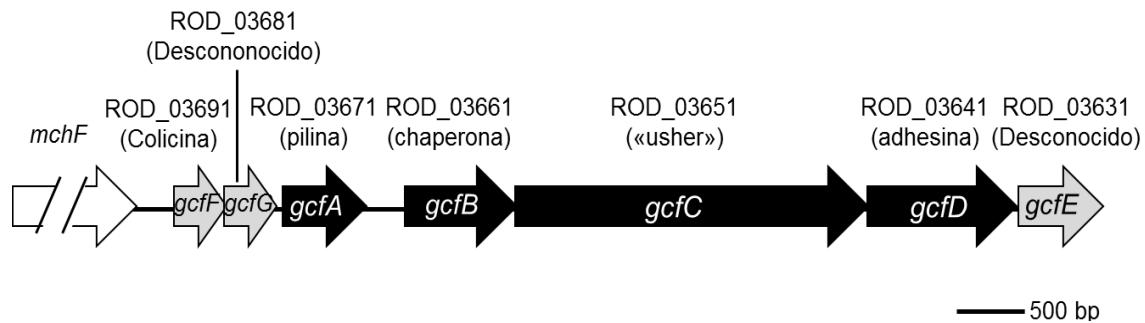


Figura 9.- Operón fimbrial *gcfFGABCDE* de *C. rodentium*. Las flechas indican secuencias codificantes y las líneas secuencias intergénicas. Se muestran los nombres asignados, así como los números de acceso y función propuesta de los diferentes genes *gcf*. En negro se muestran los genes fimbriales y en gris los genes de función desconocida.

El operón *gcf* no se encuentra en los otros miembros de la familia A/E; sin embargo, ortólogos cercanos de los genes fimbriales (*gcfABCD*) están presentes en otras gamma- y beta-proteobacterias pertenecientes a las familias *Enterobacteriaceae* (*Serratia plymuthica*, *Pantoea vagans* y *Yersinia enterocolitica*) y *Burkholderiaceae* (*Burkholderia* spp), respectivamente. Además, también existen ortólogos de los genes de función desconocida *gcfF* y *gcfG*, asociados con homólogos de los genes fimbriales *gcfABCD*, en los organismos *S. plymuthica* PRI-2C, *P. vagans* C9-1 (plásmido pPag1) y *Burkholderia cepacia* GG4. Por otro lado, *gcfE* no posee ortólogos asociados con homólogos de los genes fimbriales *gcf* en otras bacterias.

3.- JUSTIFICACIÓN

A la fecha, poco se conoce respecto a la relevancia biológica que para las bacterias representa contar con un repertorio tan numeroso de fimbrias, por ejemplo, si juegan un papel diferencial, sinérgico o redundante durante el proceso de colonización del hospedero o de un reservorio ambiental particular.

Estas limitaciones se acentúan si se trata de patógenos de humanos para los cuales no existe un modelo animal de infección, lo que complica el estudio *in vivo* de los mecanismos de patogénesis de estas bacterias. Sin embargo, en el caso de los patógenos A/E, *C. rodentium* utiliza un mecanismo similar al de los patógenos humanos EPEC y EHEC para colonizar a su hospedero natural, el ratón. Por lo tanto, esta bacteria representa un modelo útil e informativo para el análisis del proceso de infección causado por este grupo de patógenos.

Considerando que los antecedentes sugieren que el operón *gcfFGABCDE* de *C. rodentium* posee un papel importante en la virulencia de esta bacteria, el estudio de su regulación, así como de su papel durante las diferentes etapas del proceso de colonización en el ratón, permitirán obtener evidencias que nos ayuden a entender mejor el mecanismo de infección de los patógenos A/E. Además, considerando que dicho operón no posee ortólogos en EPEC o EHEC, este estudio también podría ayudar a definir si la diversidad en el contenido de fimbrias es uno de los mecanismos que determinan el rango o la especificidad de hospederos de los miembros de esta familia.

En conjunto, este y futuros estudios podrían apoyar el desarrollo de mejores estrategias para prevenir o combatir de manera más eficiente las infecciones causadas por esta clase de patógenos.

4.- HIPÓTESIS

Los genes *gcfFGABCDE* codifican para una fimbria requerida por *C. rodentium* para la colonización eficiente de su hospedero y constituyen un operón cuya expresión es modulada por reguladores específicos que responden a condiciones ambientales y/o nichos particulares a los que se expone la bacteria.

5.- OBJETIVOS

El objetivo general del presente trabajo es analizar la regulación del operón *gcfFGABCDE* de *C. rodentium*, así como su papel en la colonización del tracto gastrointestinal del ratón. Para esto, se establecieron los objetivos particulares:

1. **Determinación del papel en colonización.**- Construir una mutante en la subunidad principal (GcfA) y realizar cinéticas de colonización en ratones.
2. **Caracterización de las regiones reguladoras.**- Identificar promotor (es), región mínima reguladora y elementos reguladores del operón *gcf*.
3. **Análisis de la regulación.**- Evaluar la expresión de *gcf* en diferentes condiciones de crecimiento *in vitro* y dentro del hospedero.

6.- MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.- Cepas y condiciones de crecimiento.

Todas las cepas bacterianas y plásmidos utilizados se enlistan en la **Tabla 4**. Los preinóculos bacterianos se crecieron en 5 ml de medio Luria-Bertani (LB: 10 g/l de triptona de caseína, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl, pH 7.5) a 37°C con agitación durante la noche. Luego, se inocularon 100 µl de los preinóculos en 5 ml de medio LB, medio mínimo-N [MM-N: KCl 5 mM, (NH₄)₂SO₄ 7.5 mM, K₂SO₄ 0.5mM, KH₂PO₄ 1mM, MgCl₂ 200 µM, casa-aminoácidos 0.1 g/l y 0.5% de glucosa] o DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle’s Medium”, Gibco). A menos que se indique lo contrario, todos los cultivos se crecieron a 37°C con agitación por 12 h. Para el crecimiento en medio sólido, los medios de cultivo se adicionaron con 1.5 % de agar. Cuando se indica, se agregaron los antibióticos ampicilina (Ap, 100 µg/ml); kanamicina (Km, 25 µg/ml) y tetraciclina (Tc, 15 µg/ml).

6.2.- Técnicas de manipulación de ADN.

Las procedimientos de digestión enzimática, ligación, transformación y electroforesis en geles de agarosa se llevaron a cabo siguiendo los procedimientos estándar descritos por Sambrook *et al.* (1989). Todas las enzimas modificadoras de ADN se obtuvieron de Invitrogen (Carlsbad) o Fermentas (Pittsburgh, PA) y se usaron siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Tabla 4.- Cepas y plásmidos utilizados.

<i>C. rodentium</i> cepa	Genotipo	R^a	Ref^b
DBS100	<i>C. rodentium</i> DBS100 silvestre	No	Schauer y Falkow, 1993
JPCR1	DBS100 $\Delta hns1::Km^c$	Km	Este estudio
JPCR2	DBS100 $\Delta hns2::Km^c$	Km	Este estudio
JPCR3	DBS100 $\Delta hns3::Km^c$	Km	Este estudio
JPCR4	DBS100 $\Delta stpA::Km^c$	Km	Este estudio
JPCR5	DBS100 $\Delta ler::Km^c$	Km	Este estudio
JPCR6	DBS100 $\Delta gcfA::Km^c$	Km	Este estudio
JPCR7	DBS100 <i>hns1::3xFLAG-Km^d</i>	Km	Este estudio
JPCR8	DBS100 <i>hns2::3xFLAG-Km^d</i>	Km	Este estudio
JPCR9	DBS100 <i>hns3::3xFLAG-Km^d</i>	Km	Este estudio
JPCR10	DBS100 <i>stpA::3xFLAG-Km^d</i>	Km	Este estudio
JPCR11	DBS100 <i>ler::3xFLAG-Km^d</i>	Km	Este estudio
JPCR12	DBS100 <i>gcfA::3xFLAG-Km^d</i>	Km	Este estudio
JPCR13	JPCR1 $\Delta hns1^e$	No	Este estudio
JPCR14	JPCR13 <i>gcfA::3xFLAG-Km $\Delta hns1$</i>	Km	Este estudio
<i>E. coli</i> cepa	Descripción	R^a	Ref^b
MC4100	F ⁻ <i>araD139 Δ(argF-lac)U169 rpsL150 relA1 flb5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	No	Casadaban, 1976
JPMC1	MC4100 $\Delta hns::Km$	Km	Barba <i>et al.</i> 2005
DH5 α	F ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ-</i>	No	Grant, <i>et al.</i> 1990
BL21	F ⁻ <i>dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal</i>	No	Stratagene
Plásmido	Descripción	R^a	Ref^b
pKD4	Templado con el casete de resistencia a kanamicina	Ap, Km	Datsenko y Wanner, 2000
pKD46	Contiene el sistema de la recombinasa λ -Red bajo el promotor de <i>araB</i> .	Ap	Datsenko y Wanner, 2000
pSUB11	Templado con el epítotope 3xFLAG y el casete de kanamicina	Ap, Km	Uzzau <i>et al.</i> 2001
pCP20	Codifica para la recombinasa FLP	Ap	Datsenko y Wanner, 2000
pKK232-8	Derivado de pBR322 que contiene el gen reportero <i>cat</i> sin promotor	Ap	Pharmacia Biotech
pMPM-T3	Vector de clonación de bajo número de copias derivado del p15A	Tc	Mayer, 1995
pT3- <i>hns</i>	pMPM-T3 que codifica para la H-NS de <i>E. coli</i> K12	Tc	Bustamante, <i>et al.</i> 2001

pMDH-NS	Codifica para la proteína H-NS de <i>E. coli</i> K12 etiquetada con Myc-6XHis	Ap	De la Cruz <i>et al.</i> 2007
pCS26-Pac	Contiene el operón <i>lux</i> de <i>Photobacterium luminescens</i> sin promotor	Km	Bjarnason <i>et al.</i> 2003
pKK-gcf1	Fusión <i>gcf-cat</i> (contiene la región entre las posiciones -93 a +873 con respecto al inicio de la transcripción del operón)	Ap	Este estudio
pKK-gcf2	Fusión <i>gcf-cat</i> de +250 a +873	Ap	Este estudio
pKK-gcf3	Fusión <i>gcf-cat</i> de +500 a +873	Ap	Este estudio
pKK-gcf4	Fusión <i>gcf-cat</i> de -93 a +185	Ap	Este estudio
pKK-gcf5	Fusión <i>gcf-cat</i> de +892 a +1657	Ap	Este estudio
pKK-gcf6	Fusión <i>gcf-cat</i> de -93 a +27	Ap	Este estudio
pKK-gcf7	Fusión <i>gcf-cat</i> de +10 a +185	Ap	Este estudio
pKK-gcf8	Fusión <i>gcf-cat</i> de -93 a +104	Ap	Este estudio
pCS26-gcf	Fusión <i>gcf-lux</i> de -93 a +185	Km	Este estudio
pCS26-LEE2	Fusión que contiene el promotor de <i>LEE2</i> fusionado al operón <i>lux</i>	Km	Alejandro Huerta

^a, Resistencia a antibióticos: Km, Kanamicina; Ap, ampicilina; Tc, tetraciclina; No, sin resistencia; ^b, Referencia o fuente; ^c, Eliminación de los genes indicados con la inserción del casete de kanamicina; ^d, Cepas que expresan la proteína correspondiente fusionada a un epítoto FLAG triple; ^e, Cepa derivada tras la eliminación del casete de kanamicina.

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

Todos los oligonucleótidos usados (**Tabla 5**) se diseñaron con el software “IDT-DNA oligo analyzer” (www.idtdna.org) y se sintetizaron en la Unidad de Síntesis de ADN del Instituto de Biotecnología-UNAM. Las reacciones de PCR se prepararon con 100 ng de ADN molde, 5 µl de amortiguador de reacción 1X (Fermentas), 40 pmol de cada oligonucleótido (directo y reverso), 200 µM de dNTPs, 5 mM de MgCl₂, 1 µl de Taq polimerasa (Fermentas) y agua libre de nucleasas hasta completar 50 µl. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador “PCR system 9700” (Applied Biosystems) con las siguientes condiciones: 5 min a 94°C; 35 ciclos de 94°C-30 s, 55°C-30 s y 72°C-1 min; y una extensión final de 10 min a 72°C.

Tabla 5.- Oligonucléotidos empleados.

Oligo	Secuencia 5'-3' (Sitio restricción)	Uso
Oligos para fusiones transcripcionales		
CfbA-Rv	AACCCA <u>AAGCTT</u> GAACAACCAACGAGGAAAGAAG (HindIII)	Fusiones <i>gcf1-cat</i> , <i>gcf2-cat</i> y <i>gcf3-cat</i>
3691-Fw	GCTTTT <u>GGATCC</u> TACCAGTGGCCTGTATAAAG (BamHI)	<i>gcf2-cat</i> y confirmación $\Delta gcfA::Km$
3681-Fw	TGCCAT <u>GGATCC</u> TCTTAATAAAGAAGAAGTGC	<i>gcf3-cat</i>
Mch-Fw	GAGTA <u>GGATCC</u> CTGAATTACCCAAAAGCGCATTAC	<i>gcf1-cat</i> , <i>gcf4-cat</i> , <i>gcf6-cat</i> y <i>gcf8-cat</i>
3691-Rv	CACCAA <u>AAGCTT</u> CGTTGATTCCTGCACATGT	<i>gcf4-cat</i> y <i>gcf7-cat</i>
CfbA-Fw	GAGTTT <u>GGATCC</u> CGCTATGGCTATTGACGGTAC	<i>gcf5-cat</i> y confirmación <i>gcfA::3xFLAG</i>
CfbB-Rv	ATGAAG <u>AAGCTT</u> GAAAACGACTGGAAGGATGTAAG	<i>gcf5-cat</i> y confirmación $\Delta gcfA::Km$ y <i>gcfA::3xFLAG</i>
b4.1-Rv	GTGAT <u>AAGCTT</u> GCTGAGAGTAGG	<i>gcf6-cat</i>
b4.1-Fw	GGTGAT <u>GGATCC</u> TACTCTCAGCAAGATTATC	<i>gcf7-cat</i>
b4.3-Rv	CAGAGCT <u>AAGCTT</u> CATCACAACAGTATTCAGG	<i>gcf8-cat</i>
Mch-Fw2	GAGTA <u>CTCGAG</u> CTGAATTACCCAAAAGCGCATTAC (XhoI)	<i>gcf-lux</i>
3691-Rv2	CACCA <u>GGATCC</u> CGTTGATTCCTGCACATGT	<i>gcf-lux</i>
Oligos mutagénicos		
D-HNS1-Fw	CTCTATTATTAGCTCAACAACCCCAATATAAGT TTGAGATTACTACATGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	$\Delta hns1::Km$
D-HNS1-Rv	GGGGCAAAAAAATCCCGCGCGAGGCGGGATTTCTT GCAGGCTGTTTGCTGACATATGAATATCCTCCTTAG	$\Delta hns1::Km$
D-HNS2-Fw	GCATACATTATTTTTATTAATCGCCCTTTTAAAACAC CGGACAACATACTTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	$\Delta hns2::Km$
D-HNS2-Rv	GAACCTGTTTCAGGTAGCAGGCTCTACCAGAGAAAAT CAGAGTTAATACAAGCATATGAATATCCTCCTTAG	$\Delta hns2::Km$
D-HNS3-Fw	AAGTTCCCTCCGGCGTCTGGAAGTACGTCCACTAA ACAAGAGGATTAATTTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	$\Delta hns3::Km$
D-HNS3-Rv	GTCCCCTCCATTTGCCGTCGAACTTGTTTGCGAC GGCATCACGATTATTCATATGAATATCCTCCTTAG	$\Delta hns3::Km$
D-StpA-Fw	TACACTACCCGGCGTAATACAAATTTTAGCGTTATA AGGTTTTAATTATTTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	$\Delta stpA::Km$
D-StpA-Rv	ATAACAAACGCCGTAATAATATGCCGGTGAAGGATAACC TCACCGCCCGGGTGACATATGAATATCCTCCTTAG	$\Delta stpA::Km$

D-Ler-Fw	TTGACCCATCCATGTAAGGATGAGCTTGTTAATATCT TAATATATAAAAGTTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	$\Delta ler::Km$
D-Ler-Rv	TTATTATTTTCATCTTCCAGTTCAGTTATCGTTATCATT TAATTATTTTCATGCATATGAATATCCTCCTTAG	$\Delta ler::Km$
D-CfbA-Fw	TTAATCAGATAAGGATTTTTATGAAAAAAGTACTTCT TTCCTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	$\Delta gcfA::Km$
D-CfbA-Rv	GTACTCAATACAAGCGCGGTATTACTCGTAGTCGAT CGAGTACATATGAATATCCTCCTTAG	$\Delta gcfA::Km$

Oligos para etiquetado cromosomal

HNS1-FLAG-Fw	AAAGCAATGGAAGAGCAAGGTAACAGCTGGAAGAT TTCCTGATCAAGGAAGACTACAAAGACCATGACGG	H-NS1-3xFLAG
HNS1-FLAG-Rv	GGGGCAAAAAAATCCC CGCGC GAGGCGGGATTTCTT GCAGGCTGTTTGCTGACATATGAATATCCTCCTTAG	H-NS1-3xFLAG
HNS2-FLAG-Fw	GCGATCGCTGCTGCTATCGAAGCTGGTAAACACTG GAAGACTTCGCGATCGACTACAAAGACCATGACGG	H-NS2-3xFLAG
HNS2-FLAG-Rv	GAACCTGTT CAGGTAGCAGGCTCTACCAGAGAAAAT CAGAGTTAATACAAGCATATGAATATCCTCCTTAG	H-NS2-3xFLAG
HNS3-FLAG-Fw	CATTTTCATGGAAGATTTCTCATTGACAAACTGCAAC CTGGGCAGGTTGAAGACTACAAAGACCATGACGG	H-NS3-3xFLAG
HNS3-FLAG-Rv	GTCCCCTCCATTTGCCGTGCGAACTTGTTTGCGAC GGCATCACGATTATTCATATGAATATCCTCCTTAG	H-NS3-3xFLAG
StpA-FLAG-Fw	CCGATCGCCAGAGCGCTGGCTGAAGGAAAATCTCT CGACGATTTCTGATCGACTACAAAGACCATGACGG	StpA-3xFLAG
StpA-FLAG-Rv	ATAACAAACGCCGTAATAATATGCGGTGAGGATAACC TCACCGCCCGGGTGACATATGAATATCCTCCTTAG	StpA-3xFLAG
Ler-FLAG-Fw	GATTTTCTTGTGAAGGACACAGAAGAAGAAGTAACA TCTCTGAATAACATTGACTACAAAGACCATGACGG	Ler-3xFLAG
Ler-FLAG-Rv	TTATTATTTTCATCTTCCAGTTCAGTTATCGTTATCATT TAATTATTTTCATGCATATGAATATCCTCCTTAG	Ler-3xFLAG
CfbA-FLAG-Fw	GGTGACGTACAGAGCTCTGTGACTTACTCGATCGAC TACGAGGACTACAAAGACCATGACGG	GcfA-3xFLAG
CfbA-FLAG-Rv	AACAGGGAAACCGAAGTTCCTGTACTCAATACAAGC GCGGTACATATGAATATCCTCCTTAG	GcfA-3xFLAG

Oligos para confirmar cepas mutantes o etiquetadas

HNS1-Fw	GGCTATTGCACATCTGAATTTAACG	$\Delta hns1::Km$ y $hns1::3xFLAG$
HNS1-Rev	CCCTCATTTTACTCTTCAGC	$\Delta hns1::Km$ y $hns1::3xFLAG$
HNS2-Fw	GGGaTGTTTTGACTGTACAAC	$\Delta hns2::Km$ y $hns2::3xFLAG$
HNS2-Rev	CTACGACATGGATAATCTGGCA	$\Delta hns2::Km$ y $hns2::3xFLAG$

HNS3-Fw	GAGATTAACCGTTACAAGCTGC	$\Delta hns3::Km$ y <i>hns3::3xFLAG</i>
HNS3-Rev	GTCCCTCTTTATCAAACGAT	$\Delta hns3::Km$ y <i>hns3::3xFLAG</i>
StpA-Fw	GATAGCCTGTCGGATGGAGTCTG	$\Delta stpA::Km$ y <i>stpA::3xFLAG</i>
StpA-Rev	CTCGACAAAATGCCGTGGAACC	$\Delta stpA::Km$ y <i>stpA::3xFLAG</i>
Ler-Fw	GGTTTTGTATGATGAAGTAG	$\Delta ler::Km$ y <i>ler::3xFLAG</i>
Ler-Rev	GTAAGTGACCTTATCCAAAG	$\Delta ler::Km$ y <i>ler::3xFLAG</i>
3681-HIII-Fw	TATTTTGCAGTTTGTGCATAACGA	$\Delta gcfA::Km$ <i>gcfA::3xFLAG</i>
K1-Rev	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	casete de kanamicina
K2-Fw	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	casete de kanamicina

Oligos para "RT-PCR"

RT-3691-Fw	CATTACCAGTGGCCTGTATAAAG	<i>gcfFGA</i>
cfbA-Rev	AACCCA AAGCTT GAACAACCAACGAGGAAAGAAG	<i>gcfFGA</i>
cfbA-Fw	GAGTTT GGATCC CGCTATGGCTATTGACGGTAC	<i>GcfAB</i>
RT-cfbB-Rv	GGAAAACGACTGGAAGGATGTAAG	<i>GcfAB</i>
RT-cfbB-Fw	GCTAAGGTCAGCCTGATTGAATC	<i>GcfBC</i>
RT-cfbC-Rv	CAGCGATCGTCCCAACTGTAAG	<i>GcfBC</i>
RT-cfbC-Fw	GCATCTGTTAAGGATAGCAAGG	<i>gcfCDE</i>
RT-cfbE-Rv1	CATATACAGTTCAGTGTATCAG	<i>gcfCDE</i>

Oligos para mutagénesis sitio dirigida

-10mut-Fw	GTAAAAATTACATTCATGAACAGTATTTTGCCAGG GGGAAGCC	Caja -10 <i>gcfF-P1</i>
-10mut-Rv	GGCTTCCCCCTGGCAAATACTGTTCATGAATGTGA ATTTTAAAC	Caja -10 <i>gcfF-P1</i>
-35mut-Fw	ATGAATTTGGATTTTATTCTAGGGAGTTAAAAATTCA CATT	Caja -35 <i>gcfF-P1</i>
-35mut-Rv	GAATGTGAATTTTAACTCCCTAGAATAAAATCCAAA TTCAT	Caja -35 <i>gcfF-P1</i>

Oligo para "Primer extensión"

pKK-Seq-I	CAACGGTGGTATATCCAGTG	"Primer extensión"
-----------	----------------------	--------------------

6.4.- Construcción de fusiones transcripcionales

Las diferentes regiones del operón *gcf*, utilizadas para generar las fusiones transcripcionales al gen reportero *cat* (**Figura 10**), se amplificaron por PCR utilizando ADN genómico de *C. rodentium* y las parejas de oligonucleótidos señaladas en la **Tabla 5**.

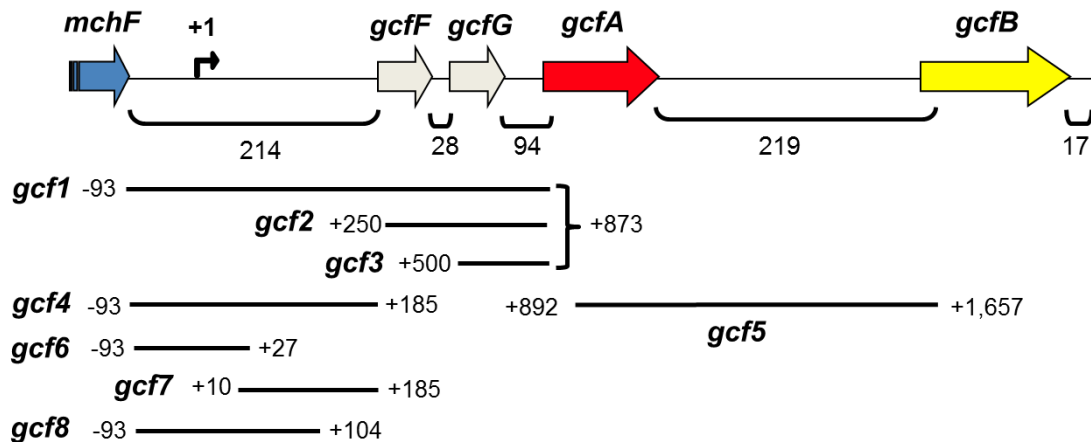


Figura 10.- Fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*. Diagrama de las fusiones *gcf-cat* generadas. Las flechas indican secuencias codificantes y las líneas regiones intergénicas con su respectiva longitud en pb. Las líneas debajo de las flechas representan las regiones de ADN (*gcf1* a *gcf8*) utilizadas para generar fusiones a *cat* o para los ensayos tipo “EMSA”. Las coordenadas se indican con respecto al sitio de inicio de la transcripción (+1) de *gcf*.

Los productos de PCR se purificaron con el estuche comercial “PCR clean up” (Axygen) y se digirieron con las enzimas BamHI y HindIII (Fermentas) durante 4 h a 37°C. Luego, se mezclaron ~300 ng de los productos de PCR digeridos con ~100 ng del vector pKK232-8, previamente digerido con las mismas enzimas de restricción, y se ligaron usando 1 unidad de ADN ligasa T4 (Promega) durante toda la noche a 16°C. Las ligaciones se transformaron por electroporación a células electrocompetentes de *E. coli* DH5α y las transformantes se seleccionaron en agar LB adicionado con Ap.

De manera similar, para generar la fusión *gcf-lux* (**Tabla 4**) se amplificó por PCR la misma región de ADN que para la fusión *gcf4* (**Figura 10**), pero en este caso, utilizando oligonucleótidos con sitios de restricción para las enzimas XhoI

(directo) y BamHI (reverso) (**Tabla 5**). Los productos de PCR obtenidos se clonaron, como se describe en el párrafo anterior, en el vector pCS26-Pac que contiene el operón *lux* sin promotor. Las transformantes se seleccionaron en agar LB adicionado con Km.

Todos los plásmidos recombinantes generados (**Tabla 4**) se aislaron mediante el estuche comercial “High Pure Plasmid Kit” (Roche) y se secuenciaron en la “Unidad de Síntesis y Secuenciación de ADN” del Instituto de Biotecnología (UNAM). Las secuencias obtenidas se analizaron mediante el software “Bioedit” para corroborar la correcta clonación de los fragmentos. Finalmente, las construcciones se transformaron en las cepas de *C. rodentium* o *E. coli* de interés.

6.5.- Obtención de cepas mutantes y etiquetadas

Las cepas mutantes de *C. rodentium* DBS100 (**Tabla 4**) generadas en este estudio se obtuvieron mediante el método de mutagénesis con productos de PCR descrito por Datsenko y Wanner (2000), mientras que las cepas etiquetadas en el cromosoma (**Tabla 4**) se obtuvieron por el método de etiquetado cromosomal de genes de Uzzau *et al* (2001). En ambos casos se utilizaron parejas de oligonucleótidos específicos (**Tabla 5**) para amplificar por PCR el casete de kanamicina de los plásmidos pKD4 (usado para generar las cepas mutantes) o pSUB11 (para etiquetar genes cromosomales con la secuencia que codifica el epítipo 3xFLAG). Por cada gen a mutar o etiquetar se concentró el producto de cinco reacciones de PCR de 100 µl utilizando el protocolo de extracción con fenol-cloroformo (Sambrook *et al.* 1989) y se resuspendió en un volumen final de 7 µl de agua libre de nucleasas estéril para su posterior electroporación.

La cepa de interés se transformó con el plásmido pKD46 y se creció a 30°C con agitación en 50 ml de LB adicionado con 100 mM de L-(+)-Arabinosa. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica (D.O.) de 0.6 a 0.8 se prepararon células electrocompetentes y se electroporaron con 3 µl del producto de PCR correspondiente. Las transformantes se seleccionaron en agar LB adicionado con Km. Las colonias obtenidas se rayaron en cajas de agar LB suplementado con Km

o Ap y se incubaron toda la noche a 42°C para eliminar el plásmido termosensible, pKD46. Este paso se repitió varias veces hasta obtener colonias con fenotipo Km^R y Ap^S. Finalmente, las inserciones se confirmaron por PCR usando oligonucleótidos que reconocen secuencias aledañas a los sitios de inserción y otros específicos para el gen de resistencia a kanamicina (**Tabla 5**).

Para eliminar el casete de kanamicina, las cepas mutantes o etiquetadas se transformaron con el plásmido pCP20 que codifica la recombinasa FLP. Las transformantes se seleccionaron en agar LB con Ap. Las colonias obtenidas se rayaron en cajas con agar LB sin antibiótico y con Km o Ap. Después de varios pases, se seleccionaron las colonias sensibles a ambos antibióticos. Finalmente, la pérdida del casete de kanamicina se confirmó por PCR con oligonucleótidos que reconocen secuencias aledañas a los sitios de inserción iniciales (**Tabla 5**).

6.6.- Ensayos de actividad de la cloranfenicol acetil-transferasa (CAT)

La determinación de la actividad enzimática de CAT a partir de extractos de cepas conteniendo las fusiones transcripcionales generadas se realizó por el método descrito por Puente *et al.* (1996). Para esto, los preinóculos de las cepas conteniendo las fusiones se inocularon en tubos con 5 ml de medio LB, DMEM o MM-N y los cultivos se incubaron a 37°C con agitación durante 12 h. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 1.5 ml de cada cultivo y se centrifugaron a 12,000 rpm por 3 min. Las pastillas celulares se lavaron con 800 µl de amortiguador TDTT (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, DTT 3 µM) y se resuspendieron en 300 µl de la misma solución. Las suspensiones bacterianas se sonicaron durante 3 min en un equipo “Soniprep 150” (Vibra Cell) a una amplitud de 36% con pulsos activos de 9.9 s y descansos de 4.5 s entre cada pulso. Las muestras sonicadas se centrifugaron a 14,000 rpm por 5 min y se recuperó el sobrenadante, el cual se utilizó para la cuantificación de proteínas totales y para determinar la actividad enzimática de CAT, como se describe a continuación.

La concentración de proteínas se determinó con el estuche comercial “BCA Protein Assay Reagent” (Pierce) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Brevemente, se agregaron 10 µl de cada muestra por duplicado en pozos independientes de una placa de ELISA de 96 pozos (Costar). A cada pozo se le adicionó 200 µl de una mezcla de reacción preparada con los reactivos del estuche “BCA” (25 ml del reactivo A y 500 µl del reactivo B). La placa se incubó a 37°C por 30 min y luego se analizó en el lector de microplacas “CERES 900 C” (Bio-Tek) utilizando el programa predeterminado KC3-Protodos.

Para determinar la actividad enzimática de CAT, se cargaron 5 µl de las muestras por duplicado en otra placa de 96 pozos y se adicionaron 200 µl de la mezcla de reacción (acetil-CoA 0.1 mM, cloranfenicol 0.1mM y 5,5'-ditio-bis 2-ácido nitrobenzónico 1 mM). Las placas se analizaron inmediatamente en el mismo lector de microplacas pero usando el programa KC3-Catodos. Finalmente, la actividad específica de CAT se determinó dividiendo la actividad enzimática obtenida entre la concentración de proteína de cada extracto.

6.7.- Mutagénesis sitio dirigida

La mutagénesis de las cajas -35 y -10 del promotor *gcf-P1* se llevó a cabo con el estuche comercial basado en PCR “QuikChange” (Stratagene), siguiendo las recomendaciones del fabricante y utilizando como molde los plásmidos pKK-b4 o pKK-b10, así como las parejas de oligonucleótidos descritos en la **Tabla 5**.

Los plásmidos mutantes generados se transformaron en *E. coli* DH5α y las transformantes se seleccionaron en agar LB con Ap. Cada mutación se verificó mediante secuenciación de los plásmidos correspondientes, aislados de al menos 5 colonias seleccionadas al azar. Finalmente, las construcciones se transformaron en los fondos genéticos de *C. rodentium* de interés.

6.8.- Extracción de ARN y “RT-PCR”

Para llevar a cabo la extracción del ARN, las bacterias se crecieron a 37°C con agitación durante 4 h en matraces conteniendo 50 ml de LB, DMEM o MM-N. Se colectaron 20 ml de los cultivos y se centrifugaron a 6,000 rpm durante 10 min. Las pastillas celulares obtenidas se utilizaron para extraer ARN empleando el

reactivo “TRIzol reagent” (Life Technologies) como indica el inserto del producto. La concentración y la calidad del ARN se determinaron midiendo la absorbancia a 260/280 nm en el equipo “NanoDrop 2000” (Thermo Scientific) y por electroforesis en geles de agarosa al 1%. El ARN purificado se trató durante 30 min a 37°C con 1 U de desoxiribonucleasa I (DNAsa I, Thermo Scientific) por cada μl de ARN, esto para eliminar ADN remanente.

Los ensayos de “RT-PCR” para amplificar las diferentes regiones del operón *gcf* se realizaron con el estuche comercial “One Step Superscript II Reverse-transcriptasa” (Invitrogen). Para esto se usó 1 μg de ARN total tratado con DNAsa y las parejas de oligonucleótidos correspondientes (**Tabla 5**). Adicionalmente, se incluyeron reacciones sin transcriptasa reversa o con ADN genómico, como controles negativo y positivo, respectivamente.

6.9.- “Primer extension” y secuenciación tipo “Sanger”

Los experimentos de “primer extension” se llevaron a cabo con ARN total extraído de la cepa de *C. rodentium* $\Delta\text{hns1}::\text{Km}$ con el plásmido pKK-b4 o pKK-b10 (**Tabla 4**). Para esto, 10 pmol del oligonucleótido pKK-Seq-I, que alinea a 70 pb del sitio de policonación del plásmido pKK232-8, se etiquetó radioactivamente con $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ utilizando la enzima T4 polinucleótido quinasa (Invitrogen) siguiendo el protocolo del fabricante. Posteriormente, se mezclaron ~ 15 μg de ARN total, 1 pmol del oligonucleótido marcado (^{32}P -pKK-Seq-I), 2 μl de NaCl 5M, 1 μl de Tris-HCl 1 M (pH 8.0) y agua libre de ribonucleasas hasta completar 30 μl . Las mezclas se calentaron a 90°C por 3 min, se enfriaron lentamente hasta alcanzar 50°C y se retrotranscribieron con 1 U de la enzima “MLV reverse transcriptase” (Invitrogen), esto durante 2 h a 37°C. El ADN complementario (ADNc) generado se precipitó con 1 ml de butanol, se resuspendió en 4 μl de solución de paro “IR²” (USB, Cleveland, OH), se calentó a 95°C por 5 min y se separó por electroforesis en un gel de secuencia (acrilamida 8%, urea 7 M). El gel se secó al vacío a 80°C por 1h y posteriormente se expuso a una película fotográfica Kodak. El revelado de las películas se llevó a cabo por técnicas estándar usando reactivos Kodak.

Para las reacciones de secuenciación se usó el mismo oligonucleótido marcado (^{32}P -pKK-Seq-I), el plásmido pKK-b4 como templado y el estuche de secuenciación basado en PCR “Thermo-Sequenase” (USB, Cleveland, OH), el cual se utilizó según las recomendaciones del fabricante. Las reacciones obtenidas (escalera de secuenciación) se separaron en el mismo gel en posiciones adyacentes a las muestras de “primer extensión”, por lo que se expusieron y revelaron junto con estas.

6.10.- Ensayos de “Western blot”

Para estos ensayos se inocularon 100 μl de los preinóculos bacterianos deseados en 5 ml de LB, DMEM o MM-N. Los cultivos se incubaron a 37°C con agitación durante 4 h y se determinó la D.O. a 600 nm. Luego, se centrifugó 1 ml de cada cultivo a 12,000 rpm por 3 min y las pastillas se resuspendieron en solución de lisis (1.25 ml de glicerol 100%, 0.5 ml de SDS 20%, 0.25 ml de β -mercaptoetanol, 0.625 ml de Tris-HCl 1M pH 6.8 y 0.1 g de azul de bromofenol), calculando el volumen requerido para cada pastilla con base en la D.O. del cultivo correspondiente (μl de solución de lisis= D.O. del cultivo x 100). Las mezclas se calentaron a 95°C por 10 min y los lisados celulares obtenidos se separaron por electroforesis en un gel SDS-PAGE al 12% (acrilamida 30%, bisacrilamida 0.8%) en cámaras verticales conteniendo amortiguador Tris-Glicina (Tris base 2.5 mM, glicina 19.2 mM, SDS 0.1% pH 8.3).

Las proteínas se transfirieron del gel a una membrana de nitrocelulosa (Amersham) a 19 V por 45 min empleando una cámara de transferencia semi-seca (Bio-Rad) conteniendo amortiguador de transferencia (Tris base 2.5 mM, glicina 19.2 mM y metanol 20%). La membrana obtenida se lavó con PBS 1X (80 g/l de NaCl, 6.1 g/l de Na_2HPO_4 , 2 g/l de KH_2PO_4 , 2 g/l de KCl, pH7.4) y posteriormente se incubó con una solución de bloqueo (PBS 1X, 0.1% de Tween-20 y 5% de leche descremada en polvo) durante 90 min con agitación a temperatura ambiente. La membrana se lavó tres veces con amortiguador PBS-T (PBS 1X, Tween-20 0.1%), se transfirió a un recipiente con la misma solución pero

adicionada con el anticuerpo primario a la dilución recomendada (α -DnaK, 1:20,000; α -FLAG, 1:5,000) y se incubó durante 1 h con agitación a temperatura ambiente. Se lavó de nuevo tres veces con PBS-T, se incubó otra hora con el anticuerpo secundario α -IgG de ratón acoplado a peroxidasa a una dilución de 1:10,000 y se volvió a lavar.

La detección de la señal en la membrana se realizó con el estuche comercial “Western Lightning” (PerkinElmer), según las indicaciones del proveedor. La membrana se cubrió con acetatos por ambos lados y se expuso a una película fotográfica (Kodak) durante 1-5 min. El revelado de las películas se llevó a cabo por técnicas estándar usando reactivos Kodak.

6.11.- Purificación de la proteína H-NS-MycHis y ensayos de retardo en la movilidad electroforética (“EMSA”)

La proteína H-NS, etiquetada en su extremo C-terminal con el epítipo Myc y seis residuos de Histidina (H-NS-Myc-6xHis), se purificó en condiciones desnaturalizantes a partir de la cepa de *E. coli* BL21 conteniendo el plásmido pMDH-NS (**Tabla 4**). Esto se realizó mediante cromatografía de afinidad con una resina de Niquel-ácido nitrilotriacético (QIAExpress, Qiagen) siguiendo el protocolo descrito previamente por De la Cruz *et al.* (2007). La proteína purificada se evaluó cualitativamente en geles de acrilamida al 12% y cuantitativamente mediante el método de Bradford. Las muestras de proteína se almacenaron a -70°C.

Para los ensayos de “EMSA” se utilizaron los mismos fragmentos del operón *gcf* usados para generar las fusiones transcripcionales a *cat* (**Figura 10**). Dichas regiones se amplificaron por PCR a partir del ADN genómico de *C. rodentium* usando los oligonucleótidos señalados en la **Tabla 5**. Posteriormente, se mezclaron en amortiguador de unión (HEPES 40 mM, MgCl₂ 8 mM, KCl 50 mM, DTT 1 mM, Nonidet P-40 0.05% y BSA 0.1 mg/ml) ~100 μ g de los productos de PCR purificados con diferentes concentraciones (0 a 800 nM) de la proteína H-NS-Myc-6xHis purificada. Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min y luego se separaron por electroforesis en geles de acrilamida nativos al 6% usando amortiguador TBE (Sambrook, *et al.* 1989) como amortiguador de

corrida. Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se fotografiaron con ayuda de un fotodocumentador de luz UV. Como control negativo se usó una región estructural del gen *ecpR* de *C. rodentium*, el cual no muestra unión a H-NS en este tipo de ensayos (Martínez-Santos *et al.*, 2012).

6.12.- Ensayos de colonización en ratón

Los inóculos bacterianos utilizados para la infección de ratones se prepararon como se describe a continuación. Cultivos de *C. rodentium* DBS100 silvestre, $\Delta gcfA::Km$ y $\Delta ler::Km$ (**Tabla 4**), crecidos durante la noche, se inocularon 1:100 en 50 ml de medio LB fresco y se incubaron a 37°C con agitación hasta alcanzar una D.O. de ~1.2. Se tomaron 500 μ l y se centrifugaron a 8,000 rpm durante 5 min a 4°C. Las pastillas celulares obtenidas se lavaron 2 veces con PBS 1X estéril frío, se resuspendieron en 2 ml del mismo amortiguador y se hicieron alícuotas de 200 μ l para cada suspensión bacteriana. Para determinar las unidades formadoras de colonias (UFC) presentes en estas suspensiones, una alícuota de 200 μ l de cada cultivo se diluyó en serie y se plaqueó como se describe más adelante. En todos los casos se obtuvieron cuentas bacterianas de $\sim 5 \times 10^7$ UFC. Cuando se indica, se tomó un volumen 10 veces más grande del cultivo inicial (5 ml) o 10 veces más bajo (50 μ l), esto para preparar los inóculos de $\sim 5 \times 10^8$ y $\sim 5 \times 10^6$ UFC, respectivamente.

Los ratones inoculados fueron machos de la línea C57BL/6 de 4 a 5 semanas de edad provenientes de la empresa Harlan, Inc. Los animales se dividieron en 4 grupos (silvestre, $\Delta gcfA$, Δler y PBS) conteniendo 5 ratones cada uno. Cada grupo se mantuvo en jaulas con acceso libre a agua y alimento estériles.

El día de la inoculación, a los ratones se les retiró el alimento por al menos 4 h para vaciar el contenido intestinal. Durante este tiempo, los animales se pesaron y se marcaron de manera individual con 1 a 5 líneas en la cola para su identificación. Luego, cada ratón se inoculó vía oral con los 200 μ l de la alícuota bacteriana correspondiente, para esto se usaron sondas nasogástricas estériles

adaptadas a jeringas de insulina de 1 ml. Como control negativo, se inocularon 5 ratones con 200 μ l de PBS 1X estéril.

Posterior al día de la infección, se tomaron muestras diarias de heces fecales de cada ratón. Para esto, cada mañana los animales se colocaron en cajas individuales estériles (de puntas azules) hasta que defecaron (~1 h). Se colectaron ~50 mg de heces con pinzas de metal estériles (flameadas) en una campana de flujo laminar. Las muestras se resuspendieron en tubos "Eppendorf" conteniendo 1 ml de PBS 1X, los cuales fueron pesados antes y después de agregar las muestras fecales.

Para determinar el número de bacterias presentes en las heces, las suspensiones fecales se diluyeron de forma serial en PBS 1X hasta una dilución 10^{-7} y se colocó una gota (5 μ l) de cada muestra en el medio selectivo agar McConkey (GIBCO). Las cajas se incubaron a 37°C toda la noche y, posteriormente, se contaron las colonias de *C. rodentium* obtenidas en cada dilución, cuya morfología corresponde a colonias pequeñas, guindas y brillantes. Adicionalmente, para confirmar la identidad de las colonias de *C. rodentium* obtenidas a partir de las heces fecales, se realizaron reacciones de PCR para amplificar la región reguladora del operón *gcf* (con los oligos Mch-Fw y CfbA-Rv), así como la secuencia de la región estructural del gen *ler* (con Ler-Fw y Ler-Rv), usando como molde ADN extraído de al menos dos colonias colectadas a diferentes días post-inoculación.

El cálculo de las UFC se realizó mediante la fórmula: $\text{UFC/ml} = \text{No. de colonias} \times (1/\text{Factor de dilución}) \times (1/\text{Volumen de la alícuota en ml})$. El valor obtenido se dividió entre el peso en gramos de la muestra fecal correspondiente para obtener así las UFC/g de heces de cada ratón

Durante el curso de todo el experimento, se cambió diariamente el aserrín de las cajas para evitar una posible reinfección de los ratones. El peso de los animales también se monitoreó todos los días como un indicativo de su estado físico. Al término del experimento, los ratones fueron sacrificados por inhalación de CO₂ y posterior dislocación cervical. Además, los animales que perdieron más del 20% de su peso inicial durante el curso del experimento o que presentaron

problemas de movilidad y/o cambios de comportamiento, fueron sacrificados para evitar el sufrimiento innecesario de los animales. Los protocolos descritos fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Biotecnología de la UNAM y realizados siguiendo sus recomendaciones.

6.13.- Detección de bioluminiscencia bacteriana en ratones infectados

Para determinar la expresión del promotor de *gcf* dentro del ratón se generó una fusión transcripcional al sistema reportero *lux* de *Photobacterium luminescens*; para esto, la región intergénica río arriba del gen *gcfF* se amplificó por PCR utilizando oligonucleótidos específicos (**Tabla 5**) y se clonó en el plásmido pCS26-Pac que contiene el operón *lux* sin promotor, tal como se describe en el **Apartado 6.4** para las fusiones a *cat*.

Un día antes de la inoculación, los ratones se anestesiaron vía intraperitoneal con 0.1 ml por gramo de peso de una mezcla de ketamina (12mg/ml) y xilasina (1.5mg/ml), una vez dormidos los animales, se depilaron del abdomen con una crema depiladora comercial para vello grueso y oscuro (marca Nair). Posteriormente, los ratones se separaron en grupos de cuatro animales cada uno y se inocularon vía oral con $\sim 5 \times 10^7$ UFC de la cepa silvestre de *C. rodentium* conteniendo la fusión *gcf4-lux*, *LEE2-lux* o el vector vacío (pCS26-Pac), tal como se describe en el apartado anterior.

Posterior al día de la infección, los ratones se fotografiaron cada tercer día usando el equipo "In-Vivo Xtreme II" (Bruker) en el Laboratorio Nacional de Microscopía Avanzada de la UNAM (Cuernavaca, Morelos). Para esto, cada grupo de animales se anestesió por separado en una cámara de sueño usando una mezcla de 2% de oxígeno medicinal y 1% de isoflurano. Una vez dormidos, los ratones se colocaron dentro del equipo con el abdomen hacia abajo, las patas extendidas y el hocico dentro de los respiradores con flujo del mismo anestésico inhalado, esto para mantenerlos dormidos durante la captura de las imágenes.

Primeramente, se tomó una fotografía de campo claro usando los parámetros por default del equipo, excepto la distancia focal (FOV, por sus siglas en inglés) que se ajustó a 9 cm; luego, se tomaron fotografías de luminiscencia a dos diferentes exposiciones (2 min de exposición a 8x8 pixeles de resolución y 2 min a 4x4 pixeles), ambas con el mismo valor de FOV de las imágenes de campo claro (9 cm). Finalmente, se capturó una imagen de rayos-X con los parámetros por default y el mismo valor de FOV que en los casos anteriores. Las imágenes de luminiscencia obtenidas se ajustaron a una misma escala (en fotones/seg/mm/sq) y se empalmaron sobre las fotografías de rayos-X correspondientes, usando para esto el programa de edición de imágenes “Molecular Imaging” (Bruker). Las imágenes compuestas se guardaron como archivos *.jpeg.

Cuando se indica, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical a diferentes días después de la infección y se disectaron para extraer el tracto gastrointestinal de los mismos, los cuales fueron colocados en PBS 1X y fotografiados inmediatamente en el equipo “In-Vivo Xtreme II” (Bruker) como se indica arriba.

En ambos casos, para evaluar la estabilidad de los plásmidos durante el curso de la infección, se recolectaron muestras de heces de los diferentes grupos de ratones durante los mismos días que se tomaron las fotografías y se determinó el número de UFC por gramo de heces tanto en cajas de agar MacConkey sin antibiótico (para determinar las colonias totales de *C. rodentium*) o adicionadas con kanamicina (para seleccionar solo las colonias conteniendo los plásmidos correspondientes), esto siguiendo el protocolo descrito en el apartado anterior. Se consideró que una determinada cepa perdió el plásmido en cuestión cuando más del 50% de los animales del mismo grupo presentaron cuentas bacterianas al menos dos órdenes de magnitud (~100 veces) menores en las cajas con kanamicina con respecto a las obtenidas en las placas sin antibiótico, en este punto se dejaron de tomar las fotografías y se concluyó el experimento.

7.-RESULTADOS

APARTADO I.- ANÁLISIS FUNCIONAL DE Gcf

7.1.- La fimbria GCF es importante durante las etapas tempranas del proceso de colonización en ratón

Como ya se mencionó, el desarrollo de este trabajo surgió de un antecedente donde se encontró que una cepa mutante por la inserción de un transposón en el gen *gcfB*, que codifica para la proteína chaperona del operón *gcfFGABCDE*, presentó un fenotipo atenuado en colonización en ratón cuando se probó en experimentos de coinfección con otras 95 mutantes (Croxen, M. *et al.*, datos no publicados). Este resultado sugirió que este operón es funcional y que la fimbria codificada por este es importante durante el proceso de colonización. Por lo tanto, para confirmar el posible fenotipo asociado a esta fimbria en experimentos de infección individuales, se generó una cepa mutante no polar afectada en el gen *gcfA* que codifica para la subunidad principal, GcfA.

Tanto con la cepa silvestre como con la mutante *gcfA::Km* (JPCR6), se infectaron vía oral grupos de cinco ratones C57BL/6 y se determinó el número promedio de UFC por gramo de heces de cada grupo de animales hasta los primeros 10 días post-inoculación. Como control negativo en dichos ensayos, se inoculó otro grupo de animales con la mutante Δ *ler::Km* que carece de la proteína Ler, el regulador maestro de la isla LEE que ha sido previamente reportado como esencial durante el proceso de infección en el ratón (Deng *et al.* 2004; Kamada *et al.* 2012).

Durante los primeros 3 días post-inoculación (pi), no se observó ninguna diferencia significativa en las cuentas bacterianas entre los ratones inoculados con la cepa silvestre y la mutante fimbrial; sin embargo, al día 7 pi los animales inoculados con la cepa silvestre de *C. rodentium* mostraron cuentas bacterianas ~3 órdenes de magnitud más altas que las observadas en los ratones infectados con la mutante Δ *gcfA::Km*, dicha diferencia se mantuvo hasta el día 10 pi cuando la cepa silvestre alcanzó sus cuentas máximas en heces (**Figura 11**).

Por otro lado y como se esperaba, la mutante $\Delta/er::Km$ fue incapaz de colonizar eficientemente al ratón y por lo tanto, sus cuentas bacterianas se mantuvieron en niveles bajos, similares a los observados con la mutante fimbrial, durante el curso del experimento (**Figura 11**).

En conjunto, estos resultados indican que la fimbria codificada en el operón *gcfFGABCDE* es importante durante el proceso de colonización en el ratón, aunque queda por determinar en qué etapa específica de dicho proceso participa.

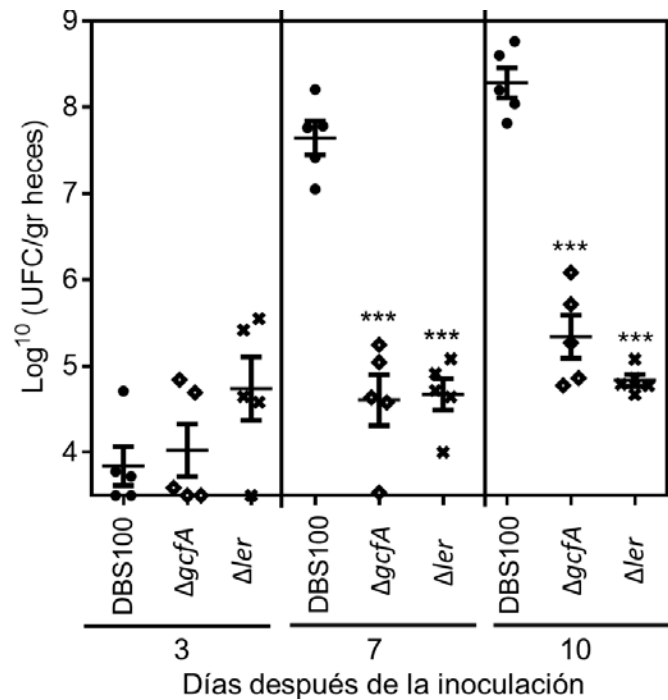


Figura 11.- Ensayos de colonización en ratón con la mutante $\Delta gcfA::Km$. Grupos de cinco ratones machos de la línea C57BL/6 de 4 a 5 semanas de edad se inocularon vía oral con $\sim 5 \times 10^7$ UFC de la cepa silvestre de *C. rodentium* (DBS100) o de las mutantes $\Delta gcfA::Km$ o $\Delta/er::Km$. Se muestran los promedios y errores estándar de las UFC por gramo de heces de cada grupo de ratones en los días posteriores a la inoculación indicados. ***, $P < 0.001$ entre las muestras de *C. rodentium* DBS100 y $\Delta gcfA::Km$. Este es un resultado representativo de al menos tres ensayos independientes.

7.2.- La cinética de colonización de *C. rodentium* es dosis-dependiente.

Como se indicó en el apartado anterior, se observó una clara deficiencia en la capacidad de colonización de la mutante fimbrial con respecto a la cepa silvestre durante los primeros 10 días pi a una dosis de infección de $\sim 5 \times 10^7$ UFC. Teniendo esto en cuenta, se realizaron cinéticas de colonización más largas inoculando a los ratones con diferentes concentraciones de bacterias, esto con el objetivo de evaluar si la deficiencia en colonización de la mutante se mantenía durante las etapas tardías de la infección y si la concentración del inóculo tenía algún efecto en la cinética de colonización por *C. rodentium*.

Grupos de cuatro ratones se inocularon vía oral con la cepa silvestre o la mutante $\Delta gcfA::Km$ utilizando tres concentraciones diferentes del inóculo bacteriano: 5×10^7 UFC (la misma concentración empleada en el experimento anterior), así como una concentración 10 veces más alta (5×10^8 UFC) y otra 10 veces más baja (5×10^6 UFC). Posteriormente, se determinó el número de UFC por gramo de heces de cada grupo de ratones.

En los animales inoculados con la concentración más alta (5×10^8 UFC) la cepa silvestre presentó una cinética de colonización reversible típica como se esperaba, alcanzando sus cuentas máximas en heces entre los días 8 a 10 pi y manteniendo dichos niveles hasta el día 20 cuando a partir del cual comenzaron a decaer. A esta dosis de infección, la mutante $\Delta gcfA::Km$ presentó un claro defecto en su capacidad de colonizar al ratón con respecto a la silvestre; sin embargo, alrededor del día 24 pi, cuando comparativamente la silvestre ya está siendo eliminada del tracto gastrointestinal del hospedero, la mutante alcanzó niveles de cuentas bacterianas cercanos a los de la cepa silvestre (**Figura 12A**).

Por otro lado, a concentraciones bacterianas de 5×10^7 y 5×10^6 UFC, la cinética de colonización con la cepa silvestre es más prolongada con respecto al inóculo de 5×10^8 UFC, esto considerando que con los inóculos menos concentrados las cuentas máximas se alcanzaron después del día 16 pi (**Figura 12B y C**). Sin embargo, en los tres casos la cepa silvestre alcanzó los mismos

niveles máximos de bacterias en heces, lo que señala que *C. rodentium* es capaz de colonizar eficientemente al ratón aun a concentraciones bajas. Por su parte, la mutante $\Delta gcfA::Km$ no colonizó al ratón cuando se utilizaron los inóculos de 5×10^7 y 5×10^6 UFC, ya que sus cuentas bacterianas se mantuvieron en niveles muy bajos y cercanos al límite de detección durante todo el experimento, que fue concluido a los 28 días pi cuando la cepa silvestre ya ha sido casi eliminada (Figura 12B y C).

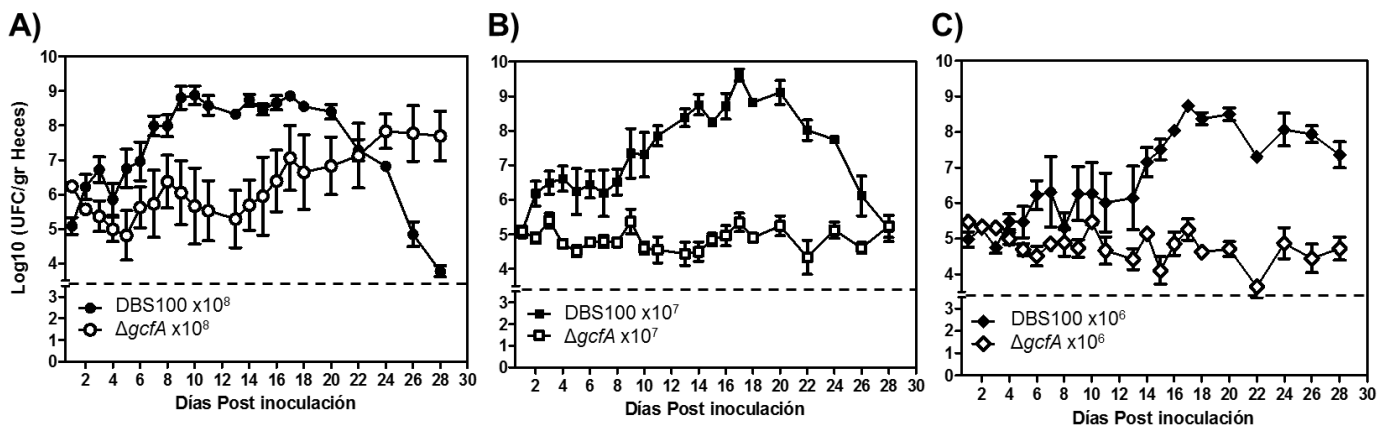


Figura 12.- Efecto de la concentración del inóculo en la cinética de colonización por *C. rodentium*. Grupos de cuatro ratones machos de la línea C57BL/6 de 4 a 5 semanas de edad se inocularon vía oral con **A)** 5×10^8 **B)** 5×10^7 o **C)** 5×10^6 UFC de la cepa silvestre de *C. rodentium* (DBS100) o de la mutante $\Delta gcfA::Km$ ($\Delta gcfA$). Promedios y errores estándar de las UFC por gramo de heces de cada grupo de ratones en los días posteriores a la inoculación indicados. Línea punteada, límite inferior de detección. **, $P < 0.005$ entre las muestras de *C. rodentium* DBS100 y $\Delta gcfA::Km$.

En resumen, los datos aquí descritos indican que el tiempo requerido para la colonización del ratón por *C. rodentium*, entendido como el punto en el que se alcanza el número máximo de bacterias por gramo de heces, es dosis-dependiente y que este se acorta conforme se incrementa la concentración del inóculo bacteriano inicial. Sin embargo, la deficiencia en colonización de la cepa mutante $\Delta gcfA::Km$, se hace más evidente a concentraciones bajas del inóculo, ya que mientras que con un inóculo de 5×10^8 UFC presenta un significativo retraso en el proceso de colonización, a concentraciones de 5×10^7 y 5×10^6 UFC es incapaz de colonizar. Por lo tanto, la mutante fimbrial $\Delta gcfA$ podría representar una

herramienta importante para entender mejor los mecanismos de virulencia de estos patógenos, la importancia de las fimbrias durante el proceso infeccioso, así como los mecanismos de respuesta del hospedero ante la infección.

APARTADO II.- REGULACIÓN DE LA EXPRESION DEL OPERON *gcf*

7.3.- El operón *gcf* se expresa en niveles basales en *C. rodentium*

El fenotipo mostrado por la mutante $\Delta gcfA::Km$ indica que la fimbria Gcf está presente en *C. rodentium* durante la infección y por lo tanto que el operón es activo; sin embargo, al inicio de este trabajo no se conocían las condiciones ambientales que favorecían la expresión del operón *gcf* ni tampoco los elementos reguladores del mismo, por lo que se decidió estudiar su regulación mediante el uso de una fusión transcripcional al gen reportero *cat* que codifica para la cloranfenicol acetil-transferasa. Dicha fusión, denominada *gcf1-cat*, contiene tanto la región intergénica río arriba del operón *gcf* como los genes de función desconocida *gcfF* y *gcfG* (**Figura 10**).

La actividad transcripcional de *gcf1-cat* se determinó midiendo los niveles de CAT mediante ensayos de actividad enzimática a partir de muestras de cultivos de *C. rodentium* silvestre (conteniendo el plásmido pKK-*gcf1*) crecidos en LB, DMEM o MM-N, medios de crecimiento previamente reportados como condiciones que favorecen la expresión de otras fimbrias en EPEC (Martínez-Santos *et al.* 2012), EHEC (Torres *et al.* 2007) y *C. rodentium* (Yang *et al.* 2008; Cheng *et al.* 2012).

Los resultados mostraron que en cultivos crecidos en condiciones estándar (37°C con agitación), la fusión *gcf1-cat* presentó niveles mínimos de expresión (actividad de CAT <50 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína), tanto en LB como en DMEM, mientras que en medio MM-N los niveles de actividad fueron ligeramente más altos (~280 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) (**Tabla 6**).

Tabla 6.- Expresión del operón *gcfFGABCDE* en *C. rodentium* silvestre.

Condición probada ^a	Medios ensayados ^a	Resultados
Temperatura 26 ^b y 37°C	LB, DMEM y MM-N	
Tiempo de crecimiento 6 ^c , 12 y 24 ^d h	LB, DMEM y MM-N	
Tensión de oxígeno Estático ^e , agitación, 5% CO ₂ ^e , anaerobiosis ^e	LB, DMEM y MM-N	Fusión <i>gcf1-cat</i>: En LB y DMEM se obtuvieron actividades de CAT <50 ^g en todas las condiciones ensayadas.
pH 5, 6 y 7.4	LB y MM-N	
Fuente de carbono Glucosa (DMEM), Glicerol (MM-N)	DMEM y MM-N	El mayor nivel de actividad de CAT (281.55 +/- 25.47) ^g se observó en medio MM-N a 37°C con agitación.
Concentración de Iones PO ₄ ⁻³ (0.1-10mM), SO ₄ ⁻² (0.75-75mM), Mg ⁺² (0.02-2mM), Cl ⁻ (0.5-50mM)	MM-N	
Otras Cultivos en medio sólido, heces fecales de ratón, ácidos grasos de cadena corta ^f ,	MM-N	

^a,En general, la cepa de *C. rodentium* DBS100 transformada con la fusión *gcf1-cat* se creció en 5 ml de los medios indicados a 37°C con agitación durante 12 h, excepto en los siguientes casos: ^b, cultivos crecidos a 26°C; ^c y ^d, durante 6 y 24 h, respectivamente; ^e, crecimiento en cultivo estático; ^f, 15 o 30 mM de acetato de sodio, propionato y/o butirato de sodio. ^g, Actividad específica de CAT (µmol/min/mg proteína).

En un trabajo publicado durante el desarrollo de este proyecto, se reportó que la expresión del *ORF_03671 (gcfA)* se indujo en una cepa de *C. rodentium* mutada en el sistema de transporte de fosfatos PstSCAB en comparación con la cepa silvestre, esto cuando los ensayos se realizaron en medio MM-N adicionado con altas concentraciones de fosfato (1mM) (Cheng *et al.* 2012).

Por lo tanto, se decidió probar si la concentración de fosfato u otro de los componentes del medio MM-N tenía un efecto en el nivel de expresión de *gcf*. Para esto, se determinó la actividad de la fusión *gcf1-cat* en cultivos de *C.*

rodentium crecidos en MM-N con diversas modificaciones (medio MM-N con concentraciones variantes de cada uno de sus componentes). Sin embargo, los cultivos no presentaron diferencias significativas en los niveles de actividad de CAT en ninguno de los medios MM-N modificados con respecto a los valores obtenidos en el medio MM-N típico (**Tabla 6**), descartando así la participación, al menos de forma individual, de alguno de los componentes de este medio en la regulación de *gcf*.

Por otro lado, considerando que se encontró que la fimbria Gcf posee un papel relevante en el proceso de colonización en el ratón (**Figuras 11 y 12**), se procedió a evaluar si algún componente presente en el tracto gastrointestinal del hospedero podría inducir la expresión de *gcf*. Con este propósito, se midió la actividad de la fusión *gcf1-cat* en cultivos de *C. rodentium* crecidos en tubos con 5 ml de LB, DMEM y MM-N adicionados con 100 µl de una suspensión en PBS de heces frescas de ratones C57BL/6. De nuevo, no se observaron cambios relevantes en los niveles de expresión de la fusión con respecto a los cultivos sin muestras fecales (**Tabla 6**).

Adicionalmente, se evaluaron otras variables como la temperatura de incubación (26°C y 37°C), la fase de crecimiento del cultivo (exponencial y estacionaria), el pH del medio (5, 6 y 7.4), la tensión de oxígeno (estático, agitación o anaerobiosis), la presencia de CO₂, entre otras descritas en la **Tabla 6**, las cuales tampoco tuvieron un efecto significativo en los niveles de expresión de la fusión de *gcf*. En conjunto, estos datos confirman que el operón *gcfFGABCDE* se expresa en niveles bajos en *C. rodentium* DBS100 bajo las condiciones de crecimiento *in vitro* probadas, sugiriendo que su expresión es fuertemente reprimida mediante un mecanismo de regulación negativa hasta este momento no identificado.

7.4.- La expresión del operón *gcf* es reprimida por H-NS y se regula diferencialmente por el medio de cultivo en *E. coli* K12

Basado en reportes previos que han demostrado que la proteína H-NS reprime la expresión de otras fimbrias en EPEC (Martínez-Santos *et al.* 2012), EHEC (Torres *et al.* 2007) y *C. rodentium* (Yang *et al.* 2008), así como en otras bacterias patógenas y no patógenas (Clegg *et al.* 2011), se decidió evaluar si el operón fimbrial objeto de este estudio era blanco de este regulador negativo. Para esto, la fusión *gcf1-cat* (**Figura 10**) se introdujo en la cepa *E. coli* K12 MC4100 y en su mutante isogénica $\Delta hns::Km$, y las cepas resultantes se crecieron en LB, DMEM y MM-N.

Como se observa en la **Figura 13**, la fusión *gcf1-cat* fue mucho más activa en el fondo mutante $\Delta hns::Km$ que en la cepa silvestre de *E. coli*, donde prácticamente no se observó actividad de CAT. Sin embargo, aun en ausencia de H-NS, los niveles de expresión de la fusión en la mutante variaron dependiendo del medio de cultivo utilizado, alcanzando niveles de actividad equivalentes a ~800 unidades en LB, ~1,200 en DMEM y ~1,800 en MM-N, medio donde se observó la mayor expresión.

Cuando la cepa mutante conteniendo la fusión se complementó *en trans* con el plásmido pT3-hns que expresa la H-NS de *E. coli* K12 (**Tabla 4**), se restauró el fenotipo de represión en los tres medios de cultivo, mientras que la adición del vector vacío (pMPM-T3) no tuvo un efecto significativo en los niveles de expresión de la fusión.

En conjunto, estos resultados permiten argumentar que el operón fimbrial *gcfFGABCDE* es regulado negativamente por la proteína H-NS en *E. coli* y que este grupo de genes podría ser reprimido por un mecanismo similar en *C. rodentium*.

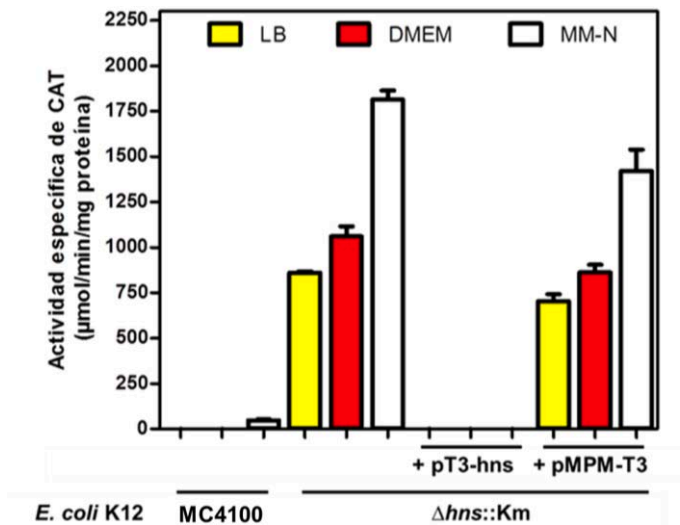


Figura 13.- Expresión del operón *gcf* en un fondo de *E. coli* K12 $\Delta hns::Km$. Actividad específica de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) obtenida a partir de extractos de *E. coli* K12 o su mutante $\Delta hns::Km$ conteniendo la fusión *gcf1-cat* (Figura 10). Los cultivos se crecieron en tubos con 5 ml de medio LB, DMEM o MM-N a 37°C con agitación durante 12 h. pT3-hns, plásmido que expresa H-NS; pMPPM-T3, vector vacío. Promedios y desviaciones estándar de dos experimentos independientes por duplicado (N=2).

7.5.- *C. rodentium* expresa cinco proteínas homólogas a H-NS

Los resultados anteriores indican que H-NS es capaz de reprimir la expresión de *gcf* en *E. coli*. Por lo tanto, para determinar si en *C. rodentium* existe un mecanismo similar de represión, primeramente se llevó a cabo la identificación de posibles ortólogos de la H-NS de *E. coli* K12 mediante una búsqueda usando BLAST en el genoma de *C. rodentium*.

Como se puede observar en la **Tabla 7**, se encontraron cinco genes en *C. rodentium* que codifican para proteínas con homología a H-NS de *E. coli* K12. Una de estas proteínas se nombró H-NS1 (ROD_17711) debido a que comparte el mayor nivel de identidad (96%) con la H-NS de *E. coli* K12 y a que su ortólogo más cercano (99% de identidad) es otra proteína H-NS presente en *Citrobacter amalonaticus* Y19. Otros dos de los genes identificados codifican para los ortólogos en *C. rodentium* de los reguladores transcripcionales *stpA* (ROD_31391) y *ler* (ROD_30151). Adicionalmente, se identificaron otros dos ortólogos de H-NS

en esta bacteria, los cuales se denominaron H-NS2 (ROD_20571) y H-NS3 (ROD_17711), cuyos homólogos más cercanos son las proteínas H-NS de *S. enterica* serovar Sloterdijk y *E. coli* P0299917, respectivamente (**Tabla 7**).

Tabla 7.- Proteínas homólogas a H-NS identificadas en *C. rodentium*.

Nombre asignado (Identificador del gen)	Tamaño (a.a.) ^a	Ident/Sim (%) ^b	Ortólogos ^c	
			Nombre (No. acceso)	Especie (% identidad)
H-NS1 (ROD_17711)	137	96/98	H-NS (AGE94391)	<i>C. amalonaticus</i> Y19 (99)
H-NS2 (ROD_20571)	134	64/73	H-NS (WP_023201854)	<i>Salmonella enterica</i> serovar Sloterdijk (98)
StpA (ROD_31391)	133	59/69	StpA (NP_417155)	<i>Escherichia coli</i> K-12 (84)
H-NS3 (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)

^a, Número de aminoácidos; ^b, Porcentaje de Identidad/similitud con la H-NS de *E. coli* K12; ^c, Secuencias proteicas del GenBank con mayor grado de identidad para cada homólogo de H-NS

Posteriormente, para conocer si los cinco homólogos de H-NS identificados en *C. rodentium* se expresan en esta bacteria, se generaron cepas etiquetadas en las que se fusionó la secuencia que codifica para el epítotope 3xFLAG al extremo 3' de cada uno de los genes en cuestión y se evaluó la expresión por "Western blot" de las proteínas de fusión correspondientes mediante el uso de un anticuerpo α -FLAG. Las cinco proteínas H-NS fueron detectadas a partir de lisados celulares de la cepa silvestre de *C. rodentium*, independientemente del medio de cultivo (LB,

DMEM o MM-N) utilizado para el crecimiento bacteriano (**Figura 14**). Por otro lado, los lisados celulares de la cepa sin etiquetar no mostraron señales bajo ninguna de las condiciones de crecimiento probadas, confirmando la especificidad del anticuerpo utilizado. Esto claramente indica que los cinco homólogos de H-NS de *C. rodentium* se expresan y sugiere que podrían ser proteínas funcionales.

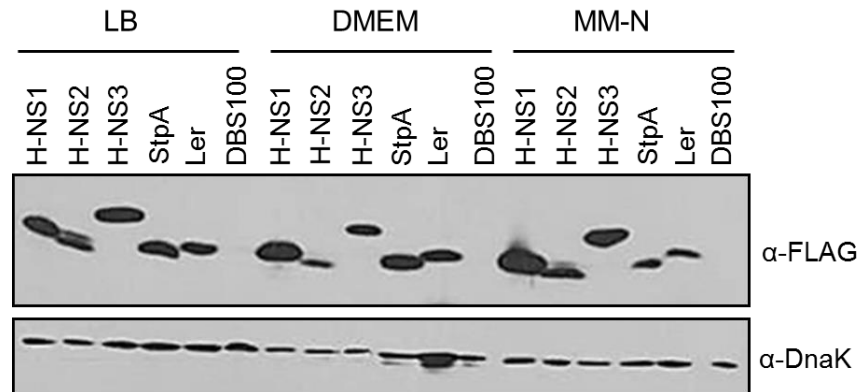


Figura 14.- Expresión de los homólogos de H-NS identificados en *C. rodentium*. “Western blot” con extractos totales de *C. rodentium* DBS100 y de sus variantes etiquetadas *hns1::3xFLAG* (H-NS1), *hns2::3xFLAG* (H-NS2), *hns3::3xFLAG* (H-NS3), *stpA::3xFLAG* (StpA) y *ler::3xFLAG* (Ler). Los cultivos se crecieron en 5 ml de LB, DMEM o MM-N a 37°C con agitación durante 6 h. La detección de las proteínas etiquetadas se realizó con un anticuerpo α-FLAG, mientras que DnaK se detectó como control de carga con un anticuerpo α-DnaK. Resultado representativo de dos experimentos independientes.

7.6.- La expresión del operón *gcf* es reprimida por H-NS1 y se regula diferencialmente por el medio de cultivo en *C. rodentium*

Con el objetivo de evaluar cuál de los cinco homólogos de H-NS de *C. rodentium* está involucrado en la regulación del operón *gcf*, se generaron mutantes sencillas carentes de cada uno de los genes que codifican para estas proteínas (**Tabla 4**) y se evaluó la expresión de la fusión *gcf1-cat* en dichos fondos genéticos.

Los niveles de expresión obtenidos en las mutantes en los genes *hns2*, *hns3*, *stpA* y *ler* fueron similares a los observados en la cepa silvestre (**Figura**

15A), a pesar del hecho de que todas estas proteínas se expresan en las condiciones ensayadas (**Figura 14**). En contraste, la fusión *gcf1-cat* se desreprimió en la cepa que no produce H-NS1 (**Figura 15A**), el ortólogo que comparte mayor grado de identidad (96%) con la H-NS de *E. coli* K12, alcanzando niveles de expresión incluso más altos que los observados en *E. coli* $\Delta hns::Km$ (**Figura 13**). Sin embargo, y de manera interesante, en ausencia de H-NS1 los niveles de actividad de la fusión fueron también diferentes dependiendo del medio utilizado para el crecimiento bacteriano, siendo en MM-N donde se obtuvo la actividad más alta (~4000 unidades), seguido por DMEM (~1000) y LB (~500) (**Figura 15A**). Al complementar la mutante $\Delta hns1::Km$ con un plásmido que expresa la H-NS de *E. coli* K12, se recuperó el fenotipo de represión en los tres medios de cultivo, mientras que la presencia del vector vacío no tuvo ningún efecto (**Figura 15A**).

En correlación con los resultados anteriores, también se observó una expresión diferencial de la proteína de fusión GcfA-3xFLAG dependiendo del medio de cultivo empleado, detectándose niveles mayores de la proteína en extractos celulares de la cepa etiquetada carente de H-NS1 crecida en MM-N con respecto a DMEM, mientras que no se detectó expresión de la misma cuando las bacterias se crecieron en LB o cuando la mutante se complementó *en trans* con el plásmido que expresa H-NS (pT3-hns) (**Figura 15B**).

En resumen, estos resultados indican que el operón *gcf* es reprimido específicamente por H-NS1; sin embargo, a pesar de la ausencia del represor el promotor se activa de manera diferencial en respuesta a las condiciones de crecimiento, sugiriendo la participación de un mecanismo regulador positivo aún no caracterizado; a su vez, muestran que Ler, StpA, H-NS2 y H-NS3 no están involucrados en la regulación de *gcf* a pesar de expresarse en las mismas condiciones.

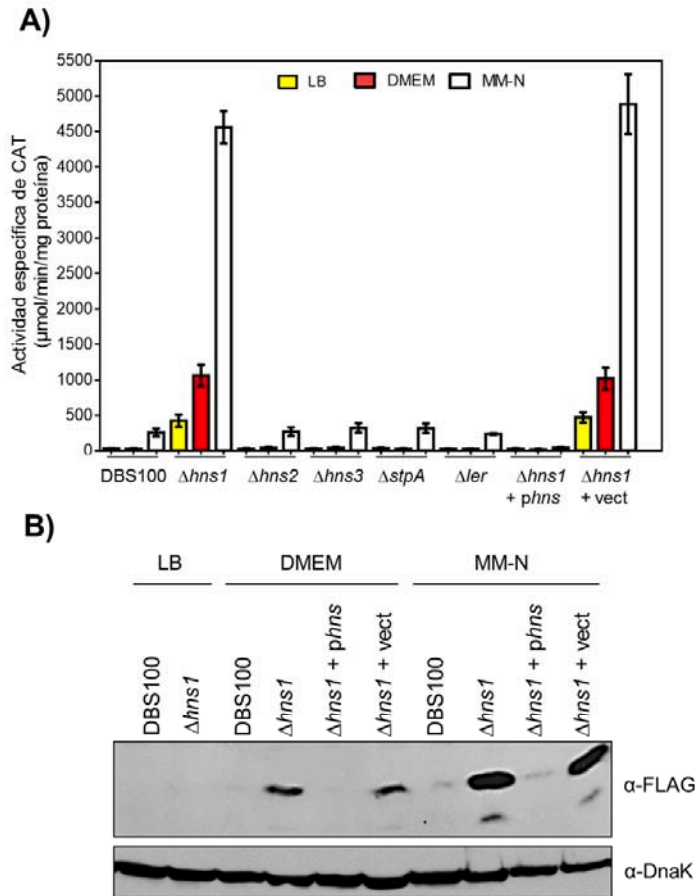


Figura 15.- Expresión del operón *gcf* en los fondos mutantes en los genes ortólogos de *hns* de *C. rodentium*. **A)** Actividad específica de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) obtenida a partir de extractos de la cepa silvestre de *C. rodentium* (DBS100) o sus mutantes $\Delta hns1::\text{Km}$, $\Delta hns2::\text{Km}$, $\Delta hns3::\text{Km}$, $\Delta stpA::\text{Km}$ y $\Delta ler::\text{Km}$ conteniendo la fusión *gcf1-cat* (**Figura 10**). Promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes por duplicado. **B)** Western blot con extractos celulares de las cepas de *C. rodentium* *gcfA::3xFLAG* (DBS100) o $\Delta hns1::\text{Km}$ *gcfA::3xFLAG* ($\Delta hns1$). Resultado representativo de al menos tres experimentos independientes. Los cultivos se crecieron en tubos con 5 ml de LB, DMEM o MM-N a 37°C con agitación durante 12 h (**A**) ó 6 h (**B**). *phns*, plásmido pT3-hns que codifica para H-NS; vect, vector pMPM-T3 vacío.

7.7.- Identificación de las regiones promotoras de *gcf*

Para identificar las probables regiones promotoras presentes en el operón *gcf*, se generaron cuatro nuevas fusiones transcripcionales (*gcf2-cat* a *gcf5-cat*), las cuales incluyeron las regiones intergénicas de *gcf* indicadas en la **Figura 16A**. Las construcciones obtenidas se probaron en la cepa de *C. rodentium* $\Delta hns1::\text{Km}$,

fondo genético donde previamente se observó desrepresión de la fusión *gcf1-cat* (**Figura 15**).

Se observó que las fusiones *gcf2-cat* y *gcf3-cat* no mostraron actividad en ninguno de los medios ensayados (LB, DMEM y MM-N) (**Figura 16B**), indicando que las regiones de ADN correspondientes a dichas construcciones no contienen promotores funcionales. En contraste, la fusión *gcf4-cat* presentó niveles similares de expresión a los obtenidos con *gcf1-cat* y fue igualmente reprimida que esta cuando la mutante $\Delta hns1::Km$ se complementó con el plásmido que expresa H-NS, pero no con el vector vacío (**Figura 16B**). Considerando que ambas construcciones poseen en común la región intergénica río arriba de *gcfF*, estos resultados confirman que existe una región promotora, denominada *gcfF-P1*, localizada río arriba del gen *gcfF*.

Por otro lado, la fusión *gcf5-cat*, conteniendo la región intergénica entre los genes *gcfA* (pilina) y *gcfB* (chaperona), también mostró actividad en la mutante $\Delta hns1::Km$ (~1000 unidades en MM-N y ~250 en LB y DMEM), aunque a niveles más bajos que los observados para las construcciones *gcf1-cat* y *gcf4-cat* (**Figura 16B**). Estos datos indican que el gen *gcfB* contiene un promotor propio (*gcfB-P1*) más débil que *gcfF-P1* y que también responde a la regulación negativa ejercida por H-NS.

La presencia de un promotor en la región intergénica entre los genes *gcfA* y *gcfB* no es del todo inesperada, considerando que esta es particularmente larga entre los genes que codifican para la pilina y la chaperona con respecto a la organización de otros operones fimbriales; sin embargo, queda por definir cuál es el papel de ambos promotores en la transcripción de los genes río abajo de *gcfB* (*gcfCDE*) y por lo tanto en la biogénesis de Gcf.

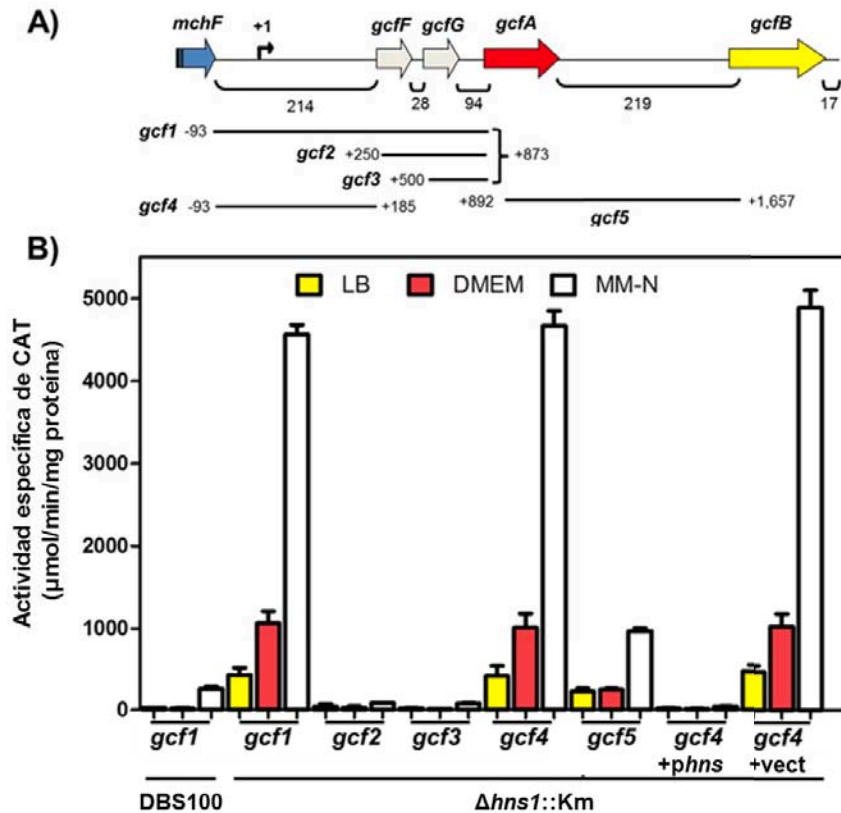


Figura 16.- Identificación de regiones promotoras en el operón *gcf*. **A)** Esquema de las fusiones transcripcionales ensayadas (*gcf1* a *gcf5*). Coordenadas con respecto al inicio de la transcripción de *gcf* (ver más adelante). **B)** Actividad específica de CAT ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína) obtenida a partir de extractos de *C. rodentium* DBS100 o su mutante $\Delta\text{hns1}::\text{Km}$ conteniendo las fusiones indicadas en A). Los cultivos se crecieron en tubos con 5 ml de medio LB, DMEM o MM-N a 37°C con agitación por 12 h. *phns*, plásmido pT3-hns que codifica para H-NS; vect, vector vacío (**Tabla 4**). Promedios y desviaciones estándar de tres experimentos independientes por duplicado N=3.

7.8.- Identificación del promotor *gcfF-P1*

Los resultados anteriores sugieren la presencia de dos promotores en el operón *gcf* (*gcfF-P1* y *gcfB-P1*); sin embargo, cabe señalar que los esfuerzos realizados no nos permitieron ubicar al promotor *gcfB-P1*, ni su inicio de transcripción en la región intergénica *gcfA-gcfB*. Por lo tanto, a continuación se describe solamente la caracterización de la región promotora correspondiente a

gcfF-P1, el promotor de *gcf* con mayor fuerza (**Figura 16**) y del que probablemente se transcriben todos los genes del operón (ver más adelante).

Inicialmente se llevó a cabo una predicción *in silico* de posibles promotores localizados río arriba de *gcfF* usando el software libre BROM (<http://linux1.softberry.com>). De esta manera, se identificó un probable promotor tipo σ^{70} localizado a 165 pb río arriba del codón de inicio de la traducción de *gcfF* (**Figura 17**), el cual posee elementos -35 (TTGAGT) y -10 (TAACAT) separados por 17 pb y que en ambos casos muestran 4 de las 6 bases conservadas en los promotores consenso de *E. coli*.

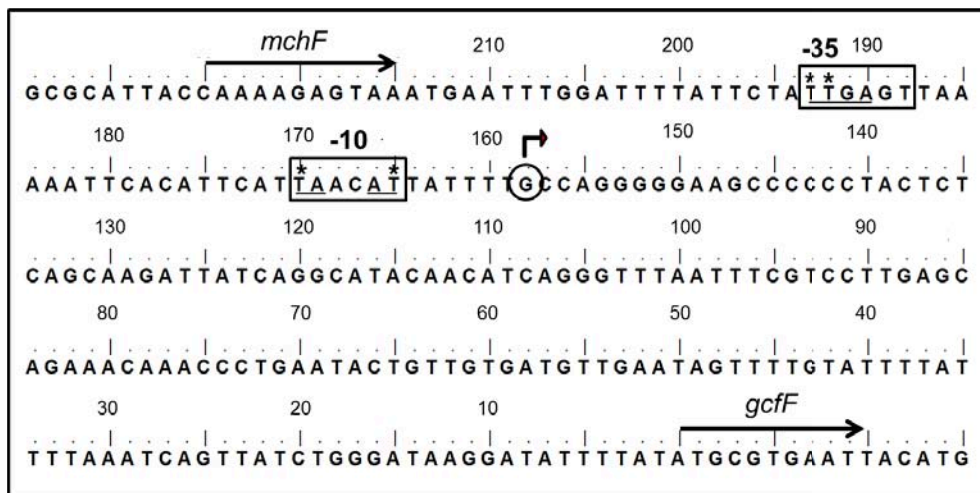


Figura 17.- Predicción *in silico* del promotor *gcfF-P1*. Se muestra la secuencia de la región río arriba de *gcfF*, resaltando las secuencias -10 y -35 predichas por el programa BROM (<http://linux1.softberry.com>). Las bases conservadas con respecto a promotores consenso de *E. coli* están subrayadas. Los asteriscos señalan las bases mutagenizadas (ver abajo) y el círculo el inicio de la transcripción. Coordenadas a partir del codón de inicio de la traducción de *gcfF*.

Posteriormente, para iniciar la caracterización de este promotor y evaluar la presencia de otros posibles elementos reguladores en esta región, se generaron dos nuevas fusiones transcripcionales: *gcf6-cat* que incluye el posible promotor *gcfF-P1* y comprende el extremo 5' de la región río arriba de *gcfF* (posiciones -93

a +27 con respecto al inicio de la transcripción de *gcf*); y *gcf7-cat* que contiene principalmente la secuencia corriente abajo del promotor *gcfF-P1* predicho (posiciones +10 a +185) (**Figura 18A**). Los efectos de dichos recortes se evaluaron comparando los niveles de actividad de CAT obtenidos a partir de las dos fusiones cortas (*gcf6-cat* y *gcf7-cat*) con respecto a los de la fusión larga (*gcf4-cat*), tanto en la cepa silvestre como en la mutante $\Delta hns1::Km$.

Interesantemente, la fusión *gcf6-cat* generó en la cepa silvestre niveles de actividad de CAT cercanos a los observados con la fusión *gcf4-cat* en la mutante $\Delta hns1$ y la regulación diferencial en respuesta al medio de cultivo fue todavía observable (**Figura 18B y C**). Lo anterior indica que el promotor *gcfF-P1* predicho es probablemente funcional y que existen elementos de regulación negativa río abajo del mismo (entre las posiciones +27 y +185), probablemente sitios de interacción de H-NS. Sin embargo, la actividad de la misma fusión (*gcf6-cat*) en la mutante fue aún mayor, sugiriendo que no todos los sitios de pegado de H-NS están ausentes en esta construcción o que un regulador adicional modula negativamente la expresión del promotor.

En contraste, la fusión *gcf7-cat* fue prácticamente inactiva en el fondo silvestre (**Figura 18B**), pero mostró un nivel bajo de expresión (~500 unidades en MM-N) en la mutante carente de H-NS1 (**Figura 18C**), planteando la posibilidad de que exista un tercer promotor débil (*gcfF-P2*), localizado entre las posiciones +27 y +185, que también es regulado negativamente por H-NS1 y cuya actividad se hace evidente en ausencia de *gcfF-P1*. Sin embargo, los análisis *in silico* no predicen la presencia de un promotor adicional en dicha región, indicando que *gcfF-P2* es un promotor críptico.

Por otro lado, cuando la proteína H-NS se expresó a partir de un plásmido en las cepas conteniendo las fusiones *gcf4-cat*, *gcf6-cat* y *gcf7-cat*, solo la construcción más larga (*gcf4-cat*) fue completamente inactiva en ambos fondos genéticos, mientras que *gcf6-cat* y *gcf7-cat* no fueron reprimidas por completo presentando niveles basales de actividad transcripcional en ambas cepas, particularmente en medio mínimo (<500 U para *gcf6-cat* y <100 U para *gcf7-cat*)

(Figura 18B y C). Este comportamiento sugiere que se requiere de toda la región intergénica río arriba de *gcfF* para que H-NS reprima eficientemente o que un represor adicional, actuando río abajo de la posición +27, participa en la regulación negativa de *gcf*.

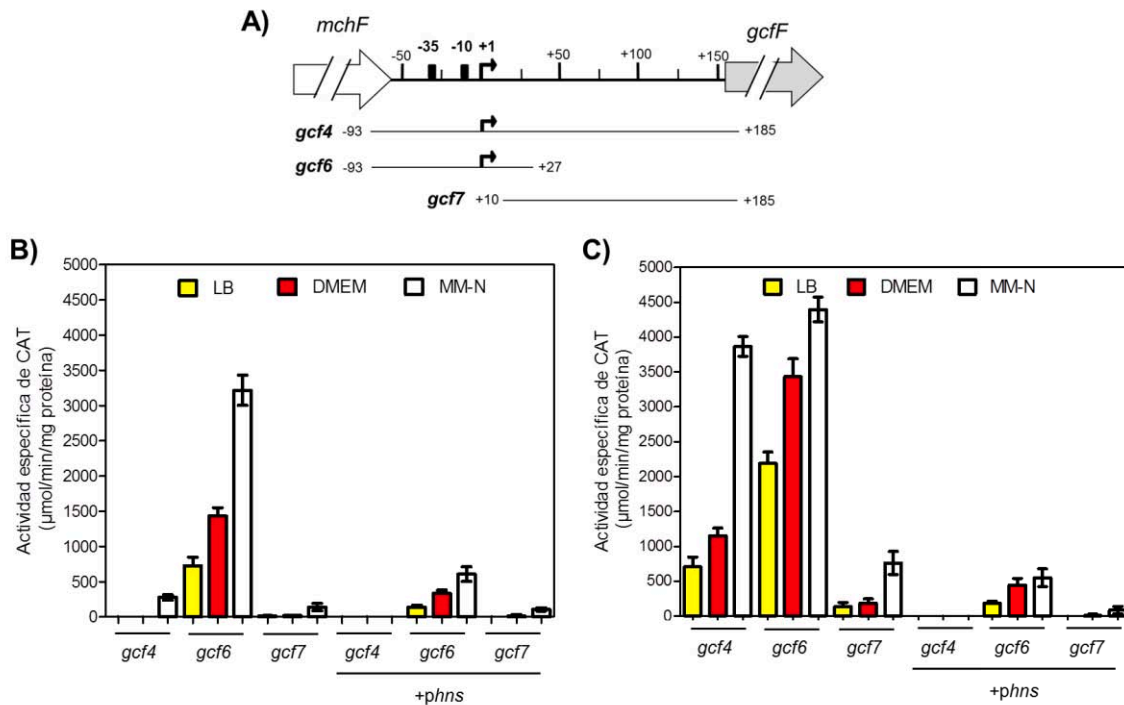


Figura 18.- Determinación de la región mínima reguladora del promotor *gcfF-P1*. A) Fusiones transcripcionales ensayadas (*gcf4* a *gcf7*). -10 y -35, cajas promotoras consenso de *gcfF-P1*; +1, sitio de inicio de la transcripción de *gcf*. B) y C) Actividad específica de CAT (µmol/min/mg de proteína) obtenida a partir de extractos de la cepa silvestre de *C. rodentium* DBS100 (B) o su mutante $\Delta hns1::Km$ (C) conteniendo las fusiones indicadas ilustradas en A). Los cultivos se crecieron en tubos con 5 ml de medio LB, DMEM o MM-N a 37°C con agitación por 12 h. *phns*, plásmido pT3-hns que expresa H-NS. Resultados de tres experimentos independientes por duplicado N=3.

Los datos descritos arriba claramente indican la presencia de un promotor funcional corriente arriba de *gcfF* que coincide con la predicción *in silico* de un promotor en esta región (Figura 17). Para determinar el sitio de inicio de la transcripción del promotor *gcfF-P1*, se realizaron ensayos de “primer extension”

con ARN total extraído de cultivos de la mutante $\Delta hns1::Km$ conteniendo el plásmido pKK-gcf6 (fusión *gcf6-cat*) y utilizando el primer pKK-Seq-I (Tabla 5) marcado radiactivamente, el cual alinea en el extremo 5' del gen reportero *cat*.

Se obtuvieron varios productos de extensión comunes independientemente del medio de cultivo usado para el crecimiento bacteriano. Una de estas bandas correspondió a un residuo de guanina (G) situado 7 pb río abajo de la caja -10 del promotor predicho *gcfF-P1* (Figuras 17 y 19A). La misma señal se detectó a diferente intensidad dependiendo del medio de cultivo utilizado, siendo en las muestras de ARN provenientes de cultivos crecidos en MM-N donde se obtuvo la señal más intensa, seguida por DMEM y finalmente LB, donde no se observó la banda (Figura 19A). Estos resultados correlacionan con la expresión diferencial observada mediante fusiones transcripcionales (Figuras 16 y 18) y “Western blot” (Figura 15B), apoyando que dicha señal corresponde al inicio transcripcional de *gcfF-P1*. En contraste, cuando se realizó el mismo ensayo con muestras de ARN de la mutante $\Delta hns1::Km$ con la fusión *gcf7-cat* para determinar el inicio de transcripción del promotor *gcfF-P2*, no se obtuvieron productos de extensión (Figura 19B), probablemente debido a los niveles bajos de expresión del promotor

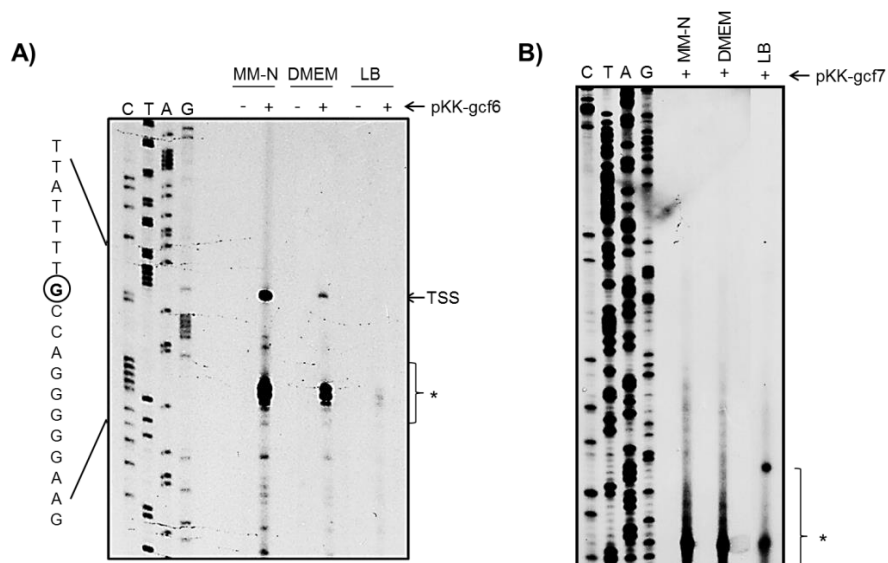


Figura 19.- Ensayos de “primer extension” para los promotores *gcfF-P1* y *gcfF-P2*. El oligonucleótido pKK-Seq-I marcado con ^{32}P se hibridó con 15 μ g de ARN total extraído de la mutante $\Delta hns1::Km$ con (+) o sin (-) la construcción pKK-gcf6 (fusión *gcf6-cat*) (A) o pKK-gcf7 (*gcf7-cat*) (B). C,T,A,G, reacciones de secuenciación; *, probables sitios de

procesamiento (A) o señales provenientes del oligonucleótido marcado (B). Resultado representativo de dos experimentos independientes.

Para confirmar que la actividad transcripcional corresponde al promotor deducido, mutamos la secuencia correspondiente a la caja -35 (TTGAGT por GGGAGT), tanto en la construcción que comprende la región intergénica *mchF-gcfF* completa (*gcf4-cat*), como en la fusión corta (*gcf6-cat*) que contiene solo el promotor. Ambas construcciones mutantes fueron probadas en la cepa silvestre y en el fondo $\Delta hns1::Km$. La fusión mutante *gcf4m-cat* fue completamente inactiva en *C. rodentium* DBS100 (Figura 20); sin embargo, en la mutante carente de HNS, la misma fusión mostró niveles de expresión comparables a los obtenidos con la fusión *gcf7-cat* que no contiene el promotor (Figura 18B). En contraste, la fusión que solo contiene el promotor *gcfF-P1* (*gcf6-cat*) fue completamente inactiva en ambos fondos genéticos. Estos resultados confirman la funcionalidad del promotor *gcfF-P1* y apoyan la existencia de un promotor adicional *gcfF-P2*.

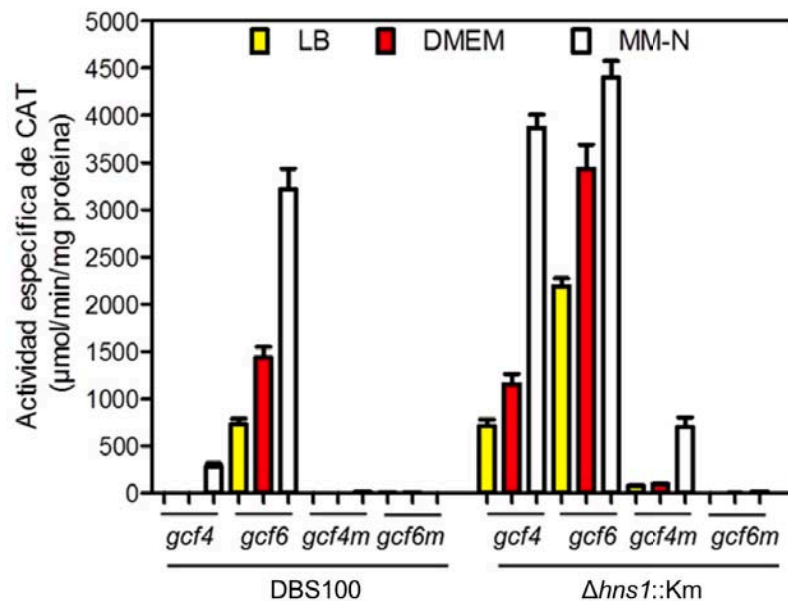


Figura 20.- Mutagénesis del promotor *gcfF-P1*. Actividad específica de CAT ($\mu\text{mol/min/mg}$ de proteína) obtenida a partir de extractos de *C. rodentium* DBS100 o su mutante $\Delta hns1::Km$ conteniendo las fusiones *gcf4-cat* o *gcf6-cat* silvestres (*gcf4* y *gcf6*) o mutadas en la secuencia -35 (TTGAGT por GGGAGT) del promotor *gcfF-P1* (*gcf4m* y *gcf6m*). Los cultivos se crecieron en 5 ml de medio LB, DMEM o MM-N a 37°C con agitación por 12 h. N=3 por duplicado.

7.9.- Los genes *gcf* se transcriben como operón a partir de la región promotora de *gcfF*

Conociendo que existen dos promotores (*gcfF-P1* y *gcfF-P2*) río arriba de *gcfF*, evaluamos si todos los genes *gcf*, incluyendo los ORFs de función desconocida *gcfG* y *gcfE*, se transcriben como un operón a partir de esta región reguladora. Para ello, se amplificaron por “RT-PCR” diferentes fragmentos del operón *gcf* (**Figura 21A**), empleando parejas de oligonucleótidos específicos (**Tabla 5**) y usando como molde ARN total de las cepas de *C. rodentium* DBS100 y $\Delta hns1::Km$ crecidas en MM-N, medio donde se observó la mayor expresión de dichos promotores en ambos fondos genéticos (**Figura 18**).

Como se observa en la **Figura 21B**, se obtuvieron productos de amplificación del tamaño esperado para las regiones *gcfFGA*, *gcfAB*, *gcfBC* y *gcfCDE*, tanto en las muestras de ARN provenientes de la cepa silvestre como en las de la mutante $\Delta hns1::Km$, apoyando así la idea de que todos los genes *gcf* se transcriben como un operón a partir de la región promotora río arriba de *gcfF* y en particular del promotor *gcfF-P1*.

Sin embargo, aunque el promotor *gcfF-P1* parece tener la mayor influencia sobre la expresión del operón y por lo tanto en la biogénesis de la fimbria, falta definir si los promotores *gcfF-P2* y *gcfB-P1* juegan alguna función particular en la expresión de los genes accesorios o del resto del operón fimbrial, respectivamente, así como identificar su secuencia y los inicios de transcripción correspondientes .

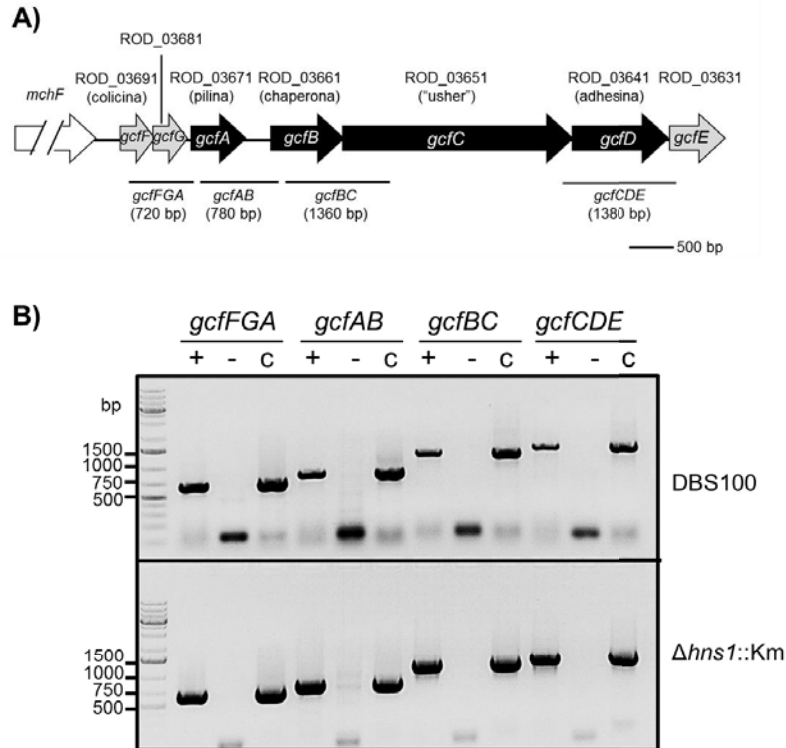


Figura 21.- Análisis por “RT-PCR” de la organización transcripcional de *gcf*. **A)** Fragmentos *gcf* amplificados por “RT-PCR”. Las regiones *gcfFGA*, *gcfAB*, *gcfBC* y *gcfCDE* se indican con líneas negras con sus respectivos tamaños en pares de bases (pb). **B)** Ensayos de “RT-PCR”. Los fragmentos indicados en **A)** se amplificaron por “RT-PCR” con oligonucleótidos específicos (**Tabla 5**) usando como molde ARN total extraído de las cepas de *C. rodentium* DBS100 (arriba) o Δ *hns1::Km* (abajo), previamente crecidas durante 4 h a 37°C con agitación en tubos con 5 ml de medio MM-N. +, “RT-PCR”; -, “RT-PCR” sin transcriptasa reversa; C, PCR con ADN genómico.

7.10.- H-NS se une a la región reguladora río arriba de *gcfF*

Los datos previos indican la presencia de elementos reguladores negativos en la región intergénica río arriba de *gcfF* (**Figura 18**), los cuales además fueron requeridos para la represión eficiente del promotor *gcfF-P1* por H-NS. Por lo tanto, se decidió evaluar si H-NS reprime el operón *gcf* mediante interacción directa con esta región reguladora. Con este propósito, se realizaron ensayos de unión tipo “EMSA” incubando los fragmentos *gcf4* (-254 a +37), *gcf6* (-254 a -124), *gcf7* (-140 a +37) y *gcf8* (**Figura 22A**) con concentraciones crecientes de la proteína H-NS-MyHis purificada y las mezclas se analizaron en geles de poliacrilamida nativos.

Inicialmente, los cuatro fragmentos se probaron juntos en ensayos de “EMSA” competitivos, encontrándose que solamente el fragmento *gcf4*, que contiene la región intergénica *mchF-gcfF* completa, comenzó a retardarse a una concentración de 0.4 μM de proteína, mientras que con 0.8 μM de H-NS fue suficiente para retardar la movilidad de este fragmento casi por completo (**Figura 22B**). En contraste, los productos *gcf6*, *gcf7* y *gcf8*, que comprenden diferentes porciones de la misma región intergénica, no se retardaron incluso a las concentraciones más altas de proteína probadas (**Figura 22B**). Cuando los mismos fragmentos se probaron por separado, pero ahora con un fragmento no relacionado del gen *ecpR* de *C. rodentium*, el cual se usó como control negativo, se observó nuevamente que solo *gcf4* formó complejos ADN-proteína a las mismas concentraciones (0.4 a 0.8 μM) de H-NS que en el ensayo de competencia, mientras que *gcf6*, *gcf7*, *gcf8* y el control negativo *ecpR* no se retardaron (**Figura 22B**). Estas observaciones sugieren que H-NS requiere de sitios distales en la región intergénica *mchF-gcfF* para unirse eficientemente y por lo tanto, para ejercer el efecto represor sobre la expresión del operón *gcf*.

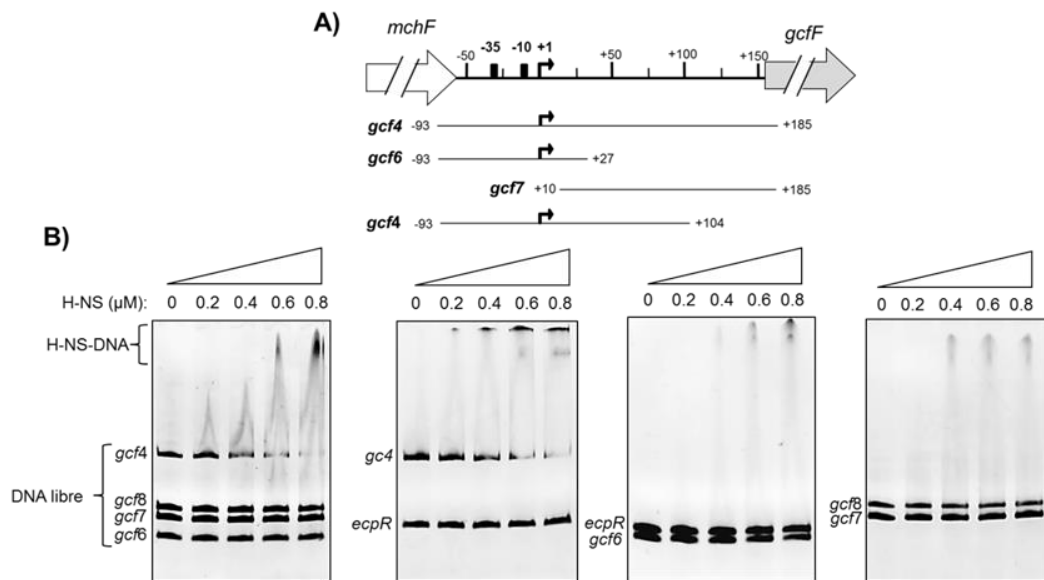


Figura 22.- Ensayos de unión de H-NS a la región reguladora de *gcfF*. **A)** Esquema de los fragmentos *gcf* (*gcf4*, *gcf6*, *gcf7* y *gcf8*) amplificados por PCR y utilizados en los ensayos de unión de **B)**. Cien nanogramos de los productos de PCR indicados en **A)** se incubaron 30 min a 37°C con concentraciones crecientes (μM) de la proteína H-NS-MyHis purificada y las mezclas se separaron en geles de poliacrilamida nativos. El ADN libre y los complejos ADN-proteína se indican con llaves. *ecpR*, control negativo.

APARTADO III.- ANÁLISIS DE LA EXPRESION DEL OPERON *gcf* DENTRO DEL HOSPEDERO

7.11.- El operón *gcf* se expresa dentro del ratón durante el proceso de infección por *C. rodentium*

Como se describió previamente, a pesar de expresarse con poca intensidad *in vitro*, el operón *gcf* es esencial para que *C. rodentium* colonice eficientemente el tracto gastrointestinal del ratón, lo cual sugiere que dicho operón se expresa dentro del hospedero durante el curso de la infección. Para evaluar el patrón de expresión de *gcf* durante las diferentes etapas del proceso de infección en el ratón, se utilizó la fusión transcripcional *gcf-lux* (**Tabla 4**), la cual se generó mediante la clonación de la región intergénica río arriba de *gcfF* en el vector pCS26-Pac, que contiene el operón *lux* sin promotor. Como control positivo se utilizó una construcción previamente generada en el laboratorio que contiene el promotor de *LEE2* clonado en el mismo vector.

Para llevar a cabo las cinéticas de expresión dentro de los animales, se infectaron vía oral grupos de cuatro ratones (cinco en el caso de *gcf-lux*) con la cepa silvestre de *C. rodentium* DBS100 conteniendo las fusiones *gcf-lux*, *LEE2-lux* o el vector vacío como control negativo; luego, se tomaron fotografías de rayos-X y luminiscencia de los diferentes grupos de animales a los días post-infección indicados como se describe en Materiales y Métodos.

Los resultados mostraron que la fusión *gcf-lux* se expresó dentro del ratón a partir del día 5 pi y hasta el día 10 pi, cuando se alcanzaron los niveles más altos de luminiscencia (**Figuras 23A y B**); posteriormente, la señal comenzó a decaer hasta el día 20 pi cuando dejó de ser detectable. De manera similar, *LEE2-lux* también se expresó en el hospedero durante los días 5 al 10 pi; sin embargo, a diferencia de *gcf-lux*, la fusión de LEE alcanzó su máximo nivel de expresión desde el día 5 pi y se mantuvo en niveles similares hasta el día 10 pi (**Figuras 23A y B**); posteriormente, la intensidad de la señal también comenzó a decrecer hasta ser indetectable al día 20 pi.

En contraste, los animales inoculados con la cepa conteniendo el vector vacío no mostraron niveles detectables de luminiscencia durante el curso de todo el experimento (**Figuras 23A y B**), aun cuando todas las cepas colonizaron de manera eficiente el intestino del ratón (**Figura 23C**), indicando que las señales de luminiscencia detectadas durante el ensayo están dadas por la actividad de los promotores de *gcf* y *LEE2*. En conjunto, estos resultados confirman que el operón *gcf* se expresa durante el proceso de infección en el ratón siguiendo un patrón de expresión temporal similar al presentado por el LEE.

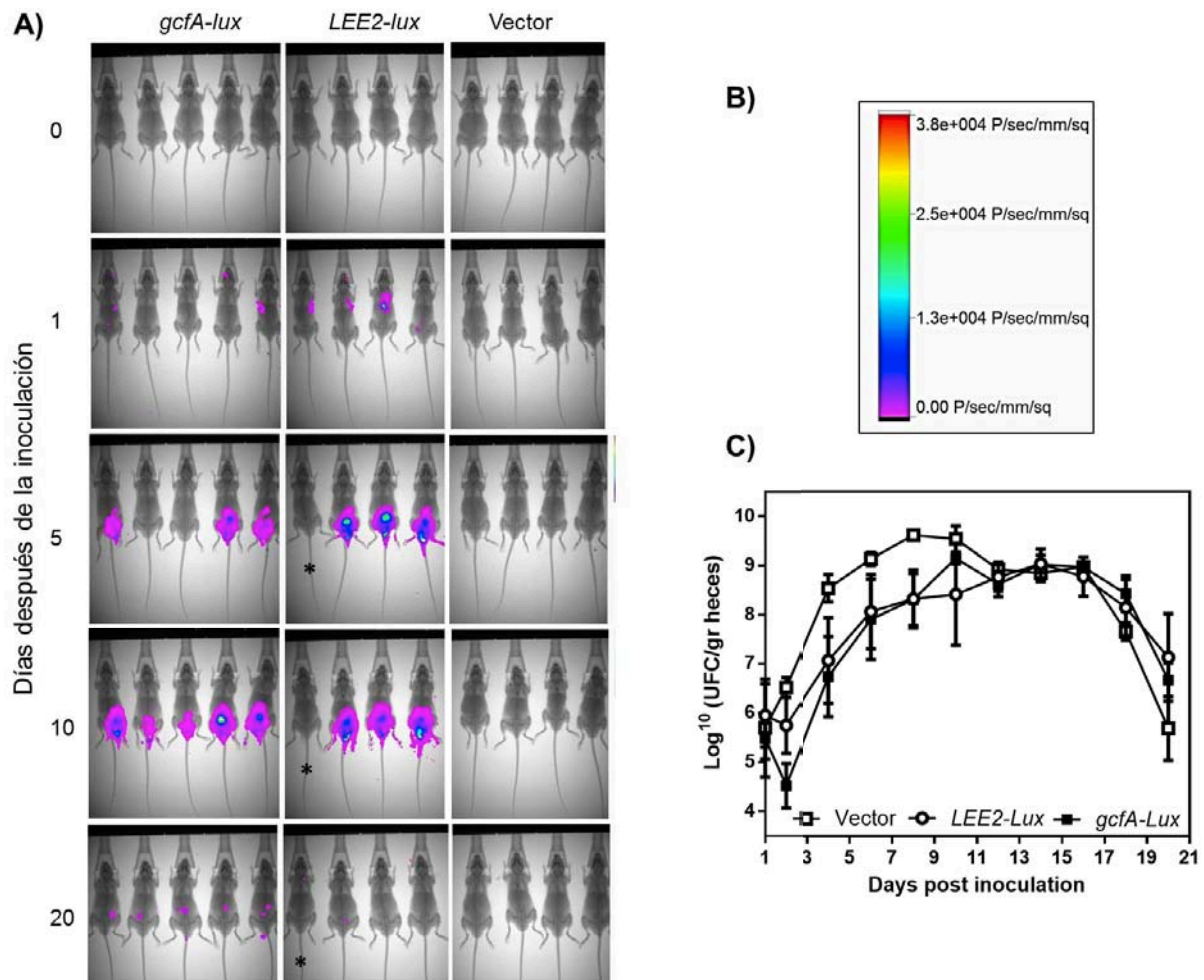


Figura 23.- Determinación de la expresión de *gcf* dentro del hospedero. Tres grupos de ratones machos de la línea C57BL/6 de 4 a 5 semanas de edad se inocularon vía oral con 5×10^7 UFC de *C. rodentium* DBS100 conteniendo las fusiones *gcf-lux*, *LEE2-lux* o el vector vacío, pCS26-Pac. **A)** A los días indicados después de la inoculación, los ratones fueron anestesiados por inhalación con 1% de isoflurano y fotografiados en el equipo “In-Vivo Xtreme Imaging System” (Bruker). Se muestra el empalme de las imágenes de rayos-X y

luminiscencia obtenidas. *, En este ratón la fusión *gcf-lux* fue inestable y la cepa de *C. rodentium* perdió la construcción durante los primeros días post-infección. **B)** Escala de luminiscencia (fotones/seg/mm/sq) de las imágenes de A). **C)** Cinética de colonización de los ratones de A) como en la **Figura 12**. Resultado representativo de tres ensayos independientes.

7.12.- El operón *gcf* se expresa específicamente en el colon del ratón durante el proceso de infección por *C. rodentium*

Aunque los datos descritos arriba sugieren que LEE y Gcf presentan una expresión temporal similar dentro del ratón, esto no descarta la posibilidad de que los promotores respondan a señales específicas de un nicho particular, es decir, que dichos factores de virulencia se expresen en regiones diferentes del tracto gastrointestinal durante el curso de la infección. Para evaluar esta hipótesis, se inocularon parejas de ratones con las mismas cepas que en el ensayo previo (**Figura 23**) y se determinó la bioluminiscencia bacteriana en los tractos gastrointestinales extraídos de animales sacrificados a diferentes días post-infección.

Como se observa en la **Figura 24**, se encontró que la fusión *gcf-lux* se expresó durante los días 5 al 10 pi principalmente en el ciego y el colon, los sitios primarios de colonización por *C. rodentium* (Kamada *et al.* 2012 y 2015). Por su parte, *LEE2-lux* nuevamente mostró expresión durante los mismos días pi que *gcf-lux*, apoyando aun más la idea de que Gcf y LEE poseen un patrón de expresión temporal similar, aunque se requieren análisis adicionales para validar esta observación; sin embargo y de manera interesante, la fusión *LEE2-lux*, además de expresarse en el ciego y el colon, también mostró actividad transcripcional a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, incluyendo el estómago y otras regiones del intestino delgado como el jejunio (**Figura 24**); mientras que el vector vacío de nuevo no generó ninguna señal detectable de luminiscencia durante todo el ensayo. Estos resultados preliminares, que requieren ser confirmados mediante experimentos con un mayor número de animales, permiten hipotetizar que Gcf se expresa específicamente en respuesta a señales presentes en el ciego y en el

colon del ratón, sugiriendo que esta fimbria es requerida para la colonización eficiente de estos nichos, y por otra que el LEE no solo se expresa en el sitio primario de la colonización por *C. rodentium* (el colon), sino con anticipación a lo largo de todo el tracto gastrointestinal.

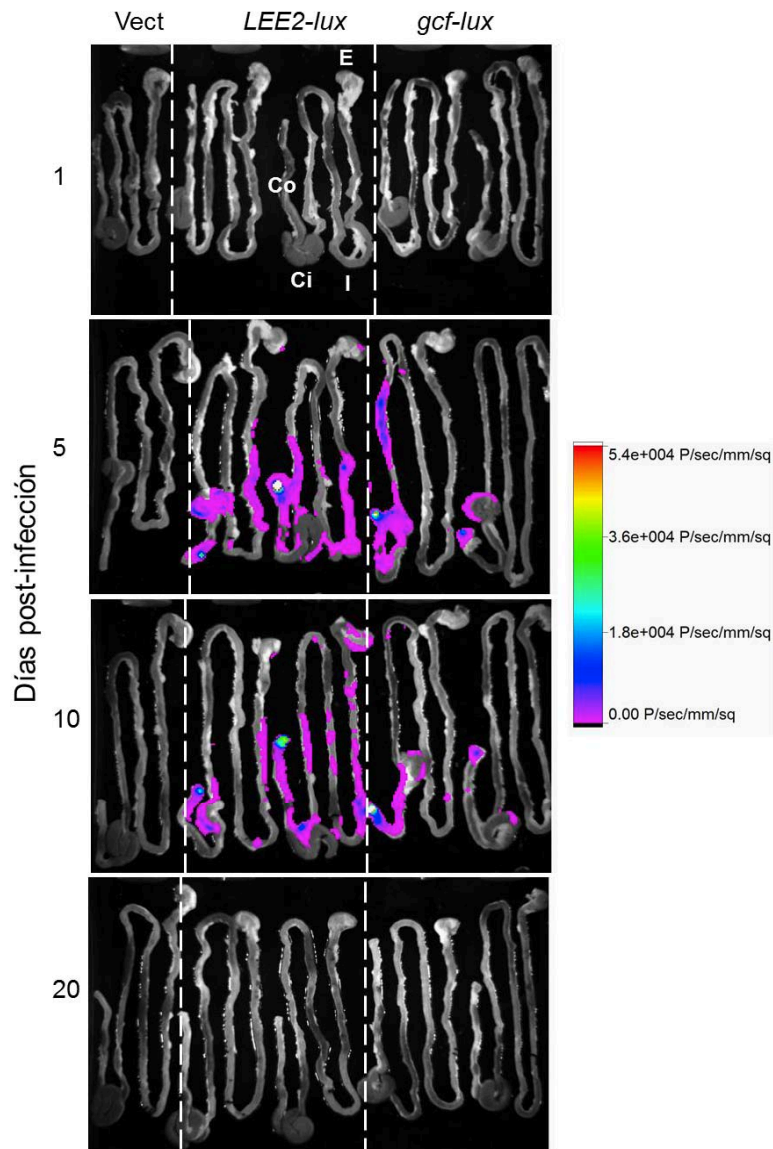


Figura 24.- Determinación de la expresión de *gcf* en el tracto gastrointestinal del ratón. Parejas de ratones machos de la línea C57BL/6 de 5 a 6 semanas de edad se inocularon oralmente con 5×10^7 UFC de *C. rodentium* DBS100 conteniendo las fusiones *gcf-lux*, *LEE2-lux* o el vector vacío, pCS26-Pac. A los días post-infección indicados, los ratones se sacrificaron y disectaron para extraerles el tracto gastrointestinal, los cuales se fotografiaron en el equipo “In-Vivo Xtreme Imaging System” (Bruker). Se muestra el empalme de las imágenes de campo claro y luminiscencia obtenidas. E, estómago; I, intestino delgado; Ci, ciego; Co, colon. Escala de luminiscencia en fotones/seg/mm/sq

8.- DISCUSIÓN

C. rodentium es un patógeno específico de ratones usado ampliamente como un modelo alternativo para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares de las infecciones causadas por las bacterias de la familia A/E que incluye a los patógenos de humanos EPEC y EHEC, para los cuales no existe un modelo animal de infección (Collins *et al.* 2014). A este respecto, diversos estudios han demostrado la utilidad de *C. rodentium* como modelo de estudio, por ejemplo, para determinar la importancia de cada uno de los genes de la isla LEE, y de otros factores de virulencia codificados fuera de esta, durante el proceso de infección (Vallance *et al.* 2003; Deng *et al.* 2004; Collins *et al.* 2014). En otros trabajos se han empleado ratones afectados en componentes del sistema inmune para obtener información acerca de la patología causada por *C. rodentium*, así como de la respuesta inmunológica del animal para contender con la infección (Collins *et al.* 2014; Kamada *et al.* 2015). Este modelo también ha sido utilizado para analizar el efecto de la microbiota del hospedero en el desarrollo de la infección, así como en ensayos de transmisión de la enfermedad de un animal a otro (Kamada *et al.* 2012; Collins *et al.* 2014; Kamada *et al.* 2015). Además, *C. rodentium* también representa un modelo adecuado para estudiar la importancia que durante el proceso de infección tiene para una bacteria patógena intestinal el poseer un amplio repertorio de operones fimbriales. El genoma de *C. rodentium* contiene 19 supuestos operones fimbriales (Petty *et al.* 2010), de los cuales solo han sido estudiados *kfc* y *cfc* mostrando que poseen un papel importante, y al parecer diferencial, durante la colonización del intestino del ratón (Mundy *et al.* 2003; Hart *et al.* 2008), así como *lpf* que al parecer no participa en dicho proceso (Tatsuno *et al.* 2006).

En este trabajo reportamos la identificación y caracterización inicial de un nuevo operón fimbrial denominado *gcf* (“gut colonization fimbria”), el cual es requerido por *C. rodentium* para colonizar el tracto gastrointestinal del ratón. Dicho operón no posee ortólogos en otros patógenos de la familia A/E, incluyendo EPEC y EHEC, lo cual sugiere que la fimbria Gcf podría ser uno de los factores que

determinan la especificidad de hospedero en este grupo de bacterias, permitiendo así la colonización del ratón por *C. rodentium* a diferencia de EPEC y EHEC que no contienen Gcf. Aún más interesante resulta el hecho de que los ortólogos más cercanos de *gcf* se encuentren en bacterias asociadas a plantas como *S. plymuthica* PRI-2C y *B. cepacia* GG4, aisladas de la rizósfera de maíz y jengibre, respectivamente (Garbeva *et al.* 2012; Hong *et al.* 2012), y en *P. vagans* C9-1 (plásmido pPag1), una bacteria Gram-negativa utilizada para el control de *Erwinia amylovora* en árboles de pera y manzana (Smits *et al.* 2010), lo cual sugiere que su adquisición fue a través de un evento de transferencia horizontal, aunque plantea una interrogante sobre su origen y función. Por lo tanto, resultaría interesante determinar si los ortólogos de *gcf* presentes en otras bacterias están involucrados en la adherencia a plantas, a diferencia de *C. rodentium* donde participa en colonización intestinal. Un caso similar se ha reportado para la fimbria ECP de EHEC O157:H7 que participa tanto en la adherencia a células epiteliales en cultivo (HEp-2 y HeLa) (Rendón *et al.* 2007), como en la asociación de la bacteria a hojas de espinaca y lechuga mediada por la unión de ECP a residuos de arabinosa de la pared celular de estas plantas (Saldaña *et al.* 2011; Rossez *et al.* 2014).

En adición a los genes fimbriales *gcfABCD*, el operón *gcf* contiene tres genes putativos de función desconocida, *gcfF* y *gcfG* río arriba del gen *gcfA*, y *gcfE* río abajo de *gcfD*. De estos, *gcfG* y *gcfE* solo poseen homología con proteínas de función desconocida, pero poseen dominios transmembranales predichos, lo que sugiere una función estructural de las proteínas codificadas por estos genes. Por su parte, *gcfF* posee homología con proteínas de la familia colicina, las cuales son un tipo de toxinas bacterianas producidas por ciertos patógenos para eliminar microorganismos competidores en una comunidad microbiana (Cascales *et al.* 2007), esto sugería la posibilidad de que GcfF fuera un factor de virulencia adicional requerido para desplazar a la microbiota intestinal durante el proceso de colonización; sin embargo, experimentos preliminares sugieren que este no es el caso, ya que una cepa mutante de *C. rodentium* $\Delta gcfF$ mostró una cinética de colonización similar a la cepa silvestre en ensayos de infección en ratón (datos no

mostrados). Queda por evaluar el papel en colonización y biogénesis de Gcf de los genes *gcfE* y *gcfG*.

Como ya se mencionó previamente, en este estudio se encontró que la fimbria Gcf es esencial para una colonización eficiente del tracto gastrointestinal del ratón, lo que a su vez descarta la existencia de redundancia funcional con otras fimbrias presentes en esta bacteria. En correlación con estos resultados, durante las etapas iniciales de este proyecto, Cheng *et al.* (2012) reportaron que una cepa mutante de *C. rodentium*, carente del gen *ROD_03671* (*gcfA*), presentó deficiencias en colonización cuando se probó en ensayos de coinfección con la cepa silvestre; sin embargo, a diferencia del presente trabajo, en dicho estudio no se observaron diferencias en experimentos de infección simples con ratones C57BL/6 inoculados por separado con las cepas correspondientes. Aunque la diferencia entre ambos trabajos podría estar relacionada con las condiciones experimentales o con variaciones en la susceptibilidad de los animales, factores conocidos que influyen este tipo de ensayos (revisado por Gill y Finlay, 2011), también podría deberse a la concentración del inóculo utilizado en la infección de los animales, ya que en este estudio encontramos que el defecto en colonización de la mutante fimbrial fue más evidente cuando los ratones se inocularon con concentraciones menores del inóculo bacteriano (5×10^7 y 5×10^6 UFC contra 5×10^8), señalando así que concentraciones altas de inóculo, como la utilizada por Cheng *et al.* (5×10^9 UFC), podrían enmascarar posibles fenotipos atenuados en virulencia. Por otra parte, resulta particularmente interesante que cuando el inóculo utilizado es alto (5×10^8 UFC) la mutante en *gcfA* alcance cuentas bacterianas en el hospedero similares a las obtenidas con la cepa silvestre, pero con una cinética de infección claramente más prolongada que esta, ya que la mutante parece colonizar cuando la silvestre está ya siendo eliminada por el hospedero. Aunque queda por determinar si la mutante es capaz de causar las lesiones A/E en el colon, este resultado sugiere que cuando la carga bacteriana es alta la ausencia de Gcf podría ser suplida, al menos parcialmente, por otro factor de virulencia implicado en la adherencia intestinal, como el SST3 codificado en la isla de patogenicidad LEE, las fimbrias CFC o Kfc (Mundy *et al.* 2003; Hart *et al.*

2008), la adhesina no fimbrial AdcA (Hart *et al.* 2008) o incluso por otro factor no identificado todavía.

A pesar de su importancia durante la colonización, el operón *gcf* se expresó a niveles muy bajos en la cepa silvestre de *C. rodentium* bajo condiciones de crecimiento *in vitro*, incluso en aquellas que promueven la expresión de otros factores de virulencia en esta bacteria (Yang *et al.* 2010), sugiriendo que Gcf podría expresarse específicamente dentro del hospedero a través de un mecanismo de activación aún desconocido. La expresión restringida al hospedero se ha reportado previamente para operones fimbriales de *Salmonella* Typhimurium (Humphries *et al.* 2003), organismo donde además se describió un mecanismo sofisticado de control jerárquico de la expresión fimbrial, en el cual la región 5' no traducida del transcrito de *fimAICDHF* secuestra a CsrA, una proteína de unión a ARN que promueve la traducción de la fimbria Pef (Sterzenbach *et al.* 2013). Adicionalmente, la gran mayoría de los operones fimbriales de *E. coli* K12 y EHEC 0157:H7 son expresados pobremente bajo condiciones de crecimiento *in vitro* (Low *et al.* 2006; Korea *et al.* 2010), correlacionando con el hecho de que la gran mayoría de las fimbrias ensambladas por la vía chaperona/usher no son expresadas constitutivamente, sino que se ensamblan solo bajo condiciones ambientales específicas (Clegg *et al.* 2011). Tal es el caso de la fimbria Kfc de *C. rodentium* que es regulada positivamente por RegA en respuesta a bicarbonato, un oxianión presente en concentraciones altas en el intestino de los mamíferos (Hart *et al.* 2008; Yang *et al.* 2008). En conjunto, estos datos remarcan la complejidad de los mecanismos de regulación fimbrial, los cuales requieren señales ambientales específicas dentro del hospedero para inducir la expresión de estas estructuras bacterianas.

Aunque a la fecha no se sabe si existe un mecanismo que activa la expresión de *gcf in vivo* (dentro del hospedero), en este estudio determinamos el papel de H-NS, un represor global de la expresión génica en bacterias, como un regulador negativo de dicho operón. Los patógenos A/E prototípicos codifican un ortólogo de H-NS y dos proteínas homólogas a esta, denominadas StpA y Ler. StpA es un

parólogo de H-NS altamente conservado en otras bacterias que puede compensar parcialmente la ausencia de esta última (Sonden y Uhlin, 1996); mientras que Ler actúa como un antagonista de H-NS al desreprimir la expresión de varios genes de virulencia localizados dentro y fuera de la isla de patogenicidad LEE (revisado en Mellies *et al.* 2007). Sin embargo, también se sabe que varios parálogos de H-NS pueden coexistir y participar en la regulación génica en una misma bacteria, como se ha demostrado para *Shigella flexneri* (Beloïn *et al.* 2003), *Salmonella Typhimurium* que posee un plásmido que codifica para Sfh, un homólogo de H-NS que promueve la transmisión de plásmidos al silenciar genes que representan un costo energético para la bacteria (Doyle *et al.* 2007) y UPEC, cuya proteína Hfp modula la expresión de diferentes blancos de H-NS, como fimbrias y polisacáridos capsulares (Muller *et al.* 2010). De manera similar, en este trabajo se encontró que el genoma de *C. rodentium* codifica para cinco homólogos de H-NS, incluyendo Ler y StpA, y dos proteínas de función desconocida denominadas H-NS2 y H-NS3 (esta última codificada en el plásmido pCROD2), los cuales se expresaron bajo todas las condiciones de crecimiento ensayadas, lo que sugiere que podrían ser proteínas funcionales. Adicionalmente, *C. rodentium* también contiene un gen (*ROD_20581*) que codifica para una proteína H-NS truncada (H-NST), la cual podría funcionar como una dominante negativa para los otros homólogos de H-NS expresados en esta bacteria. Casos similares se han reportado para los patógenos A/E, EPEC (Muller *et al.* 2007) y EHEC (Levine *et al.* 2014), donde proteínas H-NST funcionan como antagonistas de H-NS y favorecen la expresión de los genes contenidos en la isla de patogenicidad LEE.

Los resultados obtenidos con las diferentes mutantes en los genes *hns* de *C. rodentium* revelaron que el operón *gcf* es reprimido específicamente por H-NS1, el ortólogo más cercano de la H-NS de *E. coli* K12, mientras que los otros homólogos no tuvieron un efecto evidente en la regulación de *gcf*. Sin embargo, en ausencia del regulador negativo (H-NS1), tanto el promotor *gcfF-P1* como la proteína GcfA, se expresaron a diferentes niveles dependiendo del medio de cultivo utilizado, siendo en medio MM-N donde se observó la mayor expresión de *gcf*. Estos datos sugieren que existen factores de regulación adicionales a H-NS, los cuales

responden a condiciones de crecimiento específicas, que modulan la expresión del operón *gcf* aun en ausencia del represor. A este respecto, Cheng *et al.* (2012) observaron que la expresión de *gcfA* (*ROD_03671*) disminuyó ~2.5 veces en una mutante de *C. rodentium* afectada en el operón de transporte de fosfatos *pstSCAB-phoU* en comparación con la cepa silvestre. Las mutaciones en el operón *pstSCAB-phoU* causan desrepresión del sistema de regulación de dos componentes PhoR/PhoB, y aunque no se identificaron sitios probables de unión para PhoB en la región reguladora de *gcf*, los resultados de Cheng *et al.* (2012) sugieren que PhoB regula de manera indirecta la expresión de este operón mediante un regulador no identificado perteneciente al regulón Pho.

La unión de H-NS a la región reguladora de *gcf* apoya la idea de que la represión ejercida por esta proteína es directa y sugiere que se requiere un regulador positivo para desplazar a H-NS de sus sitios de unión. El desplazamiento de H-NS por otras proteínas reguladoras es un mecanismo de regulación en varios operones fimbriales, tanto de bacterias patógenas como no patógenas (Clegg *et al.* 2011). Por ejemplo, en el caso de EHEC, H-NS reprime la expresión de la fimbria Lpf mediante interacción directa con la región promotora del operón *lpf*, represión que es contrarrestada por la unión de Ler a la misma región de ADN (Torres *et al.* 2012). De forma similar, RegA de *C. rodentium* se une a un operador localizado cerca del promotor de *kfc*, lo que resulta en el desplazamiento de H-NS y, por lo tanto, la desrepresión transcripcional de los genes involucrados en la biogénesis de la fimbria Kfc (Yang *et al.* 2008). En el caso del operón *fim* de *E. coli* K-12, dos de los múltiples sitios de unión de H-NS en la región promotora se traslapan con sitios de unión del activador SlyA, reflejando la competencia de ambas proteínas reguladoras por la unión a una misma secuencia operadora (McVicker *et al.* 2011). El factor de integración del hospedero (IHF) también posee un papel esencial en contrarrestar la represión ejercida por H-NS en el promotor *ecp* de EPEC y EHEC (Martínez-Santos *et al.* 2012). Por lo tanto, se requerirán estudios posteriores para identificar un probable regulador positivo que contrarreste la represión por H-NS del operón *gcf* y/o sea necesario para la activación del promotor. Por otra parte, resulta interesante que

se requiera la región reguladora completa de *gcf* para una unión y represión eficiente por H-NS, esto podría indicar que la proteína se une a sitios distales en dicha región y que la posterior oligomerización de la proteína unida a ambos operadores genera la formación de una horquilla en el ADN que secuestra a la ARN polimerasa e impide la transcripción de *gcf*. Aunque se requieren más ensayos para validar esta hipótesis, la formación de horquillas de represión por H-NS ya se ha descrito previamente en varios elementos genéticos, como son el plásmido pUC19 (Wiggins *et al.* 2009), el bacteriófago lambda (Lim *et al.* 2012) y el operón *proU* de *E. coli* (Bouffartigues *et al.* 2007), el cual media el transporte de glicina y L-prolina en respuesta a osmolaridad elevada.

Finalmente, los ensayos de expresión dentro del ratón y en tejidos disectados mostraron que la expresión tanto del promotor del operón *LEE2*, y por lo tanto probablemente del resto de los operones del LEE, como del promotor del operón *gcf*, se hace evidente en *C. rodentium* durante los días 5 al 10 pi, indicando que ambos factores de virulencia se expresan dentro del hospedero siguiendo un patrón de expresión temporal similar. De acuerdo con estos resultados, Kamada *et al.* (2012 y 2015) reportaron que una construcción *LEE1-lux* mostró el máximo de expresión al día 5 pi en las regiones correspondientes al ciego y el colon distal de ratones infectados con la cepa silvestre conteniendo la fusión, y que dicha actividad dejó de ser detectada al día 14. Sin embargo, en este estudio encontramos que un promotor representativo del LEE, además de expresarse en el ciego y el colon, también presenta cierta activación a lo largo de todo el tracto gastrointestinal a diferentes días post-infección, lo que sugiere que *C. rodentium* podría estar colonizando otros nichos no reportados previamente, como son el intestino delgado e incluso el estómago. En contraste, el promotor de *gcf* se activó al parecer exclusivamente en el ciego, el íleo distal y el colon de los ratones infectados, sugiriendo que esta fimbria es requerida para colonizar eficiente y específicamente estos nichos.

En resumen, en este estudio se demostró que los genes *gcfFGABCDE* de *C. rodentium* codifican para un factor de virulencia esencial para la colonización

eficiente del tracto gastrointestinal del ratón. Dicho *locus* genético constituye un operón cuya expresión se favorece durante el proceso de infección y es reprimido fuertemente por H-NS1, uno de los cinco homólogos de H-NS expresados en *C. rodentium*. H-NS1 se une directamente a la región reguladora de *gcf* reprimiendo la expresión del promotor principal *gcfF-P1* y de un promotor secundario (*gcfF-P2*) aún no caracterizado en detalle.

Este trabajo, en conjunto con reportes previos sobre otros operones fimbriales de *C. rodentium*, contribuye a un mejor entendimiento de la función y regulación de las fimbrias ensambladas por la vía chaperona/usher, y remarca la relevancia del repertorio fimbrial durante la infección gastrointestinal causada por este patógeno bacteriano.

9.- PERSPECTIVAS

- Identificar otros reguladores del operón fimbrial por mutagénesis al azar o empleando un banco de genes de *C. rodentium*.
- Analizar el papel de los genes que integran el operón *gcf* en la biogénesis de la fimbria mediante la generación de mutantes y la observación de Gcf por microscopía electrónica.
- Determinar si los genes de función desconocida *gcfF*, *gcfG* y *gcfE* codifican para proteínas estructurales o reguladoras, o ejercen una función accesoria a la fimbria.
- Analizar la función de los diferentes homólogos de H-NS encontrados en *C. rodentium*.

10.- BIBLIOGRAFÍA

1. Abraham, J. M., Freitag, C. S., Clements, J. R. y Eisenstein, B. I. (1985) An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A. 82: 5724-5727
2. Allen, W. J., Phan, G. y Waksman, G. (2012). Pilus biogenesis at the outer membrane of Gram-negative bacterial pathogens. Curr Opin Struct Biol. 22: 500–506.
3. Barba, J., Bustamante, V. H., Flores-Valdez, M. A., Deng, W., Finlay, B. B. y Puente, J. L. (2005) A Positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. J Bacteriol. 187: 7918–7930.
4. Beloin, C., Deighan, P., Doyle, M. y Dorman, C. J. (2003). *Shigella flexneri* 2a strain 2457T expresses three members of the H-NS-like protein family: characterization of the Sfh protein. Mol Genet Genomics. 270: 66–77.
5. Bertin, P., Benhabiles, N., Krin, E., Laurent-Winter, C., Tendeng, C., Turlin, E., Thomas, A., Danchin, A. y Brasseur, R. (1999). The structural and functional organization of H-NS-like proteins is evolutionarily conserved in gram-negative bacteria. Mol Microbiol. 31: 319-329.
6. Bhullar, K., Zarepour, M., Yu, H., Yang, H., Croxen, M., Stahl, M., Finlay, B. B., Turvey, S. E. y Vallance, B. A. (2015). The serine protease autotransporter Pic modulates *Citrobacter rodentium* pathogenesis and its innate recognition by the host. Infect Immun. 83: 2636-2650.
7. Bjarnason, J., Southward, C. M. y Surette, M. G. (2003). Genomic profiling of iron-responsive genes in *Salmonella enterica* serovar typhimurium by high-throughput screening of a random promoter library. J Bacteriol. 185: 4973-4982.
8. Bouffartigues, E., Buckle, M., Badaut, C., Travers, A. y Rimsky, S. (2007) H-NS cooperative binding to high-affinity sites in a regulatory element results in transcriptional silencing. Nat Struct Mol Biol. 14: 441-448.
9. Brinton, C. C. Jr. (1965). The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria. Trans N Y Acad Sci. 27: 1003–1054.
10. Bustamante, V. H., Santana, F. J., Calva, E. y Puente, J. L. (2001). Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. Mol Microbiol. 39: 664–678.
11. Casadaban, M. J. (1976). Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. J Mol Biol. 104: 541-555.
12. Cascales, E., Buchanan, S. K., Duché, D., Kleanthous, C., Lloubès, R., Postle, K., Riley, M., Slatin, S. y Cavard, D. (2007). Microbiol Mol Biol Rev. 71: 158-229.
13. Chandry, P. S., Gladman, S., Moore, S. C., Seemann, T., Crandall, K. A. y Fegan, N. (2012). A Genomic Island in *Salmonella enterica* ssp. salamae provides new insights on the genealogy of the locus of enterocyte effacement. PLoS One. 7: e41615.

14. Cheng, C., Wakefield, M. J., Yang, J., Tauschek, M. y Robins-Browne, R. M. (2012). Genome-wide analysis of the Pho regulon in a *pstCA* mutant of *Citrobacter rodentium*. PLoS One. 7: e50682.
15. Cleary, J., Lai, L. C., Shaw, R. K., Straatman-Iwanowska, A., Donnenberg, M. S., Frankel, G. y Knutton, S. (2004). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. Microbiology. 150: 527-538.
16. 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.
17. Collins, J. W., Keeney, K. M., Crepin, V. F., Rathinam, V. A., Fitzgerald, K. A., Finlay, B. B. y Frankel, G. (2014) *Citrobacter rodentium*: infection, inflammation and the microbiota. Nat Rev Microbiol. 12: 612-23.
18. Corcoran, C. P. y Dorman, C. J. 2009. DNA relaxation-dependent phase biasing of the fim genetic switch in *Escherichia coli* depends on the interplay of H-NS, IHF and LRP. Mol Microbiol. 74: 1071–1082.
19. Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M. y Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev. 26: 822-880.
20. Datsenko, K. A. y Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. PNAS 97: 6640-5.
21. De la Cruz, M. A., Fernandez-Mora, M., Guadarrama, C., Flores-Valdez, M. A., Bustamante, V. H., Vazquez, A. y Calva, E. (2007) LeuO antagonizes H-NS and StpA-dependent repression in *Salmonella enterica ompS1*. Mol Microbiol. 66: 727-743
22. Deng, W., Puente, J. L., Gruenheid, S. Li, Y., Vallance, V. A., Vázquez, A., Barba, J., Ibarra, J. A., O'Donnelle, G., Metalnikov, P., Ashman, K.L., Lee, S., Goode, D., Pawson, T. y Finlay, B. B. (2004). Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of pathogenicity island. Proc Natl Acad Sci U S A. 101: 3597-3602.
23. Donato, G. M., Lelivelt, M. J. y Kawula, T. H. (1997) Promoter-specific repression of *fimB* expression by the *Escherichia coli* nucleoid-associated protein H-NS. J. Bacteriol. 179: 6618-6625.
24. Dorman, C. J. (2007). H-NS, the genome sentinel. Nat Rev Microbiol. 5: 157-161.
25. Dorman, C. J. (2014). H-NS-like nucleoid-associated proteins, mobile genetic elements and horizontal gene transfer in bacteria. Plasmid. 75: 1-11.
26. Doyle, M., Fookes, M., Ivens, A., Mangan, M. W., Wain, J. y Dorman, C. J. (2007). An H-NS-like stealth protein aids horizontal DNA transmission in bacteria. Science 315: 251–252.
27. Falconi, M., Gualtieri, M. T., La, T. A., Losso, M. A. y Pon, C. L. (1988). Proteins from the prokaryotic nucleoid: primary and quaternary structure of the 15-kD *Escherichia coli* DNA binding protein H-NS. Mol Microbiol. 2, 323-329.
28. Franzin, F. M. y Sircili, M. P. (2015). Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and

- enterohemorrhagic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation. Biomed Res Int. doi: 10.1155/2015/534738.
29. Garbeva, P., van Elsas, J. D. y de Boer, W. (2012). Draft genome sequence of the antagonistic rhizosphere bacterium *Serratia plymuthica* strain PRI-2C. J Bacteriol. 194: 4119–4120.
 30. Gill, N. y Finlay, B. B. (2011). The gut microbiota: challenging immunology. Nat Rev Immunol. 11:636-637
 31. Grant, S. G., Jessee, 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: 4645-4649.
 32. 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.
 33. 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.
 34. Hicks, S., Frankel, G., Kaper, J. B., Dougan, G. y Phillips, A. D. (1998). Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue *in vitro*. Infect Immun. 66:1570-1578.
 35. 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.
 36. Hommais, F., Krin, E., Laurent-Winter, C., Soutourina, O., Malpertuy, A., Le Caer, J. P., Danchin, A. y Bertin, P. (2001). Large-scale monitoring of pleiotropic regulation of gene expression by the prokaryotic nucleoid-associated protein, H-NS. Mol Microbiol. 40: 20-36.
 37. Hong, K. W., Koh, C. L., Sam, C. K., Yin, W. F. y Chan, K. G. (2012). Complete genome sequence of *Burkholderia sp.* strain GG4, a betaproteobacterium that reduces 3-oxo-N-acylhomoserine lactones and produces different Nacylhomoserine lactones. J Bacteriol. 194: 6317.
 38. Humphries, A. D., Raffatellu, M., Winter, S., Weening, E. H., Kingsley, R. A., Droleskey, R., Zhang, S., Figueiredo, J., Khare, S., Nunes, J., Adams, L. G., Tsois, R. M. y Bäumlér, A. J. (2003). The use of flow cytometry to detect expression of subunits encoded by 11 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial operons. Mol Microbiol. 48: 1357–1376.
 39. Johnson, J. G. y Clegg, S. (2010). Role of MrkJ, a phosphodiesterase, in type 3 fimbrial expression and biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. J Bacteriol. 192: 3944–3950.
 40. Kamada, N., Kim, Y. G., Sham, H. P., Vallance, B. A., Puente, J. L., Martens, E. C. y Núñez, G. (2012) Regulated virulence controls the ability of a pathogen to compete with the gut microbiota. Science. 336: 1325-1329.
 41. Kamada, N., Sakamoto, K., Seo, S. U., Zeng, M. Y., Kim, Y. G., Cascalho, M., Vallance, B. A., Puente, J. L. y Núñez, G. (2015). Humoral Immunity in the Gut

- Selectively Targets Phenotypically Virulent Attaching-and-Effacing Bacteria for Intraluminal Elimination. *Cell Host Microbe*. 17: 617-627.
42. Karmali, M. A., Steele, B. T., Petric, M. y Lim, C. (1983) Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1: 619-620.
 43. Klapproth, J. M., Sasaki, M., Sherman, M., Babbin, B., Donnenberg, M. S., Fernandes, P. J., Scaletsky, I. C., Kalman, D., Nusrat, A. y Williams, I. R. (2005). *Citrobacter rodentium lifA/efa1* is essential for colonic colonization and crypt cell hyperplasia *in vivo*. *Infect Immun*. 73: 1441–1451.
 44. Klemm, P. (1986). Two regulatory *fim* genes, *fimB* and *fimE*, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *EMBO J*. 5: 1389-1393
 45. Korea, C. G., Badouraly, R., Prevost, M. C., Ghigo, J. M. y Beloin, C. (2010). *Escherichia coli* K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone-usher fimbriae with distinct surface specificities. *Environ Microbiol*. 12: 1957–1977.
 46. Lai, Y., Rosenshine, I., Leong, J. M. y Frankel, G. (2013). Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol*. 15: 1796–1808.
 47. Levine, J. A., Hansen, A. M., Michalski, J. M., Hazen, T. H., Rasko, D. A. y Kaper, J. B. (2014). H-NST induces LEE expression and the formation of attaching and effacing lesions in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *PLoS One* 9: e86618.
 48. 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. DOI:10.1038/srep00509
 49. Low, A. S., Holden, N., Rosser, T., Roe, A. J., Constantinidou, C., Hobman, J. L., Smith, D. G., Low, J. C. y Gally, D. L. (2006). Analysis of fimbrial gene clusters and their expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Environ Microbiol*. 8: 1033–1047.
 50. Luperchio, S. A., Newman, J. V., Dangler, C. A., Schrenzel, M. D., Brenner, D. J., Steigerwalt, A. G. y Schauer, D. B. (2000). *Citrobacter rodentium*, the causative agent of transmissible murine colonic hyperplasia, exhibits clonality: synonymy of *C. rodentium* and mouse-pathogenic *Escherichia coli*. *J Clin Microb*. 38: 4343–4350.
 51. Martinez-Santos, V. I., 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.
 52. McVicker, G., Sun, L., Sohanpal, B. K., Gashi, K., Williamson, R. A., Plumbridge, J. y Blomfield, I. C. (2011). SlyA protein activates *fimB* gene expression and type 1 fimbriation in *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem*. 286: 32026–32035.
 53. Mellies, J. L., Barron, A. M. y Carmona, A. M. (2007). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infect Immun*. 75: 4199–4210.
 54. Moon, H. W., Whipp, S. C., Argenzio, R. A., Levine, M. M. y Giannella, R. A. (1983). Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun*. 41: 1340–1351.

55. Müller, D., Benz, I., Liebchen, A., Gallitz, I., Karch, H. y Schmidt, M. A. (2009) Comparative analysis of the locus of enterocyte effacement and its flanking regions. *Infect Immun.* 77: 3501–3513.
56. Müller, C. M., Schneider, G., Dobrindt U., Emödy, L., Hacker, J. y Uhlir, B. E. (2010). Differential effects and interactions of endogenous and horizontally acquired H-NS-like proteins in pathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 75: 280–293.
57. Mundy, R., MacDonald, T. T., Dougan, G., Frankel, G. y Wiles, S. (2005) *Citrobacter rodentium* of mice and man. *Cell Microbiol.* 7: 1697-1706.
58. 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.
59. Nataro, J. P. y Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11: 142-201.
60. Navarre, W. W., Porwollik, S., Wang, Y., McClelland, M., Rosen, H., Libby, S. J. y Fang, F. C. (2006) Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*. *Science* 313: 236-238.
61. Nuccio, S. P. y Bäumlér A. J. (2007). Evolution of the Chaperone/Usher Assembly Pathway: Fimbrial. Classification Goes Greek. *Microbiol Mol Biol Rev.* 72: 551–575
62. Paranchych, W. y Frost, L. S. (1988). The physiology and biochemistry of pili. *Adv Microb Physiol.* 29: 53–114.
63. Peterson, S. N. y Reich, N. O. (2008) Competitive Lrp and Dam assembly at the *pap* regulatory region: implications for mechanisms of epigenetic regulation. *J Mol Biol.* 383: 92-105.
64. 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.
65. Proft, T. y Baker, E. N. (2009). Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria-structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci.* 66: 613– 635.
66. 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.
67. Ramboarina, S., Fernandes, P. J., Daniell, S., Islam, S., Simpson, P., Frankel, G., Booy, F., Donnenberg, M. S. y Matthews, S. (2005). Structure of the bundle-forming pilus from enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 280: 40252-40260.
68. Rendón, M. A., Saldaña, Z., Erdem, A. L., Monteiro-Neto, V., Vázquez, A., Kaper, J. B., Puente, J. L. y Girón, J. A. (2007). Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104: 10637-10642.
69. Rossez, Y., Holmes, A., Lodberg-Pedersen, H., Birse, L., Marshall, J., Willats, W. G., Toth, I. K. y Holden, N. J. (2014). *Escherichia coli* common pilus (ECP) targets

- arabinosyl residues in plant cell walls to mediate adhesion to fresh produce plants. *J Biol Chem.* 2014 289: 34349-34365.
70. Saldaña, Z., Sánchez, E., Xicohtencatl-Cortes, J., Puente, J. L. y Girón, J. A. (2011). Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* O157:H7. *Front. Microbiol.* 2:119. doi: 10.3389/fmicb.2011.00119.
 71. Schmidt, M. A. 2010. LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell Microbiol.* 12:1544-1552.
 72. Sit, B., Crowley, S. M., Bhullar, K., Lai, C. C-L., Tang, C., Hooda, Y., Calmettes, C., Khambati, H., Ma, C., Brumell, J. H., Schryvers, A. B., Vallance, B. A. y Moraes, T.F. (2015) Active Transport of Phosphorylated Carbohydrates Promotes Intestinal Colonization and Transmission of a Bacterial Pathogen. *PLoS Pathog.* 11: e1005107.
 73. Smits, T. H., Rezzonico, F., Kamber, T., Goesmann, A., Ishimaru, C. A., Stockwell, V. O., Frey, J. E. y Duffy, B. (2010). Genome sequence of the biocontrol agent *Pantoea vagans* strain C9-1. *J Bacteriol.* 192: 6486–6487.
 74. Sonden, B. y Uhlin, B. E. (1996). Coordinated and differential expression of histone-like proteins in *Escherichia coli*: regulation and function of the H-NS analog StpA. *EMBO J.* 15: 4970–4980.
 75. Sterzenbach, T., Nguyen, K. T., Nuccio, S. P., Winter, M. G., Vakulskas, C. A., Clegg, S., Romeo, T. y Bäumlér, A. J. (2013). A novel CsrA titration mechanism regulates fimbrial gene expression in *Salmonella* Typhimurium. *EMBO J.* 32: 2872–2883.
 76. Stevens, M. P. y Frankel, G. M. (2014). The Locus of enterocyte effacement and associated virulence factors of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiol Spectrum.* 2: EHEC-0007-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0007-2013.
 77. Takeuchi, A., Inman, L. R., O’Hanley, P. D., Cantey, J. R. y Lushbaugh, W. B. (1978). Scanning and transmission electron microscopic study of *Escherichia coli* O15 (RDEC-1) enteric infection in rabbits. *Infect Immun.* 19: 686–694.
 78. Tatsuno, I., Mundy, R., Frankel, G., Chong, Y., Phillips, A. D., Torres, A. G. y Kaper, J. B. 2006. The *lpf* gene cluster for long polar fimbriae is not involved in adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* or virulence of *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun.* 74: 265–272.
 79. Thanassi, D. G., Bliska J. B. y Christie, P. J. (2012) Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev.* 36: 1046–1082
 80. Thomassin, J. L., Giannakopoulou, N., Zhu, L., Gross, J., Salmon, K., Leclerc, J. M., Daigle, F., Le Moual, H. y Gruenheid, S. (2015) The CpxRA two-component system is essential for *Citrobacter rodentium* virulence. *Infect Immun.* 83: 1919-1928.
 81. Torres, A. G., López-Sánchez, G. N., Milflores-Flores, L., Patel, S. D., Rojas-López, M., Martínez de la Peña, C. F., Arenas-Hernández, M. M. y Martínez-Laguna Y. (2007). Ler and H-NS, regulators controlling expression of the long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol.* 189: 5916-28.

82. Torres, A. G., Milflores-Flores, L., García-Gallegos, J. G., Patel, S. D., Best, A., La-Ragione, R. M., Martínez-Laguna, Y. y Woodward, M. J. (2007). Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae (LPF) of *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Med Microbiol.* 297: 177-85.
83. Torres, A. G., Slater, T. M., Patel, S. D., Popov, V. L. y Arenas-Hernández, M. P. (2008). Contribution of the Ler- and H-NS-regulated long polar fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 during binding to tissue-cultured cells. *Infect Immun.* 76: 5062-5071.
84. Vallance, B. A. y Finlay, B. B. (2000) Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97: 8799-8806
85. Vallance, B. A., Deng, W., Jacobson, K. y Finlay, B. B. (2003). Host susceptibility to the attaching and effacing bacterial pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun.* 71: 3443-3453
86. Wales, A. D., Pearson, G. R., Roe, J. M., Hayes, C. M., La Ragione, R. M. y Woodward, M. J. (2005). Attaching-effacing lesions associated with *Escherichia coli* O157:H7 and other bacteria in experimentally infected conventional neonatal goats. *J Comp Pathol.* 132: 185-194.
87. Wiggins, P. A., Dame, R. T., Noom, M. C. y Wuite, G. J. L. (2009). Protein-Mediated Molecular Bridging: A Key Mechanism in Biopolymer Organization. *Biophysical J.* 97: 1997–2003.
88. Wong, A. R., Pearson, J. S., Bright, M. D., Munera, D., Robinson, K. S., Lee, S. F., Frankel, G. y Hartland, E. L. (2011). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Mol Microbiol.* 80: 1420–1438.
89. Yang, J., Hart, E., Tauschek, M., Price, G. D., Hartland, E. L., Strugnell, R. A. y Robins-Browne, R. M. (2008). Bicarbonate-mediated transcriptional activation of divergent operons by the virulence regulatory protein, RegA, from *Citrobacter rodentium*. *Mol Microbiol.* 68: 314-327.
90. 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: 259–268.

11.- ANEXO I.- ARTÍCULOS PUBLICADOS Y COLABORACIONES

Con base en los resultados iniciales de este proyecto se publicó el siguiente artículo de investigación:

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

Así como el artículo de divulgación:

- **Caballero-Flores, G. G.** y Puente, J. L. (2015). Fimbrias: Estructuras bacterianas que promueven la colonización intestinal por bacterias patógenas. *Biocología en movimiento.* 3: 9-10.

Por otro lado, durante el primer año de mi Doctorado realicé una breve pero productiva estancia en el laboratorio del Dr. Mario Soberón Chávez, participando en la consolidación de un segundo artículo titulado:

- Jiménez, A. I., Reyes, E. Z., Cancino-Rodezno, A., Bedoya-Pérez, L. P., **Caballero-Flores, G. G.**, Muriel-Millán, L. F., Likitvivatanavong, S., Gill, S. S., Bravo, A. and Soberón, M. (2012). *Aedes aegypti* alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins. *Insect Biochem Mol Biol.* 42: 683-689.

Adicionalmente, en colaboración con la Dra. Verónica I. Martínez Santos, participé en el proyecto de investigación “Análisis de la regulación transcripcional del operón fimbrial *ecp* en *Citrobacter rodentium*”, cuyo manuscrito se encuentra en preparación, pero que ha sido presentado en el siguiente congreso nacional:

- Martínez-Santos V.I., Escalera-Maurer A., Medrano-López A., **Caballero-Flores G.** Vázquez A. y Puente J.L. CreR, una proteína con dominio EAL, regula la expresión de *ecp* en *Citrobacter rodentium*. 39º Congreso de la Asociación Mexicana de Microbiología. 22 al 26 de marzo del 2015, Querétaro.

A continuación se presentan solo los artículos publicados descritos anteriormente.

Identification and Regulation of a Novel *Citrobacter rodentium* Gut Colonization Fimbria (Gcf)

Gustavo G. Caballero-Flores,^a Matthew A. Croxen,^b Verónica I. Martínez-Santos,^a B. Brett Finlay,^b José L. Puente^a

Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, Mexico^a; Michael Smith Laboratories, The University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada^b

ABSTRACT

The Gram-negative enteric bacterium *Citrobacter rodentium* is a natural mouse pathogen that has been extensively used as a surrogate model for studying the human pathogens enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. All three pathogens produce similar attaching and effacing (A/E) lesions in the intestinal epithelium. During infection, these bacteria employ surface structures called fimbriae to adhere and colonize the host intestinal epithelium. For *C. rodentium*, the roles of only a small number of its genome-carried fimbrial operons have been evaluated. Here, we report the identification of a novel *C. rodentium* colonization factor, called gut colonization fimbria (Gcf), which is encoded by a chaperone-usher fimbrial operon. A *gcfA* mutant shows a severe colonization defect within the first 10 days of infection. The *gcf* promoter is not active in *C. rodentium* under several *in vitro* growth conditions; however, it is readily expressed in a *C. rodentium* Δ *hns1* mutant lacking the closest ortholog of the *Escherichia coli* histone-like nucleoid structuring protein (H-NS) but not in mutants with deletion of the other four genes encoding H-NS homologs. H-NS binds to the regulatory region of *gcf*, further supporting its direct role as a repressor of the *gcf* promoter that starts transcription 158 bp upstream of the start codon of its first open reading frame. The *gcf* operon possesses interesting novel traits that open future opportunities to expand our knowledge of the structure, regulation, and function during infection of these important bacterial structures.

IMPORTANCE

Fimbriae are surface bacterial structures implicated in a variety of biological processes. Some have been shown to play a critical role during host colonization and thus in disease. Pathogenic bacteria possess the genetic information for an assortment of fimbriae, but their function and regulation and the interplay between them have not been studied in detail. This work provides new insights into the function and regulation of a novel fimbria called Gcf that is important for early establishment of a successful infection by *C. rodentium* in mice, despite being poorly expressed under *in vitro* growth conditions. This discovery offers an opportunity to better understand the individual role and the regulatory mechanisms controlling the expression of specific fimbrial operons that are critical during infection.

The natural mouse pathogen *Citrobacter rodentium* and the human pathogens enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) represent a family of enteric pathogenic bacteria that adhere to the host intestinal epithelial cells and inject effector proteins through a specialized type III secretion system (T3SS), subverting or hijacking several cell functions and leading to the formation of a distinctive histopathology known as the attaching and effacing (A/E) lesion (1, 2). These three pathogens produce similar lesions in the intestinal epithelium of their respective hosts, which are characterized by the intimate attachment of the bacteria to the plasma membrane of the host epithelial cells, the formation of pedestal-like structures, and the effacement of the brush border microvilli (3). The A/E phenotype is conferred by the locus of enterocyte effacement (LEE), a pathogenicity island encoding the T3SS components, as well as translocators, secreted effector proteins, an adhesin (intimin), the translocated intimin receptor Tir, and regulatory proteins (reviewed in reference 4). *C. rodentium* has been extensively used as a surrogate model for studying the molecular and cellular pathogenesis of infections with the human pathogens EPEC and EHEC, for which there is no natural animal model of disease (5, 6).

During the early stages of the infectious process, *C. rodentium* employs surface structures termed fimbriae to adhere and colonize the mouse intestinal epithelium (7, 8). These bacterial struc-

tures are hair-like, peritrichous, and nonflagellar surface appendages that have been implicated in biological processes, including phage binding, DNA transfer, biofilm formation, cell aggregation, host cell invasion, and twitching motility (reviewed in reference 9). Additionally, fimbriae can mediate the attachment and infection of target cells, as well as the evasion of the host immune system, and for this reason are considered important virulence factors for several diseases, in particular infections of the urinary, genital, and gastrointestinal tracts (reviewed in reference 9). Whole-genome sequencing revealed that *C. rodentium* has a repertoire of 19 putative fimbrial operons (10); however, only the K99-like factor involved in *Citrobacter* colonization (*kfc*) chaper-

Received 10 November 2014 Accepted 3 February 2015

Accepted manuscript posted online 9 February 2015

Citation Caballero-Flores GG, Croxen MA, Martínez-Santos VI, Finlay BB, Puente JL. 2015. Identification and regulation of a novel *Citrobacter rodentium* gut colonization fimbria (Gcf). *J Bacteriol* 197:1478–1491. doi:10.1128/JB.02486-14.

Editor: V. J. DiRita

Address correspondence to José L. Puente, puente@ibt.unam.mx.

Copyright © 2015, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JB.02486-14

one-usher fimbrial operon (7) and the colonization factor of *Citrobacter (cfc)* type IV fimbrial locus (8) have been studied and reported as important colonization factors, whereas the long polar fimbria (Lpf) has no discernible role in *C. rodentium* virulence (11).

While there is a better understanding of the regulation of the *C. rodentium* LEE pathogenicity island (12), how the expression of its fimbrial operons is regulated is very poorly understood. Recently, it has been shown that the RegA protein, an AraC-like regulator, controls the expression of the *kfc* operon in response to bicarbonate ions by displacing the histone-like nucleoid structuring protein (H-NS) (13). H-NS is a global regulator of bacterial gene expression that has also been implicated in fimbrial repression in EPEC (14) and EHEC (15).

In this study, we identified a novel *C. rodentium* colonization factor, called gut colonization fimbria (Gcf), which is required for the efficient colonization of the mouse gastrointestinal tract. Based on its importance in *C. rodentium* colonization, we carried out studies into the regulation of the *gcf* operon, demonstrating that it is strongly repressed by H-NS under several *in vitro* growth conditions that sustain the expression of other fimbrial operons. In the absence of H-NS, the *gcf* operon, consisting of 7 genes (*gcfFGABCDE*), is expressed from a distal putative σ^{70} promoter that is differentially regulated by the growth medium. H-NS binds to the full-length regulatory region of *gcf*, indicating that it has a direct role in its repression. These results reinforce the concept that A/E pathogenesis is a complex process that requires the coordinated action of various virulence factors (including fimbriae) during the different stages of the host colonization process and also highlights the importance of furthering our understanding of the relevance that the fimbrial repertoire has for any given pathogen.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, and growth conditions. Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Unless otherwise specified, bacteria were routinely grown overnight at 37°C with shaking (200 rpm) in test tubes with 5 ml of the following culture media: lysogeny broth (LB), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco/Invitrogen), or minimal medium N (MM-N) (16), containing KCl (5 mM), (NH₄)₂SO₄ (7.5 mM), K₂SO₄ (0.5 mM), KH₂PO₄ (1 mM), MgCl₂ (200 μ M), Casamino Acids (0.1 g/liter), and glycerol (0.5%), pH 7.5. When necessary, antibiotics were added at the following concentrations: kanamycin (Km) at 70 μ g/ml, ampicillin (Ap) at 200 μ g/ml, and tetracycline (Tc) at 15 μ g/ml.

DNA manipulation techniques. Standard recombinant DNA procedures were used to perform plasmid purification, PCR, ligation, restriction digests, transformation, and gel electrophoresis (17). All restriction and DNA-modifying enzymes were obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA) or Fermentas (Pittsburgh, PA) and were used according to the manufacturer's instructions. Synthesis of oligonucleotide primers (Table 2) and DNA sequencing were performed, respectively, by the Oligonucleotide Synthesis and DNA Sequencing Facilities at Instituto de Biotecnología (UNAM, Cuernavaca, Mexico).

Construction of *gcf-cat* transcriptional fusions. To generate the *gcf-cat* transcriptional fusions described in Table 1, various fragments spanning different portions of the *gcf* operon upstream putative regulatory region were amplified by PCR using specific oligonucleotides (Table 2) and wild-type (WT) *C. rodentium* chromosomal DNA as the template. The PCR products were purified with the High Pure PCR product purification kit (Roche) and digested with BamHI and HindIII and then ligated with T4 DNA ligase (Fermentas, Pittsburgh, PA) to plasmid pKK232-8

(Pharmacia LKB Biotechnology), which contains a promoterless *cat* gene, digested with the same enzymes, generating the transcriptional fusions described in Table 1. All recombinant plasmids were sequenced and then transformed by electroporation into the different *C. rodentium* or *E. coli* genetic backgrounds as specified.

Chloramphenicol acetyltransferase assay. Analysis of the kinetics of transcriptional activity of the *gcf1-cat* fusion carried by plasmid pK-gcf1 (Table 1) showed that transcriptional activity at 12 h was representative of the maximal activity observed during the growth curve (data not shown). Therefore, chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity and protein concentration were determined from whole-cell extracts of bacteria grown for approximately 12 h at 37°C with shaking in test tubes containing 5 ml of LB, DMEM, or MM-N, as previously described (18). The data are expressed as μ mol/min/mg of protein and are the results from at least three independent assays done in duplicate. The empty vector pKK232-8 did not show measurable levels of CAT activity in any of the strains used in the study (data not shown).

Construction of mutant strains and epitope tagging of chromosomal genes. The nonpolar deletion mutants described in Table 1 were constructed by the λ -Red recombinase system (19), using PCR deletion cassettes amplified with the corresponding specific primer pairs described in Table 2 and plasmid pKD4, containing the kanamycin resistance cassette, as the template. All mutations were confirmed by PCR amplification using primers flanking the disrupted genes. The strains expressing FLAG-tagged proteins encoded in the chromosome were obtained by a modified version of the same method (20), but in this case by PCR amplifying the 3 \times FLAG epitope from plasmid pSUB11 by using the corresponding primers described in Table 2.

RNA isolation and reverse transcription (RT)-PCR. WT and Δ *hns1::Km* *C. rodentium* strains were grown overnight in 5 ml of LB and then diluted 1:100 in Erlenmeyer flasks containing 50 ml of MM-N and grown at 37°C with shaking to mid-log phase (optical density at 600 nm [OD₆₀₀] of ~0.4). Bacteria from 20 ml of each culture were harvested by centrifugation, and total RNA was purified using TRIzol reagent (Invitrogen) as specified by the supplier. RNA samples were treated with DNase I (Fermentas), quantified by measuring the absorbance at 260/280 nm, and qualitatively analyzed on agarose gels.

RT-PCR assays were carried out with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen), using 1 μ g of total RNA per reaction and pairs of specific primers (Table 2) to amplify different regions of the *gcf* operon. In addition, a negative control without the addition of reverse transcriptase and a positive control with genomic DNA were included for each reaction.

Primer extension and sequencing ladder. The Δ *hns1::Km* *C. rodentium* strain containing the pK-gcf2 plasmid (Table 1) was grown in 50 ml of LB, DMEM, or MM-N for 4 h at 37°C with shaking, and total RNA was isolated as described above. The pKK-Seq-I oligonucleotide (Table 2), annealing 70 bp downstream of the multiple cloning site of plasmid pKK232-8, was labeled with [γ -³²P]ATP and T4 polynucleotide kinase (Invitrogen) by following the manufacturer's instructions. The ³²P-pKK-Seq-I oligonucleotide was mixed in hybridization buffer (0.2 M NaCl, 0.3 M Tris-HCl [pH 8.0]) with 15 μ g of total RNA. Reaction mixtures were incubated at 90°C for 3 min, slowly cooled down to reach 50°C, and reverse transcribed with murine leukemia virus (MLV) reverse transcriptase (Invitrogen) for 90 min at 37°C. The generated cDNA was precipitated, separated on an 8% polyacrylamide-7 M urea gel, and visualized by autoradiography. As a negative control, a parallel reaction with RNA purified from the same Δ *hns1::Km* mutant strain but lacking the pK-gcf2 plasmid was carried out. A sequencing ladder was generated with the Thermo-Sequenase kit (USB, Cleveland, OH), as specified by the supplier and using the same ³²P-oligonucleotide utilized for the primer extension reactions and pK-gcf2 as the template. The sequencing ladder was analyzed on the same gel in the lanes adjacent to the primer extension samples.

Site-directed PCR mutagenesis. Site-directed mutagenesis of the consensus *gcf* promoter sequences was performed using the QuikChange kit

TABLE 1 Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Description (relevant genetic characteristics)	Antibiotic resistance	Reference/source
Strains			
<i>C. rodentium</i>			
DBS100	Wild-type <i>C. rodentium</i> DBS100	Ap ^b	52
JPCR1	DBS100 Δ <i>hns1</i> ::Km derivative with deletion of the <i>hns1</i> (ROD_17711) gene	Km	This study
JPCR2	DBS100 Δ <i>hns2</i> ::Km derivative with deletion of the <i>hns2</i> (ROD_20571) gene	Km	This study
JPCR3	DBS100 Δ <i>hns3</i> ::Km derivative with deletion of the <i>hns3</i> (ROD_p2271) gene	Km	This study
JPCR4	DBS100 Δ <i>stpA</i> ::Km derivative with deletion of the <i>stpA</i> (ROD_31391) gene	Km	This study
JPCR5	DBS100 Δ <i>ler</i> ::Km derivative with deletion of the <i>ler</i> (ROD_30151) gene	Km	This study
JPCR6	DBS100 Δ <i>gcfA</i> ::Km derivative with deletion of the <i>gcfA</i> (ROD_03671) gene	Km	This study
JPCR7	DBS100 <i>hns1</i> ::3×FLAG-Km derivative expressing H-NS1-FLAG	Km	This study
JPCR8	DBS100 <i>hns2</i> ::3×FLAG-Km derivative expressing H-NS2-FLAG	Km	This study
JPCR9	DBS100 <i>hns3</i> ::3×FLAG-Km derivative expressing H-NS3-FLAG	Km	This study
JPCR10	DBS100 <i>stpA</i> ::3×FLAG-Km derivative expressing StpA-FLAG	Km	This study
JPCR11	DBS100 <i>ler</i> ::3×FLAG-Km derivative expressing Ler-FLAG	Km	This study
JPCR12	DBS100 <i>gcfA</i> ::3×FLAG-Km derivative expressing GcfA-FLAG	Km	This study
JPCR13	JPCR1 derivative upon excision of the Km cassette	No	This study
JPCR14	JPCR13 <i>gcfA</i> ::3×FLAG-Km derivative expressing GcfA-FLAG	Km	This study
<i>E. coli</i>			
MC4100	F' <i>araD139</i> Δ (<i>argF-lac</i>)U169 <i>rpsL150 relA1 flb5301 deoC1 ptsF25 rbsR</i>	Str	53
JPMC1	MC4100 Δ <i>hns</i> ::Km derivative	Km	54
DH5 α	λ - ϕ 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ m _K ⁻) <i>supE44 thi-1 gyrA relA1</i>	Nal	55
Plasmids			
pKD46	Red recombinase system under the control of the <i>araBAD</i> promoter	Ap	19
pKD4	Kanamycin cassette template plasmid	Ap Km	19
pSUB11	3× FLAG epitope template plasmid	Ap Km	20
pKK232-8	pBR322 derivative containing a promoterless <i>cat</i> reporter gene	Ap	Pharmacia Biotech
pMPM-T3	Low-copy-number cloning vector (p15A derivative)	Tc	56
pT3-HNS	pMPM-T3 derivative expressing <i>E. coli</i> H-NS	Tc	57
pMDH-NS	pBAD-Myc-His ₆ C carrying the <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi <i>hns</i> gene fused to Myc-His ₆ under the arabinose promoter	Ap	21
pK-gcf1	<i>gcf1-cat</i> transcriptional fusion from nt -93 to +185 ^a	Ap	This study
pK-gcf2	<i>gcf2-cat</i> transcriptional fusion from nt -93 to +27 ^a	Ap	This study
pK-gcf3	<i>gcf3-cat</i> transcriptional fusion from nt +10 to +185 ^a	Ap	This study
pK-gcf4	<i>gcf4-cat</i> transcriptional fusion from nt -93 to +104 ^a	Ap	This study
pK-gcf1-mut	pK-gcf1 derivative with a modified -35 promoter sequence (TTGAGT to GGGAGT)	Ap	This study
pK-gcf2-mut	pK-gcf2 derivative with a modified -35 promoter sequence (TTGAGT to GGGAGT)	Ap	This study
pK-gcf1-mutB	pK-gcf1 derivative with a modified -10 promoter sequence (TAACAT to GAACAG)	Ap	This study
pK-gcf2-mutB	pK-gcf2 derivative with a modified -10 promoter sequence (TAACAT to GAACAG)	Ap	This study

^a Coordinates of the fragments contained in the transcriptional fusions are with respect to the transcriptional start site (TSS) of the *gcf* operon (Fig. 1).

^b Mild resistance.

(Stratagene) according to the manufacturer's instructions with specific mutagenic primers (Table 2) and pK-gcf1 or pK-gcf2 plasmid DNA as the template (Table 1). All the mutant constructs were verified by DNA sequencing and transformed by electroporation into WT or Δ *hns1*::Km mutant *C. rodentium*.

Electrophoretic mobility shift assays (EMSAs). Different DNA fragments encompassing various portions of the *gcf* operon regulatory region were amplified by PCR using specific primers (Table 2) and WT *C. rodentium* chromosomal DNA as the template. These fragments were quantified in a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific), and approximately 100 ng of the PCR fragments was mixed in binding buffer (40 mM HEPES, 8 mM MgCl₂, 50 mM KCl, 1 mM dithiothreitol [DTT], 0.05% Nonidet P-40, and 0.1 mg/ml bovine serum albumin [BSA]) with increasing concentrations of purified H-NS-Myc-His₆ protein, which was expressed in and purified from the *E. coli* BL21 (DE3) strain carrying plasmid pMDH-NS, as described previously (21). The reaction mixtures were incubated for 20 min at room temperature and then separated by electrophoresis in 6% polyacrylamide gels in Tris-borate-EDTA buffer at room

temperature. The DNA was stained with ethidium bromide and visualized with a UV transilluminator. A fragment corresponding to the structural region of the *ecpR* gene was used as a negative control (14).

Western blotting. Overnight cultures of the FLAG-tagged strains (Table 1) were subcultured in test tubes containing 5 ml of LB, DMEM, or MM-N and incubated at 37°C with shaking for 4 h. The OD₆₀₀ of the grown cultures was determined, and then the pellet of 1 ml of each bacterial suspension was resuspended in loading buffer (microliter of loading buffer = OD₆₀₀ of culture × 100). The resulting suspensions were boiled at 95°C for 10 min, subjected to a 12% SDS-PAGE gel, and transferred to 0.22- μ m-pore-size nitrocellulose membranes (Amersham). Blots were blocked with 5% nonfat milk and incubated with monoclonal antibodies (Invitrogen) against the FLAG epitope (dilution of 1:5,000) or DnaK (1:10,000). Membranes were washed with phosphate-buffered saline (PBS), immunostained with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse antibody (1:10,000) (Biomed), and developed with the Western Lightning Plus ECL kit (PerkinElmer), as specified by the suppliers.

TABLE 2 Oligonucleotides used in this study

Name	Sequence (5'→3')	Use
mch-Fw	GAGTAAGGATCCCTGAATTACCCAAAAGCGCATTAC ^a	Generation of <i>cat</i> transcriptional fusions
3691-Rv	CACCAAAAGCTTCGTTGATTTCCTGCACATGT ^a	<i>gcf1</i> , <i>gcf2</i> , and <i>gcf4</i>
b4.1-Rv	GTGATAAGCTTGCTGAGAGTAGG ^a	For fusions <i>gcf1</i> and <i>gcf3</i>
b4.1-Fw	GGTGATGGATCCTACTCTCAGCAAGATTATC ^a	For fusion <i>gcf2</i>
b4.3-Rv	CAGAGCTAAGCTTCATCACAACAGTATTCCAGG ^a	For fusion <i>gcf3</i>
RT-3691-Fw	CATTACCAGTGGCCTGTATAAAG ^a	For fusion <i>gcf4</i>
cfbA-Rev	AACCCAAAGCTTGAACAACCAACGAGGAAAGAAG ^a	RT-PCR of <i>gcfFGA</i>
cfbA-Fw	GAGTTTGGATCCCCTATGGCTATTGACGGTAC ^a	RT-PCR of <i>gcfAB</i>
RT-cfbB-Rv	GGAAAACGACTGGAAGGATGTAAG	RT-PCR of <i>gcfAB</i>
RT-cfbB-Fw	GCTAAGGTCAGCCTGATTGAATC	RT-PCR of <i>gcfBC</i>
RT-cfbC-Rv	CAGCGATCGTCCCAACTGTAAG	RT-PCR of <i>gcfBC</i>
RT-cfbC-Fw	GCATCTGTAAAGGATAGCAAAG	RT-PCR of <i>gcfCDE</i>
RT-cfbE-Rv1	CATATACAGTTCAGTGTATCAG	RT-PCR of <i>gcfCDE</i>
D-HNS1-Fw	CTCTATTATTAGCTCAACAACCCCAATATAAGTTTGAGATTACTACATGTAGG CTGGAGCTGCTTCG ^b	Mutagenesis of <i>hns1</i>
D-HNS1-Rv	GGGGCAAAAAAATCCCGCGGAGGCGGGATTCTTGACAGGCTGTTGCTGACATA TGAATATCCTCCTTAG ^b	Mutagenesis of <i>hns1</i>
D-HNS2-Fw	GCATACATTATTTTATTAATCGCCCTTTTAAAAACCCGACAACATACTTGTAGG CTGGAGCTGCTTCG ^b	Mutagenesis of <i>hns2</i>
D-HNS2-Rv	GAACCTGTTTCAGGTAGCAGGCTCTACCAGAGAAAATCAGAGTTAATACAAGCATAT GAATATCCTCCTTAG ^b	Mutagenesis of <i>hns2</i>
D-StpA-Fw	TACACTACCCGCGTAATACAAAATTTTAGCGTTATAAGGTTTAAATTATTGTAGG CTGGAGCTGCTTCG ^b	Mutagenesis of <i>stpA</i>
D-StpA-Rv	ATAACAAACGCGTAAAATATGCGGTGAGGATAACCTCACCGCCGGGTGACATAT GAATATCCTCCTTAG ^b	Mutagenesis of <i>stpA</i>
D-HNS3-Fw	AAGGTTCTTCCGGCTCTGGAAGTACGTCCACTAAACAAGAGGATTAATTTGTAG GCTGGAGCTGCTTCG ^b	Mutagenesis of <i>hns3</i>
D-HNS3-Rv	GTCCCCTCCATTGCGCTCGCAAACCTGTTTTCGACGGCATCACGATTATTCATA TGAATATCCTCCTTAG ^b	Mutagenesis of <i>hns3</i>
D-Ler-Fw	TTGACCCATCCATGTAAGGATGAGCTTGTTAATATCTTAATATATAAAAGTTGTAG GCTGGAGCTGCTTCG ^b	Mutagenesis of <i>ler</i>
D-Ler-Rv	TTATTATTTTCATCTCCAGTTCAGTTATCGTTATCATTAAATTATTTTCATGCATATGA ATATCCTCCTTAG ^b	Mutagenesis of <i>ler</i>
D-cfbA-Fw	TTTAATCAGATAAGGATTTTTATGAAAAAGTACTCTTTCCCTGTAGGCTGGAGCT GCTTCG ^b	Mutagenesis of <i>gcfA</i>
D-cfbA-Rv	GTAATCAATACAAGCGCGGTATTACTCGTAGTCGATCGAGTACATATGAATATCC TCCTTAG ^b	Mutagenesis of <i>gcfA</i>
HNS1-Flag-Fw	AAAGCAATGGAAGAGCAAGGTAAACAGCTGGAAGATTCCTGATCAAGGAAGACT ACAAAAGACCATGACGG ^c	3× FLAG tagging of <i>hns1</i>
HNS1-Flag-Rv	GGGGCAAAAAAATCCCGCGGAGGCGGGATTCTTGACAGGCTGTTGCTGACATA TGAATATCCTCCTTAG ^c	3× FLAG tagging of <i>hns1</i>
HNS2-Flag-Fw	GCGATCGCTGCTGCTATCGAAGCTGGTAAACACTGGAAGACTTCGCGATCGACTA CAAAGACCATGACGG ^c	3× FLAG tagging of <i>hns2</i>
HNS2-Flag-Rv	GAACCTGTTTCAGGTAGCAGGCTCTACCAGAGAAAATCAGAGTTAATACAAGCATA TGAATATCCTCCTTAG ^c	3× FLAG tagging of <i>hns2</i>
StpA-Flag-Fw	CGATCGCCAGAGCGCTGGCTGAAGGAAAATCTCTCGACGATTCCTGATCGACTAC AAAGACCATGACGG ^c	3× FLAG tagging of <i>stpA</i>
StpA-Flag-Rv	ATAACAAACGCGTAAAATATGCGGTGAGGATAACCTCACCGCCGGGTGACATAT GAATATCCTCCTTAG ^c	3× FLAG tagging of <i>stpA</i>
HNS3-Flag-Fw	CATTTCATGGAAGATTTTCCTCATTGACAACTGCAACCTGGGCAGGTTGAAGAC TACAAAAGACCATGACGG ^c	3× FLAG tagging of <i>hns3</i>
HNS3-Flag-Rv	GTCCCCTCCATTGCGCTCGCAAACCTGTTTTCGACGGCATCACGATTATTCATA TGAATATCCTCCTTAG ^c	3× FLAG tagging of <i>hns3</i>
Ler-Flag-Fw	GATTTTCTGTGAAGGACACAGAAGAAGTAACATCTCTGAATAACATTGACT ACAAAAGACCATGACGG ^c	3× FLAG tagging of <i>ler</i>
Ler-Flag-Rv	TTATTATTTTCATCTCCAGTTCAGTTATCGTTATCATTAAATTATTTTCATGCATATGA ATATCCTCCTTAG ^c	3× FLAG tagging of <i>ler</i>
CfbA-Flag-Fw	GGTGACGTACAGAGCTCTGTGACTTACTCGATCGACTACGAGGACTACAAAAGACCA TGACGG ^c	3× FLAG tagging of <i>gcfA</i>
CfbA-Flag-Rv	AACAGGAAACCGAAGTTCCTGTACTCAATACAAGCGGTTACATATGAATATCC TCCTTAG ^c	3× FLAG tagging of <i>gcfA</i>

(Continued on following page)

TABLE 2 (Continued)

Name	Sequence (5'→3')	Use
K2-Rv	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	Km cassette primer for screening of deletion mutants and FLAG-tagged strains
HNS1-Fw	GGCTATTGCACATCTGAATTTAACG	Screening of $\Delta hns1$ mutation and <i>hns1</i> -FLAG tagging
HNS2-FW	GGGATGTTTTGACTGTACAAC	Screening of $\Delta hns2$ mutation and <i>hns2</i> -FLAG tagging
StpA-Fw	GATAGCCTGTCGGATGGAGTCTG	Screening of $\Delta stpA$ mutation and <i>stpA</i> -FLAG tagging
HNS3-Fw	GAGATTAACCGTTACAAGCTGC	Screening of $\Delta hns3$ mutation and <i>hns3</i> -FLAG tagging
Ler-Fw	GGGTTTTGTATGATGAAGTAG	Screening of Δler mutation and <i>ler</i> -FLAG tagging
3681-HIII-Fw	TATTTTGCAGTTTGTGCATAACGA	Screening of $\Delta gcfA$ mutation and <i>gcfA</i> -FLAG tagging
-35mut-Fw	ATGAATTTGGATTTTATTCTAG <u>GGAG</u> TAAAAATTCACATTC ^d	Site-directed mutagenesis of <i>gcf-P1</i> -10 sequence
-35mut-Rv	GAATGTGAATTTTTAACTCC <u>CTAG</u> AATAAAATCCAAATTCAT ^d	Site-directed mutagenesis of <i>gcf-P1</i> -10 sequence
-10mut-Fw	GTTAAAAATTCACATTCATGAACAGTATTTGCCAGGGGGAAGCC ^d	Site-directed mutagenesis of <i>gcf-P1</i> -35 sequence
-10mut-Rv	GGCTTCCCCTGGCAAATACTGTT <u>CAT</u> GAATGTGAATTTTTAAC ^d	Site-directed mutagenesis of <i>gcf-P1</i> -35 sequence
pKK-Seq-I	CAACGGTGGTATATCCAGTG	Primer extension

^a Underlining indicates introduced restriction site.

^b Underlining indicates homologous region to template plasmid pKD4.

^c Underlining indicates homologous region to template plasmid pSUB11.

^d Underlining indicates bases mutated for G or C residues.

Mouse colonization experiments. To prepare the bacterial inocula, overnight cultures of the WT *C. rodentium* and its $\Delta gcfA$ and Δler mutant strains (Table 1) were diluted 1:100 in Erlenmeyer flasks containing 50 ml of LB and then grown at 37°C with shaking to stationary phase ($OD_{600} = 1.2$). Then, 500 μ l of each bacterial culture was pelleted by centrifugation, washed with PBS, and resuspended in 2 ml of the same buffer. These bacterial suspensions were used as inocula for mouse infections. Briefly, 4- to 5-week-old, male, specific-pathogen-free C57BL/6 mice (Harlan Laboratories, Mexico) were housed in cages in groups of five animals, with free access to food and water. Cages were kept in ventilator cabinets, and mice were handled in a biohazard cabinet. Groups of five unanaesthetized mice were orally gavaged, by means of a gavage needle, with 200 μ l ($\sim 5 \times 10^7$ CFU, as it was determined by retrospective plating) of the corresponding bacterial inocula. As negative controls, two other groups of mice were inoculated with a $\Delta ler::Km$ mutant strain (Table 1) or with sterile PBS. At specified time points after inoculation, three to five fecal pellets were collected aseptically from each mouse, weighed, and emulsified in PBS. The number of CFU per gram of feces was determined by plating serial dilutions of the fecal samples onto MacConkey agar, where *C. rodentium* colonies can be easily distinguished. Bacterial counts corresponding to resident Gram-negative bacteria were very low or undetectable in feces from mice inoculated with sterile PBS at any of the time points and dilutions tested (data not shown). During the course of the experiments, all efforts were made to keep pain and suffering to a minimum, and when assays were concluded, mice were euthanized by CO₂ inhalation and subsequent cervical dislocation. All experiments were performed in accordance with institutional guidelines and were approved by the Instituto de Biotecnología bioethics committee.

Statistical tests. Data analysis was carried out with GraphPad Prism 5 software. *P* values of <0.05 were taken to indicate statistical significance using Student's two-tailed *t* test.

RESULTS

Gcf is required for the efficient colonization of the mouse gastrointestinal tract. By screening a *C. rodentium* mutant library

using PCR-based signature-tagged mutagenesis (STM), in search of mutants showing defects in colonization and transmission in the mouse infection model, we identified a colonization-defective mutant whose transposon insertion mapped in *ROD_03661*, which encodes a putative fimbrial chaperone (M. A. Croxen, unpublished data). *ROD_03661* is part of a genetic cluster (*ROD_03691* to *ROD_03631*), herein named *gcfFGABCDE* for gut colonization fimbriae of *C. rodentium* (Fig. 1), that shares the standard genetic organization of fimbrial operons belonging to the chaperone/usher assembly class (22). The *gcfA* gene encoding the GcfA major fimbrial subunit is followed by *gcfB*, *gcfC*, and *gcfD*, which encode the chaperone, the usher, and a putative fimbrial adhesin, respectively (Fig. 1). Two additional open reading frames (ORFs) of unknown function, termed *gcfF* and *gcfG*, are located upstream of *gcfA*, while another (*gcfE*) is located downstream of *gcfD* (Fig. 1).

Gcf is classified as a putative γ_4 -fimbria according to the fimbrial usher protein (FUP) family classification scheme (10, 22). Orthologs of the core fimbrial genes *gcfABCD* were not found in other A/E pathogens (10) but are present mainly in other gamma- and betaproteobacteria belonging to the *Enterobacteriaceae* (e.g., *Serratia plymuthica*, *Pantoea vagans*, and *Yersinia enterocolitica*) and *Burkholderiaceae* (e.g., *Burkholderia* spp.) families, respectively (Table 3). The closest orthologs of the accessory *gcfF* and *gcfG* genes, having the same genetic organization and synteny with some of the closest orthologs of the *gcf* fimbrial gene cluster (*gcfABCD*), were found in the genomes of *S. plymuthica* strain PRI-2C, a rhizosphere enterobacterial strain isolated from maize (23), *P. vagans* strain C9-1 (plasmid pPag1), a Gram-negative enterobacterial plant epiphyte that is used in the biocontrol of *Erwinia amylovora* infections in pear and apple trees (24), and the

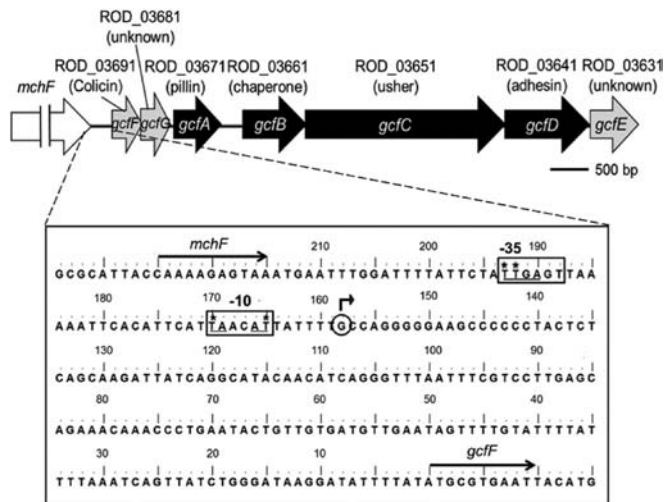


FIG 1 The *gcf* fimbrial operon. Schematic representation of the *gcf* cluster. Arrows indicate coding sequences, and lines represent intergenic regions. Accession numbers, as well as putative functions of each gene, are indicated. The box below the operon representation contains the nucleotide sequence of the *gcf* regulatory region, showing the σ^{70} -dependent promoter predicted *in silico* by BPROM software. The -35 and -10 hexamer sequences are boxed, and the consensus-conserved bases are underlined. The broken arrow indicates the TSS identified by primer extension, while asterisks indicate bases mutated for G residues. The scale is indicated with respect to the translation initiation codon of *gcfF*.

betaproteobacterial *Burkholderia cepacia* strain GG4 (chromosome 1), which was isolated from the rhizosphere of ginger (25). The predicted product of *gcfF* is a 104-amino-acid (aa) glycine-rich protein resembling colicin V precursors, while that of *gcfG* is an 87-aa putative membrane protein sharing only between 34% and 36% identity and 51% and 54% similarity with its orthologs in *P. vagans* C9-1 and *B. cepacia* GG4 (Table 3). Of note, GcfE orthologs are not clustered with *gcf* operon orthologs in other bacterial species.

In order to further support the phenotype previously observed with the signature tag mutant, we decided to evaluate the role in colonization of the *gcf* operon through single-infection assays. For this purpose, we constructed a nonpolar deletion mutant of the gene encoding the GcfA major fimbrial subunit (Table 1, strain JPCR6), and its ability to colonize was evaluated by infecting C57BL/6 mice. On day 3 after infection, there was not a significant difference in bacterial counts between both groups of mice; however, on day 7 postinoculation (p.i.), mice infected with the WT strain showed bacterial levels ~ 3 logs higher than those in mice inoculated with the *gcfA* mutant ($P < 0.001$), a difference that was maintained until day 10 p.i. ($P < 0.001$), when the WT strain reached its maximum counts in feces (Fig. 2). As a negative control in these assays, we inoculated another group of mice with a $\Delta ler::Km$ mutant, lacking the master regulator Ler (LEE-encoded regulator) of the LEE pathogenicity island, which has previously been shown to be essential for colonization and disease (26). As expected, this strain was unable to colonize; therefore, its bacterial counts in feces remained at low levels, similar to those observed with the *gcfA* mutant during the course of the experiment (Fig. 2). The *gcfA* mutant showed no *in vitro* growth defects or alteration of its type III protein secretion profile in comparison to its parental WT strain (data not shown). Consistent with these observations,

in an independent study, it was found that a *C. rodentium* isogenic *ROD_03671* (*gcfA*) mutant exhibited defective colonizing abilities in mixed-infection experiments with the WT strain, although not when mice were infected separately with the mutant (27). Taken together, these results support the previously observed phenotypes and confirm that Gcf is required for establishing a successful infection in mice.

The *gcf* fimbrial operon is expressed at low levels in WT *C. rodentium*. Given that the specific environmental signals that induce expression of Gcf have not been identified yet, we evaluated the effects of different growth conditions on *gcf* expression using *gcf-cat* transcriptional fusions. The pK-*gcf1* plasmid, containing the full-length intergenic region upstream of *gcfF* (Table 1 and Fig. 1), was transformed into WT *C. rodentium*, and CAT activity was measured as described in Materials and Methods. For initial experiments, bacteria were grown overnight at 37°C with shaking in LB, DMEM, and MM-N, since these growth media have been previously reported to enable the expression of other fimbriae in

TABLE 3 Gcf protein closest orthologs

Protein/function ^a /no. of aa	Closest ortholog ^b	% identity/similarity
GcfA/major subunit/178	<i>Serratia plymuthica</i>	58/71
	<i>Burkholderia ubonensis</i>	50/67
	<i>Psychrobacter</i> sp.	48/64
	<i>Serratia fonticola</i>	49/58
	<i>B. cepacia</i>	41/65
<i>Pantoea vagans</i>	36/60 ^c	
GcfB/chaperone/239	<i>S. fonticola</i>	47/67
	<i>Burkholderia</i> sp.	43/67
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	42/66
	<i>Psychrobacter</i> sp.	49/58
	<i>B. cepacia</i>	41/62
<i>P. vagans</i>	42/63 ^c	
GcfC/usher/862	<i>S. plymuthica</i>	53/71
	<i>B. ubonensis</i>	45/63
	<i>P. vagans</i>	45/63
	<i>Burkholderia xenovorans</i>	44/61
	<i>B. cepacia</i>	44/61
<i>Yersinia mollaretii</i>	42/62	
GcfD/fimbrial adhesin/348	<i>S. plymuthica</i>	34/58
	<i>P. vagans</i>	24/44
	<i>Burkholderia</i> spp.	24/44
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	21/37
	<i>Enterobacter cloacae</i>	20/37
GcfE/unknown/141	<i>E. cloacae</i>	32/53
	<i>S. plymuthica</i>	28/49
	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	26/47
	<i>Pantoea</i> sp.	27/46
GcfF/colicin V-like/104	<i>S. plymuthica</i>	55/74
	<i>B. cepacia</i>	54/66
	<i>Pantoea</i> spp.	49/65
GcfG/unknown/87	<i>P. vagans</i>	36/51
	<i>B. cepacia</i>	34/54

^a Putative or predicted function.

^b Synteny is conserved only with *Pantoea vagans* C9-1 and *Burkholderia cepacia* GG4.

^c Several other species possess an ortholog in the same identity/similarity range.

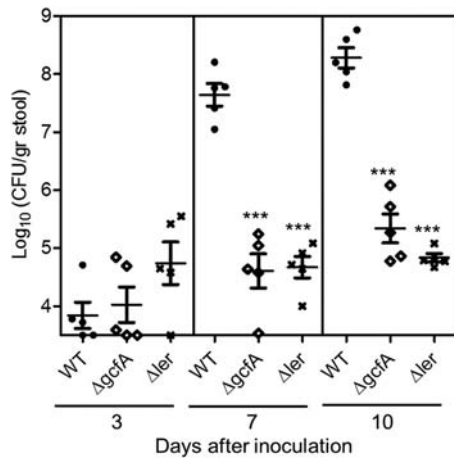


FIG 2 Gcf is required by *C. rodentium* for colonization in mice. Male, specific-pathogen-free C57BL/6 mice (4 to 5 weeks old) were orally gavaged with $\sim 5 \times 10^7$ CFU of WT, $\Delta gcfA::Km$ ($\Delta gcfA$) mutant, or $\Delta ler::Km$ (Δler) mutant *C. rodentium* strains. Each data point represents \log_{10} CFU per individual animal on days 3, 7, and 10 postinfection. The mean and standard error from the CFU of five individual animals are indicated. The statistically significant differences with respect to WT are indicated by *** ($P < 0.001$; Student's two-tailed t test). This is a representative result from three independent assays.

Salmonella enterica serovar Typhimurium (28), EPEC (14), EHEC (15, 29), and *C. rodentium* (13, 27). Contrary to the expected results, no detectable levels of CAT activity were obtained when bacteria were grown in LB or DMEM, while very low activity (281 ± 25 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein) was obtained with samples from MM-N cultures. In order to test if other growth conditions could induce higher expression of this fusion in the WT background, we then evaluated different combinations of experimental variables, such as growth phase (log, mid, and stationary), temperature (30 and 37°C), pH (5.0, 6.0, and 7.0), static growth, anaerobiosis, 5% CO₂, and the carbon source (glucose and glycerol). However, no increase in CAT activity was detected with respect to the standard growth condition (overnight, 37°C, and shaking), regardless of the different variables tested (data not shown). Together, these data suggest that Gcf is not or very weakly expressed in WT *C. rodentium* under the *in vitro* growth conditions tested.

The *gcf* operon is repressed by H-NS and differentially regulated by the growth medium. Given the important role of Gcf *in vivo* during infection and the *in vitro* results described above, we hypothesized that the expression of the *gcf* operon, although seemingly active *in vivo*, is tightly repressed in WT *C. rodentium* under standard *in vitro* growth conditions. Based on previous reports showing that the global regulator H-NS is involved in fimbrial repression in A/E (13–15) and other pathogenic and non-pathogenic bacteria (30, 31), we evaluated if it negatively regulates the *gcf* fimbrial gene cluster. For this purpose, we first determined the CAT activity of the *gcf1-cat* fusion (Table 1) in *E. coli* strain MC4100 and its Δhns mutant derivative. As observed in WT *C. rodentium*, the fusion was not active in the WT *E. coli* strain when cultures were grown in LB or DMEM, while it was poorly expressed (< 50 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein) when MM-N was used for bacterial growth (Fig. 3A). However, the same fusion was de-repressed in the *hns* mutant, reaching CAT activity levels of over 300, 400, and 700 units for samples collected from cultures grown

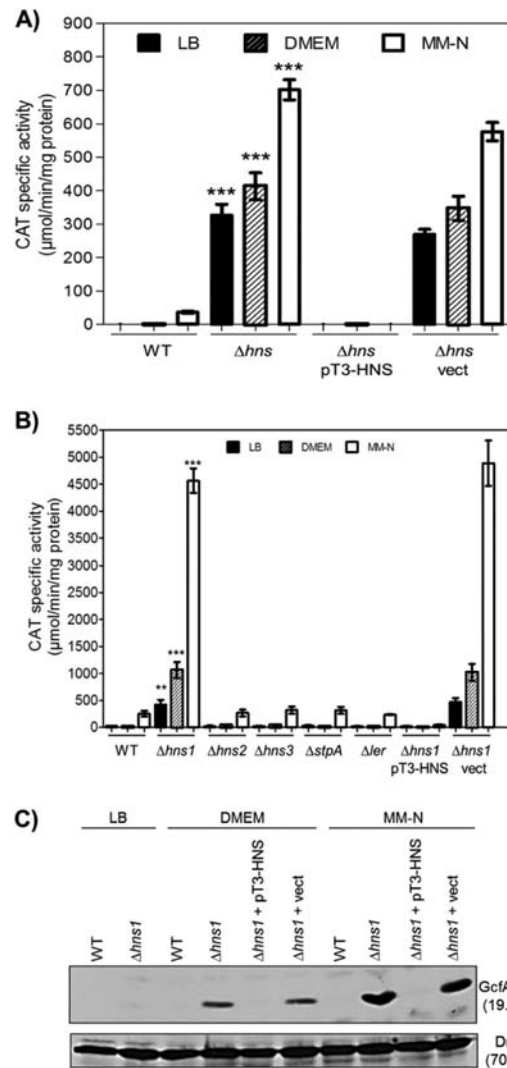


FIG 3 The *gcf* fimbrial operon is specifically repressed by H-NS1 and is differentially regulated by the growth medium. Expression of the *gcf1-cat* transcriptional fusion (Table 1) was analyzed in *E. coli* (A) or *C. rodentium* (B) WT and *hns*-like mutant strains. Bacteria were grown overnight at 37°C with shaking in LB, DMEM, or MM-N, and the specific CAT activity ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ of protein) was determined from 12-h culture samples. WT, wild-type strains; Δhns , *E. coli* MC4100 $\Delta hns::Km$ mutant; $\Delta hns1$, $\Delta hns2$, $\Delta stpA$, $\Delta hns3$, and Δler , *C. rodentium* mutant derivatives; pT3-HNS and vect, strains complemented with plasmid pT3-HNS expressing H-NS and the empty vector pMPM-T3 (Table 1), respectively. Means and standard deviations from three independent assays performed in duplicate are shown. Statistically significant differences with respect to WT are indicated by ** ($P < 0.005$) or *** ($P < 0.001$) (Student's two-tailed t test). (C) Detection of the GcfA major fimbrial subunit. The *gcfA* gene was fused with the sequence encoding the 3 \times FLAG epitope both in the WT strain and its $\Delta hns1$ mutant. GcfA-FLAG was detected by Western blotting by using an anti-FLAG monoclonal antibody. DnaK was detected as a loading control with an anti-DnaK monoclonal antibody.

in LB, DMEM, and MM-N, respectively (Fig. 3A). These results indicated that the *gcf* gene cluster contains an active promoter upstream of the *gcfF* gene, which is negatively regulated by H-NS in the *E. coli* heterologous background.

To confirm that the *gcf* fimbrial operon is repressed by H-NS in *C. rodentium*, a BLAST search was initially performed to identify the *hns* ortholog in its genome. We identified five genes encoding

TABLE 4 H-NS-like proteins identified in *C. rodentium*

Name (locus tag/accession no.)	No. of aa/size (kDa)	% identity to <i>E. coli</i> K-12 H-NS ^a	Closest ortholog	
			Name (accession no.)	Organism (% identity)
H-NS1 (ROD_17711/CBG88528.1)	137/15.2	96	H-NS (AGE94391)	<i>Citrobacter amalonaticus</i> Y19 (99)
H-NS2 (ROD_20571/CBG88809.1)	134/14.8	64	Putative DNA-binding protein (WP_023201854)	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Sloterdijk (98)
StpA (ROD_31391/CBG89866.1)	133/14.7	59	StpA (NP_417155)	<i>Escherichia coli</i> K-12 (84)
H-NS3 (ROD_p2271/CBG91848.1)	154/17	47	H-NS (WP_001483165)	<i>Escherichia coli</i> P0299917 (99)
Ler (ROD_30151/CBG89746.1)	129/14.6	36	Ler (BAG66763)	<i>Escherichia coli</i> O111:H- (88)

^a Proteins are listed based on the corresponding identity to *E. coli* K-12 H-NS (NP_415753) used for the BLAST search.

proteins that are homologs of the *E. coli* H-NS (Table 4). One of these proteins was termed H-NS1 (ROD_17711), since it shares the highest identity level (96%) with H-NS from *E. coli* K-12, while the *ROD_31391* and *ROD_30151* genes encode the *C. rodentium* orthologs of the well-characterized StpA and Ler proteins (Table 4). In addition, two novel H-NS-like proteins, herein named H-NS2 (ROD_20571) and H-NS3 (ROD_p2271), were identified as having their closest orthologs in other putative H-NS-like proteins from *S. enterica* and *E. coli* P0299917, respectively (Table 4). In order to evaluate if all these five H-NS-like proteins are expressed, their corresponding genes were separately tagged in WT *C. rodentium* with the sequence encoding a 3× FLAG epitope, generating strains JPCR7 to JPCR11 (Table 1). All H-NS-like proteins were detected from whole-cell lysates of these strains grown in LB, DMEM, and MM-N by Western blotting using an anti-FLAG monoclonal antibody (Fig. 4). This result indicated that all these proteins are expressed in *C. rodentium*, which in turn suggested that they could be functional and potentially involved in the regulation of the *gcf* operon. Single deletion mutants of the five genes encoding the *C. rodentium* H-NS homologs were generated (strains JPCR1 to JPCR5) (Table 1) and transformed with plasmid pK-gcf1 carrying the *gcf1-cat* transcriptional fusion. CAT activity levels obtained in the mutants with deletions of the genes encoding H-NS2, H-NS3, StpA, and Ler were similar to those observed with the WT strain (Fig. 3B), despite the fact that all H-NS-like proteins are expressed under the tested conditions. In contrast, we detected a significant increase in CAT levels in the *C. rodentium*

Δ *hns1* mutant lacking the closest *E. coli* H-NS ortholog, compared with those in the WT strain, in the three media tested (Fig. 3B), indicating that H-NS1 acts as a negative regulator. CAT levels were even higher in the *C. rodentium* Δ *hns1* mutant lacking the closest *E. coli* H-NS ortholog than those observed in the *E. coli* MC4100 Δ *hns* mutant (Fig. 3A and B). The repression phenotype in this mutant was restored when complemented with plasmid pT3-*hns* but not with the empty vector (Fig. 3B). However, even in the absence of the repressor, different CAT levels were observed depending on the growth medium used, with the highest values in MM-N (~4,500 CAT units), followed by DMEM (~1,100 units) and LB (~500 units) (Fig. 3B). In agreement with these data, we detected a higher production of the GcfA-FLAG fusion protein in bacterial cell extracts from strain JPCR14 (Δ *hns1*; *gcfA*::3×FLAG-Km) grown in MM-N than in DMEM, while the tagged protein was barely detected when the mutant strain was grown in LB or when it was *trans*-complemented with the plasmid expressing H-NS (Fig. 3C). We were unable to detect the production of GcfA-FLAG using bacterial cell extracts from the WT-tagged strain grown in LB, DMEM, or MM-N, confirming our previous observations that Gcf is highly repressed in WT *C. rodentium* under these *in vitro* growth conditions. Collectively, these data indicate that the *gcf* promoter is specifically and tightly repressed by H-NS1 in *C. rodentium* and that growth media differentially regulate its expression, suggesting that it is also controlled by an underlying positive regulatory mechanism.

The *gcf* cluster is transcribed as an operon from a promoter located upstream of *gcfF*. Previous data indicated the presence of a functional promoter located in the region upstream of *gcfF*; thus, we evaluated if all *gcf* genes were transcribed as an operon from this promoter. We carried out qualitative RT-PCR assays to amplify different regions of this genetic cluster (Fig. 5A) by using total RNA extracted from the WT (Fig. 5B) or the Δ *hns1*::Km mutant (Fig. 5C) strains grown in MM-N, as well as pairs of specific primers (Table 1). In both genetic backgrounds, we were able to detect amplification products corresponding to the following *gcf* regions, *gcfFGA*, *gcfAB*, *gcfBC*, and *gcfCDE* (Fig. 5B and C), further supporting the notion that all *gcf* genes are transcribed into a single polycistronic mRNA from a promoter located upstream of *gcfF*. This assay was sensitive enough to detect the low levels of *gcf* expression seen in WT *C. rodentium* grown in MM-N (Fig. 3B) and further supported the observation that mutation of *hns1* enhances the transcriptional activity of the operon.

Identification of the *gcf* promoter. In order to identify the promoter(s) driving *gcf* expression, we initially performed an *in silico* prediction of putative promoters upstream of *gcfF* by using bacterial promoter recognition software (Softberry BPROM).

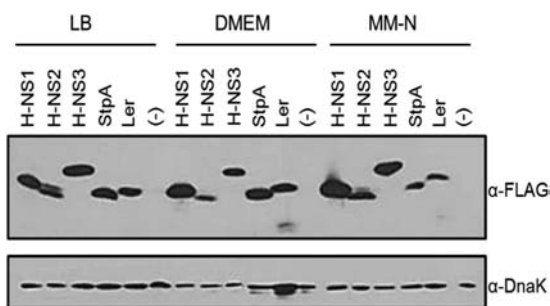


FIG 4 *C. rodentium* expresses five different H-NS-like proteins. Genes encoding the H-NS-like proteins described in Table 4 were fused to a sequence encoding the 3× FLAG epitope. The expression of the resulting tagged proteins was analyzed by Western blotting using an anti-FLAG monoclonal antibody and whole-cell extracts of bacterial cultures of the WT and JPCR7 to JPCR11 strains (Table 1) grown for 4 h at 37°C with shaking in LB, DMEM, or MM-N. DnaK was detected as a loading control. Negative controls [(-)] correspond to whole-cell extracts from *C. rodentium* but without containing sequences encoding FLAG tags in the chromosome. A representative result from three independent assays is shown.

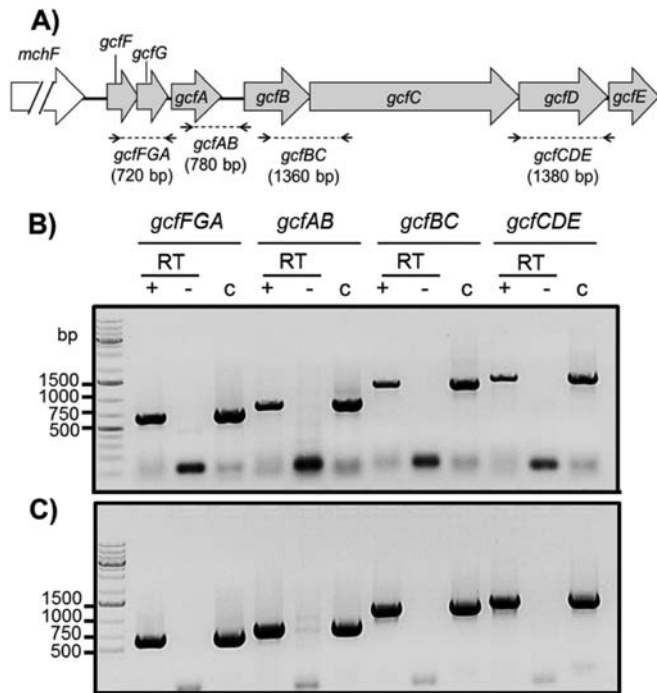


FIG 5 The *gcfFGABCDE* genes are transcribed as an operon. (A) Schematic representation of the *gcf* operon showing the *gcfFGA*, *gcfAB*, *gcfBC*, and *gcfCDE* regions (dashed lines) amplified for RT-PCR analysis using specific primers (thin arrows; see Table 2). (B and C) Qualitative RT-PCR assays carried out with RNA extracted from WT (B) or $\Delta hns1::Km$ mutant (C) *C. rodentium*; both strains were previously grown in MM-N for 4 h at 37°C with shaking. RT, RT-PCRs with (+) or without (-) reverse transcriptase; C, control PCR amplification using genomic DNA from WT *C. rodentium*. This is a representative result from two independent experiments.

Only one putative σ^{70} -dependent promoter was found, herein termed *gcf-P1*, which is located 165 bp upstream of the *gcfF* start codon and contains -10 (TAACAT) and -35 (TTGAGT) putative sequence motifs that are separated by 17 nucleotides and show four (underlined) out of the six conserved bases present in the -10 and -35 consensus elements of σ^{70} promoters in *E. coli* (Fig. 1).

Primer extension experiments were then carried out to determine the transcription start site (TSS) of the *gcf* promoter. To enhance the signal, total RNA was isolated from culture samples of the $\Delta hns1::Km$ mutant, containing or not plasmid pK-*gcf2* (*gcf2-cat* fusion) (see below) and grown at 37°C in LB, DMEM, or MM-N, which was then hybridized with a vector-specific ³²P-labeled primer (pKK-Seq-1) corresponding to the 5' end of the *cat* reporter gene (Table 2). Various common extension products were obtained with the different RNA samples (Fig. 6). The largest band mapped to a G residue located 7 bp downstream of the predicted *gcf-P1* promoter -10 sequence (Fig. 1). In addition, the same signal was detected at different intensities depending on the culture medium used for bacterial growth; the most intense signal was obtained from MM-N samples, followed by those from DMEM and LB (Fig. 6), which correlated with the *gcf* differential expression levels previously observed through transcriptional fusions and Western blotting (Fig. 3B and C).

To confirm the location of this promoter and to identify additional regulatory motifs, two new transcriptional fusions were

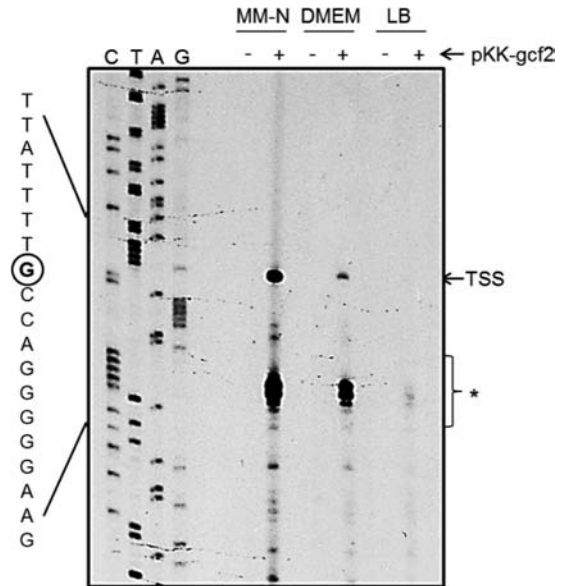


FIG 6 Determination of the transcription start site (TSS) of the *gcf-P1* promoter. Total RNA samples isolated from the $\Delta hns1::Km$ mutant with (+) or without (-) pK-*gcf2* plasmid (Table 1) were hybridized with a specific ³²P-labeled primer (Table 2). The G residue corresponding to the transcription start site is marked with a circle. C, T, A, and G, sequence ladders; *, putative processed products.

generated: *gcf2-cat* encompassing the 5' end of the *gcf* upstream intergenic region, including the *gcf1* promoter (positions -93 to +27 with respect to the transcriptional start site), and *gcf3-cat*, containing the rest of the intergenic region (+10 to +185) but without the putative promoter (Fig. 7A). The effects of these deletions on *gcf* expression were analyzed by comparing the CAT activities of *gcf2-cat* and *gcf3-cat* with respect to those of the full-length fusion (*gcf1-cat*), both in the WT strain and the $\Delta hns1::Km$ mutant. Interestingly, *gcf* promoter activity further increased in both genetic backgrounds when nucleotides from positions +10 to +185 were not present (*gcf2-cat* fusion) (Fig. 7B and C), thus confirming that a functional promoter is contained between positions -93 to +27 and suggesting that negative regulatory elements are present downstream of position +27.

Although *gcf2-cat* rendered higher levels of expression than *gcf1-cat* in the three growth media (LB, DMEM, and MM-N), differences between each medium were still observed, confirming again that the *gcf* promoter is differentially regulated in response to the growth conditions (Fig. 7B and C). To further validate the functionality of the *gcf-P1* promoter, the first two positions of the putative -35 sequence were mutated by replacing them with G residues (TTGAGT to GGGAGT) in the *gcf2-cat* fusion. The derived *gcf2-mut-cat* fusion was completely inactive both in the WT and the $\Delta hns1::Km$ mutant (Fig. 7B and C). Likewise, the activity from the *gcf-P1* promoter was also abolished when the -10 sequence was modified by replacing the first and sixth bases (TAACAT to GAACAG) in fusions *gcf1-cat* and *gcf2-cat* (data not shown).

Furthermore, unlike *gcf1-cat*, the *gcf3-cat* fusion was almost completely inactive in the WT strain (Fig. 7B) but showed a low level of expression in the $\Delta hns1::Km$ mutant grown in MM-N (Fig. 7C), suggesting the presence of a weaker second promoter

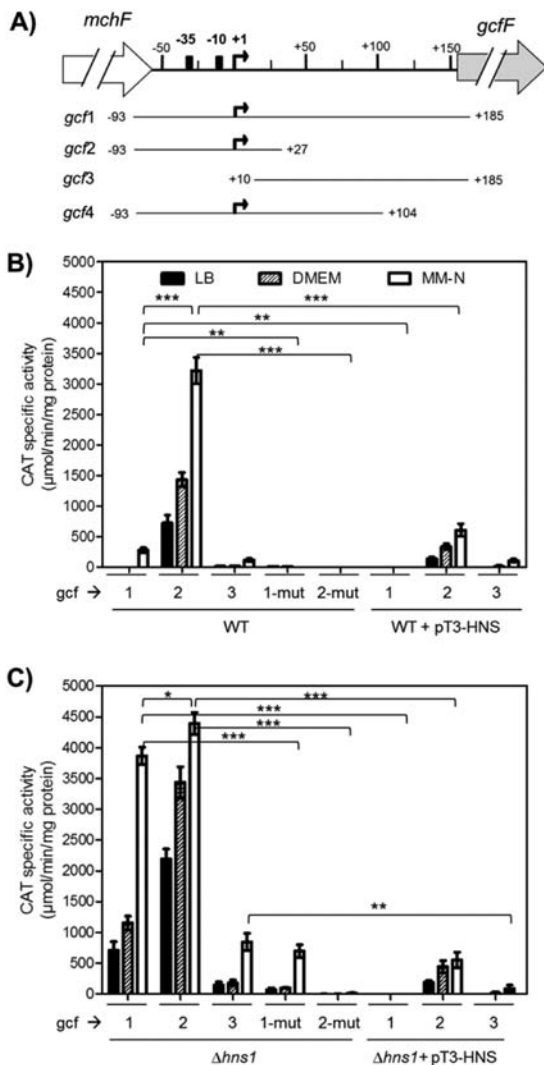


FIG 7 Deletion analysis of the *gcf* promoter region. (A) Schematic representation of the *gcf* regulatory region. The intergenic region located between *mchF* and *gcfF* is shown. The broken arrow and the black boxes represent the transcription start site and the consensus promoter boxes, respectively, of the *gcf-P1* promoter. Lines below the arrows represent the DNA fragments (*gcf1* to *gcf4*) used for construction of *gcf-cat* transcriptional fusions. The scale is indicated with respect to the transcription start site of *gcf*. (B and C) CAT activity assays. The *gcf1-cat* (1), *gcf2-cat* (2), and *gcf3-cat* (3) transcriptional fusions were assayed in WT (B) or $\Delta hns1::Km$ mutant (C) *C. rodentium*, as described for Fig. 3. 1-mut and 2-mut, *gcf1-cat* and *gcf2-cat* fusions, respectively, mutated in the -35 element of the *gcf-P1* promoter; pT-HNS, strains complemented with pT3-HNS plasmid (Table 1). Only statistical significances between samples from MM-N are shown. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.001$ (Student's two-tailed *t* test). Means and standard deviations from three independent assays performed in duplicate are shown.

(*gcf-P2*) downstream of the $+10$ position that is also negatively regulated by H-NS1. This possibility was also supported by the fact that a *gcf1-mut-cat* derivative carrying the modified -35 sequence showed levels of activity in the $\Delta hns1$ mutant similar to those observed for the *gcf3-cat* fusion lacking the *gcf-P1* promoter (Fig. 7C). The low expression levels from the putative *gcf-P2* promoter did not allow us to determine the corresponding TSS by primer extension after several attempts, even using RNA samples purified from the $\Delta hns1::Km$ mutant containing plasmids pK-

gcf1 or pK-*gcf3* (data not shown). However, these data indicate that *gcf-P1* is the main promoter driving expression of the *gcf* operon.

When H-NS was expressed in *trans* in the strains containing the different fusions, the full-length fusion (*gcf1-cat*) was completely inactive in both genetic backgrounds and *gcf3-cat* was barely active, while *gcf2-cat* was not fully repressed, and, although low, it still showed some transcriptional activity in both strains and in all culture media tested (Fig. 7B and C). These results suggested that the complete regulatory region upstream of *gcfF* is required for efficient H-NS-mediated negative regulation. However, there is the possibility that an additional repressor, acting downstream of position $+27$, also plays a role in the negative regulation of the *gcf-P1* promoter, as suggested by the higher activity observed for the *gcf2-cat* fusion than for *gcf1-cat*, even in the absence of H-NS (Fig. 7B and C).

H-NS binds to the *gcf* regulatory region. The data described above indicated the presence of negative regulatory elements upstream of *gcfF*, which were required for the efficient repression of the *gcf* operon mediated, mostly, by H-NS. To determine if H-NS binds directly to this regulatory region, we performed EMSAs with the same DNA regions used to generate the *cat* transcriptional fusions *gcf1* (-93 to $+185$), *gcf2* (-93 to $+27$), and *gcf3* ($+10$ to $+185$), and to expand the region located downstream of the TSS, the fragment contained in the *gcf4-cat* fusion (-93 to $+104$) (Table 1 and Fig. 7A), a construction that rendered levels of activity similar to those of *gcf2-cat* (data not shown), was also included. DNA fragments were incubated with increasing amounts of purified H-NS-Myc-His₆, and the mixtures were analyzed on native polyacrylamide gels. As shown in Fig. 8A, when all four *gcf1*, *gcf2*, *gcf3*, and *gcf4* fragments were assayed together in competitive EMSAs, only fragment *gcf1*, corresponding to the full-length intergenic region upstream of *gcfF*, was shifted starting at a protein concentration of $0.4 \mu\text{M}$, while $0.8 \mu\text{M}$ H-NS was sufficient to shift most of this fragment. In contrast, fragments *gcf2*, *gcf3*, and *gcf4*, spanning different portions of *gcf1*, were not significantly shifted, even at the highest protein concentration tested ($0.8 \mu\text{M}$), independently of the presence of the largest fragment, *gcf1* (Fig. 8A and B). To confirm that H-NS binds to the full-length *gcf* regulatory region, we tested the *gcf1* fragment again, but now competing with an unrelated fragment corresponding to the *C. rodentium* structural *ecpR* gene (14), which was used as a negative control. As previously observed, the *gcf1* fragment was able to form protein-DNA complexes at the same H-NS concentrations (0.4 to $0.8 \mu\text{M}$), while the negative control (*ecpR*) was not shifted even at the highest concentration of H-NS used (Fig. 8C). These results indicate that H-NS requires the complete intergenic region upstream of *gcfF* for efficient binding and repression.

DISCUSSION

Multiple fimbriae of the chaperone/usher assembly pathway are encoded in the genomes of a wide variety of pathogenic and non-pathogenic Gram-negative bacteria (32). In recent years, extensive knowledge about fimbrial structure and assembly has been generated, including classification schemes and phylogenetic analyses that have increased our understanding of their diversity and evolution (22, 32, 33). Despite our current knowledge, the biological relevance of having a wide repertoire of chaperone/usher operons (e.g., whether they play a differential, synergistic, or redundant role during the colonization process of host or reservoir niches)

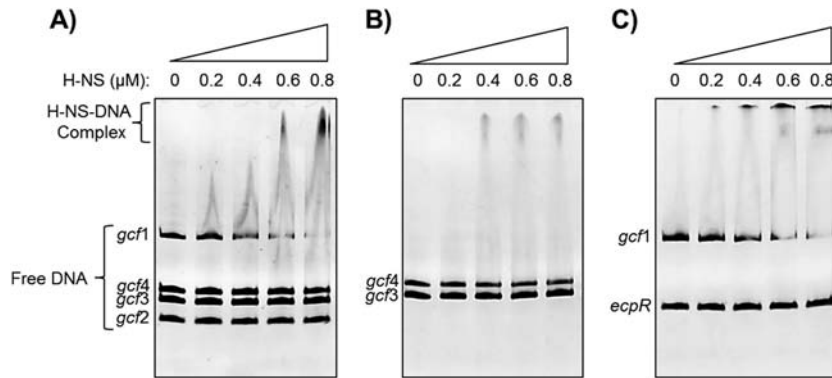


FIG 8 H-NS binds to the regulatory region of *gcf*. (A) EMSAs with H-NS and the different fragments of the *gcf* regulatory region shown in Fig. 7A. One hundred nanograms of the PCR products indicated in each panel were mixed, incubated with increasing concentrations (μM) of purified H-NS-Myc-His₆, and subsequently separated on 6% polyacrylamide gels. Free DNA and DNA-protein complexes stained with ethidium bromide are indicated. *ecpR*, negative control containing a structural region of the *ecpR* gene.

remains to be fully appreciated. Systematic studies have addressed this for bacteria such as *E. coli* and *S. enterica*, showing that while some fimbriae do not seem to have a role or to even be expressed under standard *in vitro* growth conditions, others are required at different levels to establish bacterial interactions with different biotic or abiotic surfaces and receptors, leading to cell adherence, colonization of different host tissues or environmental reservoirs, interactions between bacterial cells, biofilm formation, and pathogenesis (31, 34–36). Moreover, there is still much to learn about their specific expression patterns and the regulatory mechanisms coordinating their expression in response to the environment and the host (30).

The *C. rodentium*-mouse model of infection has become an essential surrogate model for the study of bacterial infections caused by A/E pathogens (5) and also offers a suitable model to address the relevance of the fimbrial repertoire during disease. Its genome contains 19 putative fimbrial operons (10), of which *kfc*, *ffc*, and *gcf* seem to have a discernible and apparently differential role during colonization of the mouse intestine (7, 8, 27) (this work), while *lpf* does not (11).

In this study, we report the identification and initial characterization of the *gcf* fimbrial operon, which is required by *C. rodentium* for efficient early colonization of the mouse gastrointestinal tract. This observation highlights the possibility that Gcf plays a specific spatiotemporal role during colonization despite the presence of other fimbriae. Cheng et al. (27) recently reported that a *ROD_3671* (*gcfA*) mutant was outcompeted in mixed-strain infections by WT *C. rodentium*, although no significant colonization differences were observed in single-infection experiments in C57BL/6 mice inoculated with $\sim 5 \times 10^9$ CFU. Although the difference between the two studies could be related to the experimental conditions or variations in mice susceptibility (37), it could also potentially be due to the inoculum size, as we also observed that the colonization defect with our *gcfA* mutant, using an inoculum size of $\sim 5 \times 10^7$ CFU, is lessened, but still evident, by inoculating with higher bacterial numbers (e.g., 5×10^8 CFU) (data not shown), suggesting that high inocula may override potential defective phenotypes.

Despite its role during colonization, the *gcf* operon was very poorly expressed under most known *in vitro* growth conditions that are permissive for the expression of other *C. rodentium* viru-

lence factors (12), suggesting that expression of Gcf is restricted to the host environment by a mechanism that has not yet been defined. Host-restricted expression of fimbrial operons has been documented in *Salmonella* Typhimurium (38), where a sophisticated mechanism was recently described that establishes the hierarchical control of fimbrial gene expression based on the 5' untranslated region (UTR) of the *fimAICDHF* operon transcript that prevents the production of Pef through a CsrA titration mechanism (39). Furthermore, in *E. coli*, including EHEC O157:H7, most fimbrial operons are also poorly expressed under *in vitro* growth conditions (31, 40).

While the mechanism that activates *gcf* expression *in vivo* is currently being investigated, we did determine that H-NS has a major role as a negative regulator. H-NS is a small (~ 136 -amino-acid) protein that preferentially binds as a dimer to curved double-stranded DNA, although it can also induce bending of non-curved DNA upon binding. H-NS is thought to repress gene expression by oligomerizing along the DNA from its primary nucleation sites or by bridging adjacent DNA segments, thus blocking RNA polymerase access to promoter sequences or preventing the formation of an active open complex (41, 42). It has also been demonstrated that H-NS silences genes that are thought to have been acquired by horizontal transfer events, thus preventing the fitness cost for the receptor cell while newly acquired genes (including virulence factors) are integrated into and controlled by preexisting regulatory networks (reviewed in references 43 and 44). Prototypical A/E pathogens encode two additional H-NS-like proteins known as StpA and Ler. StpA is a highly conserved H-NS paralog that can partially compensate for the lack of H-NS (45). In contrast, Ler acts as an H-NS antagonist to derepress the expression of virulence genes located within and outside the LEE pathogenicity island (46). In addition, it is well known that in a given strain, more than two H-NS paralogs may coexist and participate in gene regulation, as it has been demonstrated for uropathogenic *E. coli* (47), *Salmonella* Typhimurium (48), and *Shigella flexneri* (49). The *C. rodentium* genome contains five different genes encoding H-NS homologs, including Ler and StpA, which are expressed under all the growth conditions tested in this work, suggesting that they are functional proteins. Moreover, a role for other H-NS-like proteins has been demonstrated for Sfh from *Salmonella* Typhimurium, which enables plasmid transmission by

silencing genes that represent a fitness cost for the new bacterial hosts (48), and for Hfp from uropathogenic *E. coli* that shows modulatory effects on the expression of different H-NS targets, such as fimbriae and capsular polysaccharide (47). In addition, *C. rodentium* also contains a gene (*ROD_20581*) encoding a truncated H-NS (H-NST) that could function as a dominant negative for the other H-NS homologs expressed in *C. rodentium*, as has been reported for the A/E pathogens EPEC (47) and EHEC (50), where similar H-NST proteins function as H-NS antagonists.

Testing *C. rodentium* mutants in all five *hns*-like genes revealed that the *gcf* operon is specifically repressed by H-NS1, the closest ortholog of *E. coli* K-12 H-NS, while the other H-NS homologs had no discernible role in *gcf* regulation or cell viability. In the absence of H-NS1, both the *gcf* promoter and GcfA were readily expressed but still differentially regulated by the growth media. MM-N allowed a 9-fold and 5-fold increase in the activation of the *gcf* promoter compared to that in LB and DMEM, respectively, suggesting that as-yet-unknown additional regulatory factors, which respond to specific growth conditions, are also involved in the regulation of this fimbrial operon. Cheng et al. (27) recently observed that expression of *gcfA* (*ROD_3671*) decreased ~2.5-fold in a *C. rodentium* mutant with deletion of a phosphate-specific transport operon (*pstSCAB-phoU*), compared to the WT strain. Mutations in this operon lead to the derepression of the PhoR/PhoB two-component regulatory system, although no putative PhoB binding sites were identified in the regulatory region of *gcf*, suggesting that PhoB indirectly influences its expression through the product of an unidentified regulatory gene belonging to the Pho regulon (27).

Binding of H-NS to the *gcf* regulatory region supports the notion that the repression exerted by this protein is direct and suggests that a positive regulatory protein is required for displacing H-NS from its binding sites. H-NS displacement by different regulatory proteins has been documented for the regulation of several fimbrial operons in pathogenic and nonpathogenic bacteria (30). For example, H-NS interacts directly with the promoter region of the EHEC *lpf* operon repressing its expression, which is counteracted by Ler binding to the same DNA region (15). Similarly, RegA from *C. rodentium* binds to an operator located near the *kfc* promoter, resulting in the displacement of H-NS and the transcriptional derepression of the Kfc fimbria (13), while two of the multiple H-NS binding sites in the promoter region of the *fim* operon in *E. coli* K-12 overlap SlyA binding sites, thus reflecting the binding competition between SlyA and H-NS (51). Integration host factor (IHF) also plays an essential role in counteracting the repression exerted by H-NS on the EHEC and EPEC *ecp* promoter (14). Future work will be directed at identifying putative positive regulators of the *gcf* operon.

In summary, we showed that the *gcf* fimbrial locus is an important virulence determinant of *C. rodentium* required for efficient gut colonization. This genetic cluster is expressed as an operon that is tightly repressed by H-NS1, one of the five H-NS homologs expressed by *C. rodentium*. H-NS1 acts directly by binding to the *gcfA* regulatory region repressing the expression of the main σ^{70} promoter and a minor uncharacterized secondary promoter. This and previous studies on *C. rodentium* fimbrial operons are furthering our understanding of their function and regulation and also enabling evaluation of the relevance that the chaperone-usher fimbrial repertoire has for this A/E pathogen and its role in gastrointestinal diseases caused by these bacteria.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN209713) and the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (154287) to J.L.P. and Canadian Institute for Health Research (CIHR) grants to B.B.F. G.G.C.-F. was supported by a scholarship from CONACyT (232554), and M.A.C. was supported by a Canadian Association of Gastroenterology/CIHR/Ferring Pharmaceuticals postdoctoral fellowship. J.L.P. thanks DGAPA-UNAM for sabbatical fellowship support.

We are grateful to W. Deng for critically reviewing the manuscript. We thank V. H. Bustamante for advice and assistance, A. Medrano-López and Ramón Cervantes for helpful discussions, and A. Vázquez, L. Pérezgasga, and F. J. Santana for technical assistance.

REFERENCES

- Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 26:822–880. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00022-13>.
- Wong AR, Pearson JS, Bright MD, Munera D, Robinson KS, Lee SF, Frankel G, Hartland EL. 2011. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Mol Microbiol* 80:1420–1438. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07661.x>.
- Frankel G, Phillips AD. 2008. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cell Microbiol* 10:549–556. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01103.x>.
- Schmidt MA. 2010. LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cell Microbiol* 12:1544–1552. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2010.01518.x>.
- Collins JWK, Crepin KM, Rathinam VF, Fitzgerald VAK, Finlay KA, Gad Frankel BB. 2014. *Citrobacter rodentium*: infection, inflammation and the microbiota. *Nat Rev Microbiol* 12:612–623. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3315>.
- Law RJ, Gur-Arie L, Rosenshine I, Finlay BB. 2013. *In vitro* and *in vivo* model systems for studying enteropathogenic *Escherichia coli* infections. *Cold Spring Harb Perspect Med* 3:a009977. <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a009977>.
- Hart E, Yang J, Tauschek M, Kelly M, Wakefield MJ, Frankel G, Hartland EL, Robins-Browne RM. 2008. RegA, an AraC-like protein, is a global transcriptional regulator that controls virulence gene expression in *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* 76:5247–5256. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00770-08>.
- Mundy R, Pickard D, Wilson RK, Simmons CP, Dougan G, Frankel G. 2003. Identification of a novel type IV pilus gene cluster required for gastrointestinal colonization of *Citrobacter rodentium*. *Mol Microbiol* 48:795–809. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03470.x>.
- Proft T, Baker EN. 2009. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria—structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci* 66:613–635. <http://dx.doi.org/10.1007/s00018-008-8477-4>.
- Petty NK, Bulgin R, Crepin VF, Cerdeno-Tarraga AM, Schroeder GN, Quail MA, Lennard N, Corton C, Barron A, Clark L, Toribio AL, Parkhill J, Dougan G, Frankel G, Thomson NR. 2010. The *Citrobacter rodentium* genome sequence reveals convergent evolution with human-pathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 192:525–538. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01144-09>.
- Tatsuno I, Mundy R, Frankel G, Chong Y, Phillips AD, Torres AG, Kaper JB. 2006. The *lpf* gene cluster for long polar fimbriae is not involved in adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* or virulence of *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* 74:265–272. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.74.1.265-272.2006>.
- Yang J, Tauschek M, Hart E, Hartland EL, Robins-Browne RM. 2010. Virulence regulation in *Citrobacter rodentium*: the art of timing. *Microb Biotechnol* 3:259–268. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-7915.2009.00114.x>.
- Yang J, Hart E, Tauschek M, Price GD, Hartland EL, Struggnell RA, Robins-Browne RM. 2008. Bicarbonate-mediated transcriptional activation of divergent operons by the virulence regulatory protein, RegA, from *Citrobacter rodentium*. *Mol Microbiol* 68:314–327. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06171.x>.
- Martinez-Santos VI, Medrano-Lopez A, Saldana Z, Giron JA, Puente JL. 2012. Transcriptional regulation of the *ecp* operon by EcpR, IHF, and

- H-NS in attaching and effacing *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 194:5020–5033. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00915-12>.
15. Torres AG, Lopez-Sanchez GN, Milflores-Flores L, Patel SD, Rojas-Lopez M, Martinez de la Pena CF, Arenas-Hernandez MM, Martinez-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. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00245-07>.
 16. Nelson DL, Kennedy EP. 1971. Magnesium transport in *Escherichia coli*. Inhibition by cobaltous ion *J Biol Chem* 246:3042–3049.
 17. Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
 18. Martinez-Laguna Y, Calva E, Puente JL. 1999. Autoactivation and environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 33:153–166. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01460.x>.
 19. Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640–6645. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.120163297>.
 20. Uzzau S, Figueroa-Bossi N, Rubino S, Bossi L. 2001. Epitope tagging of chromosomal genes in *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:15264–15269. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.261348198>.
 21. De la Cruz MA, Fernandez-Mora M, Guadarrama C, Flores-Valdez MA, Bustamante VH, Vazquez A, Calva E. 2007. LeuO antagonizes H-NS and StpA-dependent repression in *Salmonella enterica* *ompS1*. *Mol Microbiol* 66:727–743. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05958.x>.
 22. Nuccio SP, Baumler AJ. 2007. Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiol Mol Biol Rev* 71:551–575. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.00014-07>.
 23. Garbeva P, van Elsas JD, de Boer W. 2012. Draft genome sequence of the antagonistic rhizosphere bacterium *Serratia plymuthica* strain PRI-2C. *J Bacteriol* 194:4119–4120. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00679-12>.
 24. Smits TH, Rezzonico F, Kamber T, Goemann A, Ishimaru CA, Stockwell VO, Frey JE, Duffy B. 2010. Genome sequence of the biocontrol agent *Pantoea vagans* strain C9-1. *J Bacteriol* 192:6486–6487. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01122-10>.
 25. Hong KW, Koh CL, Sam CK, Yin WF, Chan KG. 2012. Complete genome sequence of *Burkholderia* sp. strain GG4, a betaproteobacterium that reduces 3-oxo-*N*-acylhomoserine lactones and produces different *N*-acylhomoserine lactones. *J Bacteriol* 194:6317. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.01578-12>.
 26. Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, Vazquez A, Barba J, Ibarra JA, O'Donnell P, Metalnikov P, Ashman K, Lee S, Goode D, Pawson T, Finlay BB. 2004. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3597–3602. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0400326101>.
 27. Cheng C, Wakefield MJ, Yang J, Tauschek M, Robins-Browne RM. 2012. Genome-wide analysis of the Pho regulon in a *pstCA* mutant of *Citrobacter rodentium*. *PLoS One* 7:e50682. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0050682>.
 28. Nicholson B, Low D. 2000. DNA methylation-dependent regulation of *pef* expression in *Salmonella* Typhimurium. *Mol Microbiol* 35:728–742. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01743.x>.
 29. Torres AG, Milflores-Flores L, Garcia-Gallegos JG, Patel SD, Best A, La Ragione RM, Martinez-Laguna Y, Woodward MJ. 2007. Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae (LPF) of *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Med Microbiol* 297:177–185. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.01.005>.
 30. Clegg S, Wilson J, 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. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00071-11>.
 31. Korea CG, Badourly R, Prevost MC, Ghigo JM, Beloin C. 2010. *Escherichia coli* K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone-usher fimbriae with distinct surface specificities. *Environ Microbiol* 12:1957–1977. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02202.x>.
 32. Busch A, Waksman G. 2012. Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367:1112–1122. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2011.0206>.
 33. Wurpel DJ, Beatson SA, Totsika M, Petty NK, Schembri MA. 2013. Chaperone-usher fimbriae of *Escherichia coli*. *PLoS One* 8:e52835. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0052835>.
 34. Clayton DJ, Bowen AJ, Hulme SD, Buckley AM, Deacon VL, Thomson NR, Barrow PA, Morgan E, Jones MA, Watson M, Stevens MP. 2008. Analysis of the role of 13 major fimbrial subunits in colonisation of the chicken intestines by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis reveals a role for a novel locus. *BMC Microbiol* 8:228. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-8-228>.
 35. Korea CG, Ghigo JM, 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. <http://dx.doi.org/10.1002/bies.201000121>.
 36. Weening EH, Barker JD, Laarakker MC, Humphries AD, Tsolis RM, Baumler AJ. 2005. The *Salmonella enterica* serotype Typhimurium *lpf*, *bcf*, *stb*, *stc*, *std*, and *sth* fimbrial operons are required for intestinal persistence in mice. *Infect Immun* 73:3358–3366. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.73.6.3358-3366.2005>.
 37. Gill N, Finlay BB. 2011. The gut microbiota: challenging immunology. *Nat Rev Immunol* 11:636–637. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3061>.
 38. Humphries AD, Raffatellu M, Winter S, Weening EH, Kingsley RA, Droleskey R, Zhang S, Figueiredo J, Khare S, Nunes J, Adams LG, Tsolis RM, Baumler AJ. 2003. The use of flow cytometry to detect expression of subunits encoded by 11 *Salmonella enterica* serotype Typhimurium fimbrial operons. *Mol Microbiol* 48:1357–1376. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03507.x>.
 39. Sterzenbach T, Nguyen KT, Nuccio SP, Winter MG, Vakulskas CA, Clegg S, Romeo T, Baumler AJ. 2013. A novel CsrA titration mechanism regulates fimbrial gene expression in *Salmonella* Typhimurium. *EMBO J* 32:2872–2883. <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2013.206>.
 40. Low AS, Holden N, Rosser T, Roe AJ, Constantinidou C, Hobman JL, Smith DG, Low JC, Gally DL. 2006. Analysis of fimbrial gene clusters and their expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Environ Microbiol* 8:1033–1047. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-2920.2006.00995.x>.
 41. Dorman CJ. 2007. H-NS, the genome sentinel. *Nat Rev Microbiol* 5:157–161. <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1598>.
 42. Lim CJ, Lee SY, Kenney LJ, Yan J. 2012. Nucleoprotein filament formation is the structural basis for bacterial protein H-NS gene silencing. *Sci Rep* 2:509. <http://dx.doi.org/10.1038/srep00509>.
 43. Ali SS, Xia B, Liu J, Navarre WW. 2012. Silencing of foreign DNA in bacteria. *Curr Opin Microbiol* 15:175–181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2011.12.014>.
 44. Dorman CJ. 2014. H-NS-like nucleoid-associated proteins, mobile genetic elements and horizontal gene transfer in bacteria. *Plasmid* 75:1–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plasmid.2014.06.004>.
 45. Sonden B, Uhlin BE. 1996. Coordinated and differential expression of histone-like proteins in *Escherichia coli*: regulation and function of the H-NS analog StpA. *EMBO J* 15:4970–4980.
 46. Mellies JL, Barron AM, Carmona AM. 2007. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infect Immun* 75:4199–4210. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01927-06>.
 47. Muller CM, Schneider C, Dobrindt U, Emody L, Hacker J, Uhlin BE. 2010. Differential effects and interactions of endogenous and horizontally acquired H-NS-like proteins in pathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 75:280–293. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06995.x>.
 48. Doyle M, Fookes M, Ivens A, Mangan MW, Wain J, Dorman CJ. 2007. An H-NS-like stealth protein aids horizontal DNA transmission in bacteria. *Science* 315:251–252. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1137550>.
 49. Beloin C, Deighan P, Doyle M, Dorman CJ. 2003. *Shigella flexneri* 2a strain 2457T expresses three members of the H-NS-like protein family: characterization of the Sfh protein. *Mol Genet Genomics* 270:66–77. <http://dx.doi.org/10.1007/s00438-003-0897-0>.
 50. Levine JA, Hansen AM, Michalski JM, Hazen TH, Rasko DA, Kaper JB. 2014. H-NST induces LEE expression and the formation of attaching and effacing lesions in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *PLoS One* 9:e86618. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0086618>.
 51. McVicker G, Sun L, Sohanpal BK, Gashi K, Williamson RA, Plumbridge J, Blomfield IC. 2011. SlyA protein activates *fimB* gene expression and type 1 fimbriation in *Escherichia coli* K-12. *J Biol Chem* 286:32026–32035. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.266619>.
 52. Schauer DB, Falkow S. 1993. Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect Immun* 61:2486–2492.
 53. Casadaban MJ. 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected

- promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *J Mol Biol* 104:541–555. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(76\)90119-4](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(76)90119-4).
54. Barba J, Bustamante VH, Flores-Valdez MA, Deng W, Finlay BB, Puente JL. 2005. A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA. *J Bacteriol* 187:7918–7930. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.187.23.7918-7930.2005>.
55. Grant SG, Jessee J, Bloom FR, Hanahan D. 1990. Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:4645–4649. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.87.12.4645>.
56. Mayer MP. 1995. A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript. *Gene* 163:41–46. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00389-N](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1119(95)00389-N).
57. Bustamante VH, Santana FJ, Calva E, Puente JL. 2001. Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* 39:664–678. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02209.x>.

Fimbrias: estructuras bacterianas que promueven la colonización intestinal por bacterias patógenas

M. en C. Gustavo G. Caballero Flores y Dr. José Luis Puente García

Las fimbrias son estructuras similares a “cabellos bacterianos” que permiten la adherencia de bacterias patógenas a los tejidos donde causan daño, por lo que son consideradas elementos de virulencia importantes en muchas enfermedades infecciosas, incluyendo aquellas que afectan el tracto gastrointestinal. Nuestro estudio aporta información relevante para entender la función y los mecanismos que controlan la producción de fimbrias. Este conocimiento podrá aprovecharse en un futuro para proponer y evaluar estrategias nuevas de prevención o tratamiento de las infecciones causadas por patógenos que dependen de estas estructuras para producir una enfermedad

Las infecciones gastrointestinales y los patógenos

Actualmente, las enfermedades diarreicas causan aproximadamente el 10 % del total de decesos infantiles a nivel mundial, lo que equivale a 1,600-2,100 muertes por día o 580,000-760,000 por año; por lo cual, estos padecimientos representan un problema grave de salud pública, sobre todo en niños menores de 5 años. Uno de los microorganismos causantes de diarrea con un mayor riesgo de muerte en niños, es la bacteria *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). EPEC, junto con *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y el patógeno específico de ratones *Citrobacter rodentium*, pertenecen a un grupo de bacterias patógenas que se adhieren a las células del epitelio intestinal de los organismos a los que infectan (conocidos como “hospederos”) y causan lesiones características conocidas como de “adherencia y destrucción” (en inglés “*attaching and effacing*” o A/E) (Figura 1). Al no existir un animal de laboratorio que sea sensible a la infección causada por los patógenos de humanos EPEC y EHEC, se ha utilizado la infección que causa *C. rodentium* en el ratón, como una medida alternativa para el estudio de los mecanismos de virulencia de este grupo de bacterias.

Fimbrias bacterianas

Las fimbrias son estructuras que podrían denominarse “cabellos bacteria-

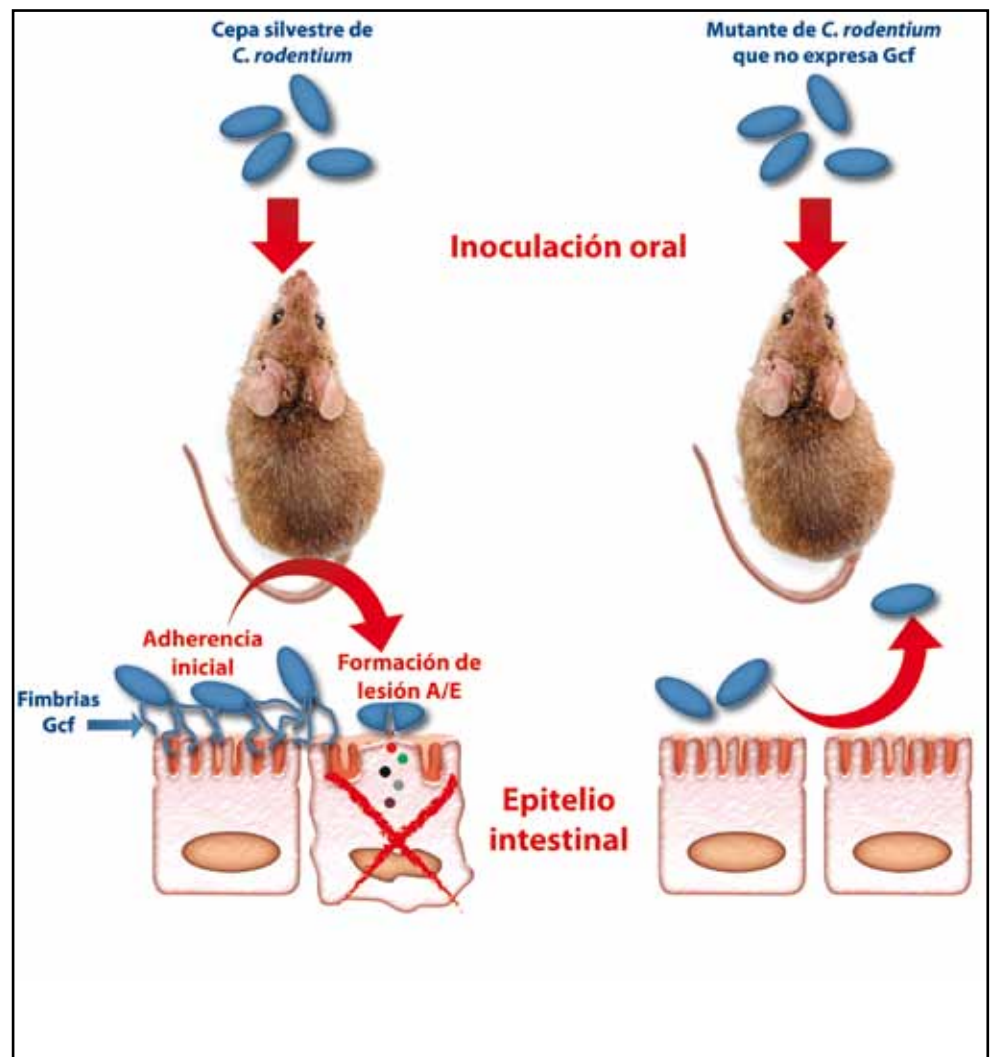
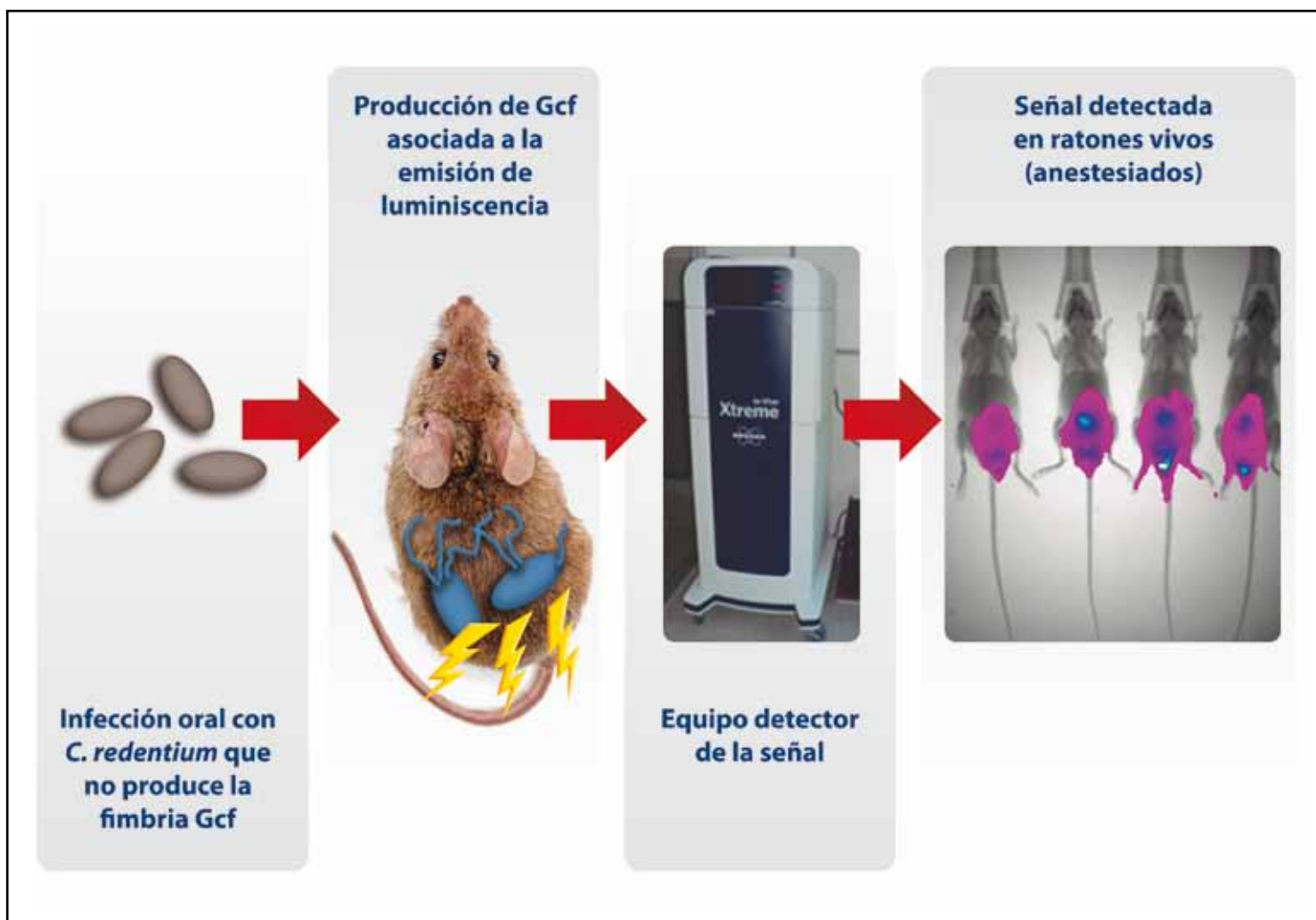


Figura 1. La fimbria Gcf es requerida por *C. rodentium* para colonizar eficientemente el intestino del ratón. Antes de infectar al ratón, las bacterias de *C. rodentium* naturales (silvestres) y mutantes (modificadas) no presentan a la fimbria Gcf en su superficie ya que las condiciones de crecimiento en el laboratorio no favorecen su formación. Durante la infección, se activa la producción de fimbrias Gcf en las bacterias silvestres, lo cual promueve la adherencia inicial de *C. rodentium* al epitelio intestinal y provoca lesiones A/E en los enterocitos, mientras que las mutantes son eliminadas rápidamente por el hospedero en los días posteriores a la infección.



nos", que promueven la adherencia de la bacteria a diferentes tipos de superficies, tanto vivas (bióticas) como inertes (abióticas). Se ha demostrado que durante las etapas iniciales del proceso de infección, los patógenos A/E, al igual que otras bacterias patógenas, utilizan diversos tipos de fimbrias para adherirse de manera específica y eficiente al tejido que infectarán en sus hospederos. Por esta razón, las fimbrias son consideradas elementos de virulencia importantes en muchas enfermedades infecciosas causadas por bacterias, en particular las del tracto gastrointestinal.

La fimbria Gcf

En nuestro laboratorio estamos interesados en el estudio de la función y regulación de la expresión de genes de virulencia en patógenos A/E. Aunque se conocen con cierto detalle los genes requeridos para la formación de la lesión A/E, así como los mecanismos que permiten que dichos genes se activen o se apaguen, se sabe poco sobre

los elementos que promueven la unión inicial de la bacteria al tejido intestinal del hospedero, proceso conocido como colonización. Por esta razón, en este estudio decidimos utilizar a *C. rodentium* para identificar los genes requeridos por la bacteria para una adherencia eficiente al epitelio intestinal. Para este propósito, se introdujeron mutaciones en el ADN de *C. rodentium* mediante inserciones al azar de un fragmento pequeño de ADN móvil conocido como transposón, esto generó una colección de bacterias mutantes de *C. rodentium* a las cuales se les evaluó su capacidad de colonizar ratones infectados oralmente. De esta forma, se logró identificar una cepa con virulencia atenuada que presentaba deficiencias en las etapas tempranas del proceso de colonización (figura 1), dicha mutante resultó afectada por el transposón en un grupo de genes que se activan simultáneamente para la formación de un tipo específico de fimbrias bacterianas, las cuales se denominaron Gcf por "fimbrias de colonización intestinal" (en inglés "*gut colonization fimbriae*"). La ac-

tivación de los genes Gcf en *C. rodentium* ocurre en niveles muy bajos cuando se crece a la bacteria en el laboratorio (*in vitro*), lo cual contrasta con su importancia durante la colonización del hospedero y sugiere que este tipo de fimbrias se producen específicamente dentro del ratón. Esta posibilidad se demostró mediante el uso de una variante de *C. rodentium* bioluminiscente que produce luz cuando se activan los genes Gcf dentro de los ratones infectados. También se logró identificar una molécula (la proteína H-NS) encargada de mantener apagados los genes Gcf hasta que son requeridos para la formación de las fimbrias dentro del ratón.

Este trabajo fue originalmente publicado en el siguiente artículo científico: Caballero-Flores, G. G., Croxen, M. A., Martínez-Santos, V. I., Finlay, B. B. y Puente, J. L. (2015). Identification and regulation of a novel *Citrobacter rodentium* gut colonization fimbria (Gcf). *Journal of Bacteriology*, vol.197 págs.1478 –1491

Contacto: puente@ibt.unam.mx



Aedes aegypti alkaline phosphatase ALP1 is a functional receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins

Alan I. Jiménez^{a,1}, Esmeralda Z. Reyes^{a,1}, Angeles Cancino-Rodezno^a, Leidy P. Bedoya-Pérez^a, Gustavo G. Caballero-Flores^a, Luis F. Muriel-Millan^a, Supaporn Likitvivanavong^b, Sarjeet S. Gill^b, Alejandra Bravo^a, Mario Soberón^{a,*}

^a Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. postal 510-3, Cuernavaca 62250, Morelos, Mexico

^b Department of Cell Biology and Neuroscience, University of California, Riverside, CA 92506, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 March 2012

Received in revised form

31 May 2012

Accepted 4 June 2012

Keywords:

Bacillus thuringiensis

Cry toxins

Receptors

Alkaline phosphatase

RNA silencing

Aedes aegypti

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis subs. *israelensis* produces at least three Cry toxins (Cry4Aa, Cry4Ba, and Cry11Aa) that are active against *Aedes aegypti* larvae. Previous work characterized a GPI-anchored alkaline phosphatase (ALP1) as a Cry11Aa binding molecule from the gut of *A. aegypti* larvae. We show here that Cry4Ba binds ALP1, and that the binding and toxicity of Cry4Ba mutants located in loop 2 of domain II is correlated. Also, we analyzed the contribution of ALP1 toward the toxicity of Cry4Ba and Cry11Aa toxins by silencing the expression of this protein through RNAi. Efficient silencing of ALP1 was demonstrated by real-time quantitative PCR (qPCR) and Western blot. ALP1 silenced larvae showed tolerance to both Cry4Ba and Cry11Aa although the silenced larvae were more tolerant to Cry11Aa in comparison to Cry4Ba. Our results demonstrate that ALP1 is a functional receptor that plays an important role in the toxicity of the Cry4Ba and Cry11Aa proteins.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Bacillus thuringiensis subs. *israelensis* (Bti) is effective for controlling mosquito vectors of human diseases like certain *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* species (Bravo et al., 2007, 2011). During the sporulation phase, Bti produce crystal inclusions composed of a number of proteins, including the Cry11Aa, Cry10Aa, Cry4Aa and Cry4Ba Cry toxins that belong to the three-domain (3D) family of Cry proteins and two cytolytic Cyt toxin, Cyt1Aa and Cyt2Ba, all of which are active against mosquito larvae or are cytolytic (Bravo et al., 2007, 2011; Nisnevitch et al., 2006).

Different members of the 3D Cry toxin family show toxicity to a variety of insect species belonging to a number of insect orders. Domain I is a seven α -helix bundle involved in membrane insertion, toxin oligomerization and pore formation. Domain II is a β -prism of three anti-parallel β -sheets packed around a hydrophobic core with exposed loop regions, and domain III is a β -sandwich of two anti-parallel β -sheets; both domains are involved in midgut protein

recognition (Bravo et al., 2007). In the case of Cry4Ba toxin, mutagenesis studies have shown that domain II loop 2 region is important for *Aedes aegypti* toxicity (Khaokhiew et al., 2009).

A number of Cry toxin binding molecules have been described in the insect midgut and these have been shown to be involved in Cry toxicity (Pigott and Ellar, 2007). Among them are glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored aminopeptidases (APN), alkaline phosphatases (ALP) and transmembrane cadherins (Gahan et al., 2001; Fernández et al., 2006; Hua et al., 2008; Chen et al., 2009a, 2009b; Arenas et al., 2010; Fabrick et al., 2009). Recently Jurat-Fuentes et al. (2011) showed that lepidopteran colonies resistant to Cry1 toxins have diminished ALP activity and expression of ALP in their gut, indicating an important role of this Cry-binding protein in the mode of action of Cry1 toxins. It has been proposed that Cry toxins undergo a sequential binding mechanism with GPI-anchored proteins and cadherin with subsequent oligomerization of the Cry toxin to form pre-pore oligomers that insert into the membrane of the insect midgut epithelium cells bursting them by osmotic cell lysis (Bravo et al., 2004; Pacheco et al., 2009).

In the case of the dipteran *A. aegypti*, similar Cry toxin-binding midgut proteins, including, cadherin, APN and ALP, have been identified (Likitvivanavong et al., 2011). A GPI-anchored ALP

* Corresponding author.

E-mail address: mario@ibt.unam.mx (M. Soberón).

¹ Both authors contributed equally to this work.

isoform (ALP1) was shown to be functionally involved in Cry11Aa binding and toxicity to *A. aegypti* larvae (Fernández et al., 2006, 2009). Additionally, it was recently reported that expression of a different *A. aegypti* GPI-anchored ALP isoform (mALP) in insect cells resulted in Cry4Ba binding to transfected cells and susceptibility to this toxin (Dechklar et al., 2011). Finally, three APN isoforms were shown to be involved in the toxicity of Cry4Ba in *A. aegypti* by gene silencing with dsRNA (Saengwiman et al., 2011). One of these APN isoforms was previously characterized as a Cry11Aa binding molecule (Chen et al., 2009b).

In this work we analyzed the role of ALP1 in Cry4Ba toxicity by characterizing Cry4Ba loop 2 mutants affected in ALP1 binding and also by analyzing the toxicity of Cry4Ba to *A. aegypti* larvae silenced of the ALP1 gene. Our data indicates that ALP1 is a functional receptor of Cry4Ba.

2. Materials and methods

2.1. Growth of *Bacillus thuringiensis* (Bt), purification of Cry4Ba and Cry11Aa crystal inclusions and toxin activation

For the production of Cry4Ba and Cry11Aa crystal inclusions, acrySTALLIFEROUS Bt strain Q2-81 containing plasmid pHT618 (Delecluse et al., 1993) or pGC6 (Chang et al., 1993) respectively, were cultured for 3 days at 29 °C and 200 rpm in nutrient broth sporulation medium supplemented with erythromycin (10 µg/ml) (Lereclus et al., 1995). Spores and crystals produced by the Bt strains were harvested and washed three times with 0.3 M NaCl, 0.01 M EDTA, pH 8.0. For Cry4Ba activation, the crystals from the spore crystal mixture were solubilized in carbonate buffer (sodium bicarbonate/carbonate 0.1 M, pH 10.5) supplemented with 0.1% dithiothreitol, and activated with 1:20 w/w trypsin (Sigma–Aldrich Co.), for 16 h at 37 °C. Cry11Aa toxin was not solubilized since it was only used for determining insecticidal activity using spore crystals.

2.2. Site directed mutagenesis of the cry4Ba gene

Mutagenesis of the cry4Ba gene cloned in the pHT618 plasmid (Delecluse et al., 1993) was performed using a QuikChange XL-kit (Stratagene, La Jolla CA). Appropriate oligonucleotides were synthesized for each mutant construction. Mutants were sequenced and transformed into acrySTALLIFEROUS Bt strain 407 (Lereclus et al., 1989). Cry4Ba mutant toxins were purified and activated as described above.

2.3. Expression of ALP1

The *E. coli* strain ER2566 transformed with pET-32b plasmid containing *alp1* gene was previously described (Fernández et al., 2009). This strain produced ALP1 as an N-terminally His-tagged protein fused with thioredoxin. For protein expression, the ALP1 gene construct was induced by addition of 1 mM isopropyl β-D-thiogalactoside (IPTG) and protein was recovered as an inclusion body. The recombinant protein was purified using Ni-NTA resin (Qiagen) in the presence of 8 M Urea, dialyzed against PBS buffer and then analyzed by SDS-PAGE before use.

2.4. Preparation of Brush Border Membrane Vesicles (BBMV)

BBMV were prepared from dissected midguts of fourth instar *A. aegypti* larvae by differential precipitation using MgCl₂ as previously reported (Nielsen-LeRoux and Charles, 1992), and stored at –70 °C until used.

2.5. Qualitative assays of Cry4Ba binding to BBMV

Binding of Cry4Ba or Cry4Ba mutants was performed in 100 µl binding buffer (1× PBS, 0.1% BSA, 0.1% Tween 20 pH 7.6). After incubation of 10 nM toxin with 10 µg *A. aegypti* BBMV for 1 h at 25 °C, unbound toxin was removed by centrifugation (10 min at 14,000 × g). The membrane pellet with bound toxin was washed twice with 100 µl binding buffer and suspended in 1× PBS pH 7.6. An equal volume of 2× sample loading buffer (0.125 M Tris–HCl pH6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.01% bromophenol blue) was added, samples were boiled for 3 min, separated by SDS-PAGE (10%), and electrotransferred to nitrocellulose membranes. The bound toxin was visualized by Western blot using anti-Cry4Ba polyclonal antibody (1:100,000 dilution) followed goat anti-rabbit secondary antibody coupled with horseradish peroxidase (Amersham) (1:5000 dilution) for 1 h. Finally, the blot was revealed by incubation with luminol (Pierce, Rockford, IL) as described by the manufacturer. Binding was quantified by scanning optical density of the 46 kDa Cry4Ba band in the blot.

2.6. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

To determine the Cry4Ba binding to ALP1, ELISA 96-well plates (Costar, NY) were incubated for 12 h at 4 °C with 2.5 µg of ALP1 in NaHCO₃ pH 9.6, followed by five washes with PBS, 0.2% Tween 20. The plates were then blocked by incubation with PBS, 0.5% gelatin (BioRad) 0.2% Tween 20, for 1 h at 37 °C and washed five times with buffer A (PBS, 0.1% Tween 20). The ELISA plates were then incubated with different concentrations of Cry4Ba for 2 h at 37 °C and washed again with buffer A. Cry4Ba that bound ALP1 was revealed with a 1:10,000 dilution of polyclonal anti-Cry4Ba antibody for 1 h and washed three times with buffer A followed by incubation with 1:10,000 dilution of anti-rabbit antibody (Santa Cruz) for one hour and washed three times. Finally, plates were incubated with 2 mM o-phenylene-diamine, 0.7% H₂O₂ in 0.1 M Na₂HPO₄ pH 5. The enzymatic reaction was stopped with 6 N HCl and absorbance read at 490 nm with a microplate reader from Molecular Devices (Sunnyvale, CA). Alternatively the binding of ALP1 to Cry4Ba and mutants was analyzed by incubating ELISA 96-well plates with 2.5 µg of Cry4Ba or Cry4Ba mutants as described above. The ELISA plates were then incubated with 50 nM of ALP1 recombinant protein and ALP1 that bound Cry4Ba was revealed with a 1:5000 dilution of anti-His antibody coupled to HRP (Qiagen) and treated as described above. ELISA was revealed as described above. As controls, wells coated with ALP1 but incubated without Cry4Ba or coated with Cry4Ba but incubated without ALP1 and revealed with the corresponding antibody were included in every ELISA. The absorbance of control, which was never greater than 0.1 OD, was subtracted from the experimental absorbance values.

2.7. Insect bioassays

An *A. aegypti* colony originally from CINVESTAV-Irapuato (CINVESTAV strain) was kept under laboratory conditions (Ibarra et al., 2003). To determine the mean lethal concentration (LC50) of Cry4Ba and loop 2 mutants, ten early fourth-instar *A. aegypti* larvae reared under 12:12 light:dark period were placed in 100 ml of de-chlorinated tap water (dechlorination was achieved by leaving tap water standing overnight). The effect of spore crystal suspension of Cry4Ba toxin and different mutants on mortality was analyzed after 24 h. Four replicates were used to obtain fiducial limits. The median lethal concentration (LC50) was calculated by Probit analysis using statistical parameters after four independent assays (Polo-PC LeOra Software). For dsRNA treated larvae, bioassays were performed using 20 larvae in 200 ml de-chlorinated tap

water, which contained individual spore crystal concentrations at the LC50 dose (100 ng/ml for Cry4Ba and 250 ng/ml for Cry11Aa). Larval mortality was analyzed after 24 h.

2.8. RNA interference (RNAi) assays

A 149 bp fragment of untranslated 3' end of the *A. aegypti* ALP1 gene was obtained using the sense and antisense primers and the cloned ALP1 gene as template (Fernández et al., 2009). 3' untranslated regions are highly divergent in conserved gene families. As control dsRNA lacZ fragment of 900 bp was amplified with appropriate primers. The fragment was cloned into pLitmus28i (HiScribe™, New England Biolabs, Beverly, MA) vector containing two T7 promoters flanking the multi-cloning site. These promoters enabled amplification of the cloned fragment by PCR using a T7 oligonucleotide. The PCR product was purified with QIAquick PCR purification kit protocol (Qiagen Valencia, CA). *In vitro* transcription of both DNA strands to yield dsRNA of the insert was performed with T7 RNA polymerase using the HiScribe RNAi Transcription Kit (New England Biolabs) as reported by the manufacturer.

RNAi experiments were performed as reported previously (Cancino-Rodezno et al., 2010). Two hundred neonate *A. aegypti* larvae in 10 ml of dechlorinated water were fed for 16 h with 200 µg of dsRNA previously encapsulated with Effectene transfection reagent as described by the manufacturer (Qiagen). The encapsulated dsRNA sample was diluted with dechlorinated water to a final volume of 10 ml. After dsRNA feeding the mosquito larvae were transferred to clean water and fed with regular diet until they reached early fourth instar for bioassays or for dissection of the gut. To quantify ALP1 transcript levels in dsRNA-treated and untreated larvae, total RNA was isolated from the dissected midguts and then reverse transcribed using oligo dT and SuperScript II (Invitrogen). For qPCR, we obtained the cDNA coding sequences of all *A. aegypti* ALP from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and made a multiple sequence alignment using Bioedit program (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html). Two primers 969F20 (5'-CGATCTCACTTACGCCGCTA-3') and 1069R20 (5'-TCCAGG-GATTTCGAGCTTT-3') that amplified a 120 bp ALP1 region were used, while for mALP we designed two specific primers dsALPm-F (5'-GCGCACAAGGAGAACAACCGATCAAGG-3') and dsALPm-R (5'-ATGTCTGCTCTTCTCGCTCGGAGTGCCT-3') to amplify a 328 bp. RT-PCR was performed using total RNAs extracted from *A. aegypti* larval midgut using the following profile: 94 °C for 30 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 30 s with a final extension of 7 min at 72 °C. The resulting PCR products was cloned and sequenced showing the designed primers specifically amplified the ALP1 or mALP gene sequences indicating that the primers used were specific for each gene sequence. The level of rps3 mRNA (AAEL008192-RB), were used as internal control to normalize the results obtained for the ALP1 mRNA among the tested groups using primers Rps3 forward (5'-GGCATGTTCCGTGCTGAATTGAACG-3') and Rps3 reverse (5'-TTCTCGGCG TACAGCTCGACG 3'). qPCR was performed on a Light Cycler 480 II Instrument (Roche) using SYBER Green/Rox Master Mix (Fermentas). Amplification conditions were 10 min at 95 °C for 15 s and 60 °C for 60 s for a total of 40 cycles. The final primer concentration was 250 nM. All qPCR reactions were performed in triplicate for ALP1 and twice for mALP genes of each experimental group. A nontemplate control of each reaction was included in each reaction. The quantification technique used to analyze data was as reported (Livak and Schmittgen, 2001).

2.9. Western blot

For ALP detection 40 midguts from larvae treated with ALP1 dsRNA or LacZ dsRNA were dissected and homogenized in PBS

buffer containing 2 mM PMSF. The homogenate was centrifuged (5000 g) and the supernatant recovered to load gels. For two dimensional electrophoresis, midgut protein lysates were precipitated and cleaned using 2-D Clean up kit (Amersham, Biosciences) as described by the manufacturer and resuspended in rehydration electrofocusing buffer (0.8 M urea, 2% Chaps, 0.5% IPG buffer v/v pH 3–10, 0.002% bromophenol blue m/v). The protein concentration was determined by 2-D Quant (Amersham Biosciences). Seventy micrograms of protein in 125 µl of rehydration electrofocusing buffer were used to rehydrate overnight 18 cm immobilized pH gradient (IPG) strip (pH 3–11 non-linear, GE Life Sciences). First dimension electrofocusing was run on the IPGphor III (GE Life Sciences) with the following settings: step 1, 500 V, 30 min; step 2, 1000 V, 30 min; step 3, 5000 V, 1.5 h. Before the SDS-PAGE (second dimension), the IPG strip was reduced for 10 min with 65 mM of dithiothreitol in sodium dodecyl sulfate (SDS) equilibration buffer (50 mM Tris-HCl [pH 8.8], 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS, 0.002% bromophenol blue), and then alkylated for 15 min with 135 mM of iodoacetamide in the same equilibration buffer. The second dimension SDS-PAGE was performed in an Ettan DALT Six system (GE Life Sciences), using 15% homogeneous acrylamide gels. Electrophoresis was performed using an initial step of 2 W/gel for 25 min followed by 17 W/gel until the dye front reached the bottom of the gel. Gels from two-dimensional electrophoresis were transferred onto nitrocellulose membranes. Proteins were detected with polyclonal anti-ALP1 (1/5000; 2 h) and a goat anti-rabbit secondary antibody coupled with horseradish peroxidase (Amersham) (1/10,000; 1 h), followed by Super Signal chemiluminescence substrate (Pierce) as indicated by the manufacturer. The anti-ALP1 antibody was previously obtained by producing a recombinant ALP1 protein in *E. coli* to use it to immunize rabbits (Fernández et al., 2009).

3. Results

3.1. Cry4Ba domain II loop 2 is involved in ALP1 binding

Since previous work showed that Cry11Aa and Cry4Ba bound ALP1, and that Cry11Aa mutants in domain II loop $\alpha 8$ or domain III $\beta 18$ – $\beta 19$ region affected ALP1 binding and toxicity to *A. aegypti* (Fernández et al., 2009) we decided to identify the Cry4Ba regions involved in ALP1 binding. Site directed mutagenesis of Cry4Ba domain II loop 2 revealed that this toxin region is important for toxicity to *A. aegypti* (Khaokhiew et al., 2009). The loop 2 region of domain II corresponds to residues 387SSPS390 (Boonserm et al., 2005). Four mutants were constructed in the domain II including loop 2 residues and some residues of $\beta 6$ and $\beta 7$ strands. These mutants were named B6M1 (ITD383-385AAA), L2M2 (TSS386-388AAA), L2M3 (PSN389-391AAA) and B7M4 (RVTK392-395AAAA). The four mutants were structurally stable since two bands of 46 and 18 kDa were obtained when they were proteolytically activated with trypsin as observed with wild-type Cry4Ba (Fig. S1). Bioassays with fourth instar *A. aegypti* larvae were performed to determine the median lethal concentration (LC50) of Cry4Ba and loop 2 mutants. The mutants L2M2, L2M3 and B7M4 showed two-, six- and ten-fold lower toxicity than Cry4Ba, respectively (Table 1), while for mutant B6M1, which had two-fold lower toxicity than Cry4Ba, the fiducial limits of the corresponding LC50 values overlap.

To analyze if these differences in toxicity result from changes in toxin binding qualitative binding analyses of activated Cry4Ba and domain II loop 2 mutants to *A. aegypti* BBMV were performed. Indeed the four Cry4Ba domain II loop 2 mutants showed 45–70% reduction in binding of the 46 kDa protein to BBMV in comparison to Cry4Ba (Fig. 1). To analyze the binding of the Cry4Ba loop 2

Table 1
Toxicity of Cry4Ba and its loop 2 mutants to *A. aegypti* fourth instar larvae.

Toxin	LC50 ^a (ng/ml)	LC50mut/LC50wt
Cry4Ba	79.4 (61.0–102.4) ^b	
B6M1 (ITD383-385AAA) ^d	114.9 (81.6–160.4)	1.4 ^c
L2M2 (TSS386-388AAA)	173.1 (105.1–282.9)	2.1
L2M3 (PSN389-391AAA)	455.9 (355.2–596.6)	5.7
B7M4 (RVTK392-395AAAA)	767.5 (678.2–861.8)	9.6

^a Fifty percent lethal concentration (LC50) of spore/crystal inclusions.

^b 95% fiducial limits.

^c Fiducial limits overlap.

^d Residues that were changed to alanine in each mutant.

mutants to ALP1 we first performed a binding saturation curve of Cry4Ba to purified ALP1 produced in *E. coli* cells by ELISA binding assay. Fig. 2A shows that Cry4Ba binds to ALP1 in a saturable way with apparent relative low binding affinity. Binding analysis of ALP1 to the Cry4Ba was performed by ELISA assays under non-saturating conditions confirmed that ALP1 has reduced binding to Cry4Ba mutants (Fig. 2B). In conditions where binding is analyzed under non saturated conditions a reduction in binding is likely to reflect a decreased in binding affinity. Moreover, the binding of ALP1 to Cry4Ba correlates with their toxicity levels, that is, B7M4 mutant that showed tenfold lower toxicity (Table 1) had ten-fold less binding to ALP1 (Fig. 2B). However, B6M1 mutant showed reduced toxicity and reduced binding to *A. aegypti* BBMV but had no significant effect on ALP1 binding.

3.2. Toxicity of Cry11Aa and Cry4Ba to *A. aegypti* ALP1-silenced larvae

The reduction in binding of Cry4Ba loop 2 mutants to ALP1 and in the toxicity of these mutants suggests that ALP1 is a functional receptor of this toxin. To validate the role of ALP1 in mediating

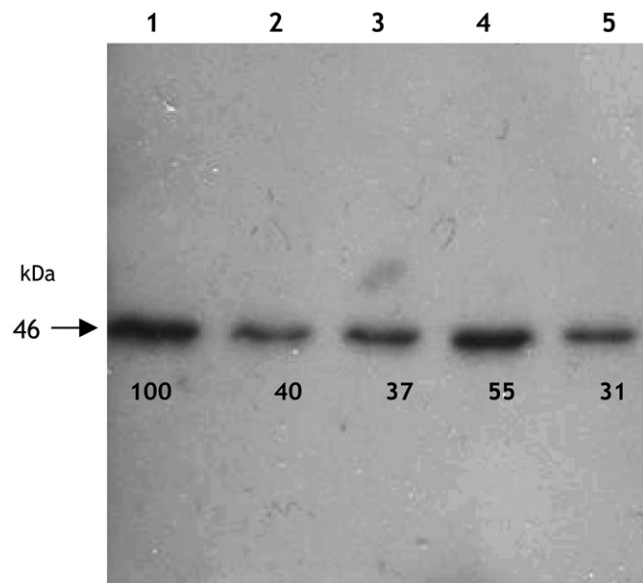


Fig. 1. Cry4Ba loop 2 mutants are affected on *A. aegypti* BBMV binding. Qualitative binding analysis of Cry4Ba (lane 1) and Cry4Ba mutants B6M1 (lane 2), L2M2 (lane 3), L2M3 (lane 4), and B7M4 (lane 5): Numbers below bands show the percentage of binding (normalized to Cry4Ba) obtained by scanning optical density of the 46 kDa toxin band.

Cry4Ba and Cry11Aa toxicity to *Aedes* larvae we decided to silence ALP1 expression using dsRNA interference. Screening of the *A. aegypti* genome using the mALP gene sequence, revealed 13 different ALP isoforms including ALP1 (Dechklar et al., 2011). Of these 13 ALP sequences at least eight are expressed in the insect midgut (Fernández et al., 2009; Dechklar et al., 2011; Bayyareddy et al., 2009; <http://funcgen.vectorbase.org/ExpressionData/>). In order to specifically silence the ALP1 isoform, a DNA fragment of 149 bp from the untranslated 3' region of the ALP1 transcript was cloned into a suitable vector for dsRNA synthesis as described in Materials and Methods. Unlike the open reading frames 3' untranslated regions are not conserved even for homologous transcripts.

Because efficient gene silencing in *A. aegypti* larvae can be obtained by feeding dsRNA molecules encapsulated in Effentene liposomes (Cancino-Rodezno et al., 2010), encapsulated ALP1 dsRNA was fed to first instar *A. aegypti* larvae. Fig. 3 shows that the ALP1 transcript levels were reduced three-fold in ALP1-silenced larvae in comparison to control larvae. We also analyzed the effect of ALP1 dsRNA on mALP transcript levels and show that the ALP1 RNAi did not affect the expression of mALP RNA (Fig. 3). However, Western blot did not reveal any effect of feeding ALP1 dsRNA at the protein level (data not shown). Since at least eight ALP isoforms have been shown to be expressed in the *A. aegypti* gut, we performed a Western blot from a two-dimension (2-D) gel electrophoresis of *A. aegypti* midguts (Fig. S2). Fig. 4A shows that the anti-ALP1 antibody recognized at least four proteins with similar molecular weights (65 kDa) but with different isoelectric points. Western blot analysis of 2-D gels of ALP1-silenced larvae showed that the less acidic isoform was reduced in comparison to the other three cross-reactive anti-ALP proteins (Fig. 4B). This agrees with the predicted pI for four ALP's, ALP1 (pH 6.8), ALP2 (pH 5.2), ALP3 (pH 6.1) and mALP (pH 5.8), although posttranslational modifications can contribute to the pIs of ALP isoforms. These results suggest that ALP1 was specifically silenced without affecting the expression of other ALP midgut isoforms.

ALP1-silenced larvae were exposed to an LC50 dose of either Cry11Aa or Cry4Ba and the toxicity was compared to that of control lacZ silenced or non-silenced larvae. Fig. 5 shows that ALP1-silenced larvae were more tolerant to both Cry11Aa and Cry4Ba toxins indicating that ALP1 has a functional role in the toxicity of both Cry toxins. However, ALP1-silenced larvae were more tolerant to Cry11Aa in comparison to Cry4Ba, since the silencing of ALP1 reduced the toxicity of Cry4Ba less than two-fold while a 4-fold reduction in Cry11Aa toxicity was observed (Fig. 5).

4. Discussion

We previously showed that ALP1 and a cadherin act as receptor proteins for the Cry11Aa toxin in *A. aegypti* larvae (Fernández et al., 2006, 2009; Chen et al., 2009a). More recently we also showed that Cry4Ba toxicity in this mosquito species is apparently not mediated by the cadherin molecule (Rodríguez-Almazán et al., 2012). Further our previous work (Fernández et al., 2009) provided preliminary evidence that ALP1 also binds Cry4Ba. Here we provide further evidence ALP1 indeed has as an important a role in mediating the toxicity of Cry4Ba to *Aedes* larvae.

In mosquito larvae in which ALP1 gene expression was attenuated using dsRNA-mediated gene silencing, the toxicity of Cry4Ba was two-fold lower than in controls (Fig. 5). As expected in these silenced mosquitoes Cry11Aa toxicity was decreased four-fold since previous data showed that Cry11Aa relies on ALP1 binding for toxicity (Fernández et al., 2006). Interestingly ALP1-silenced larvae become more tolerant to Cry11Aa than to Cry4Ba, suggesting that Cry11Aa relies more on ALP1 binding than does Cry4Ba. Further,

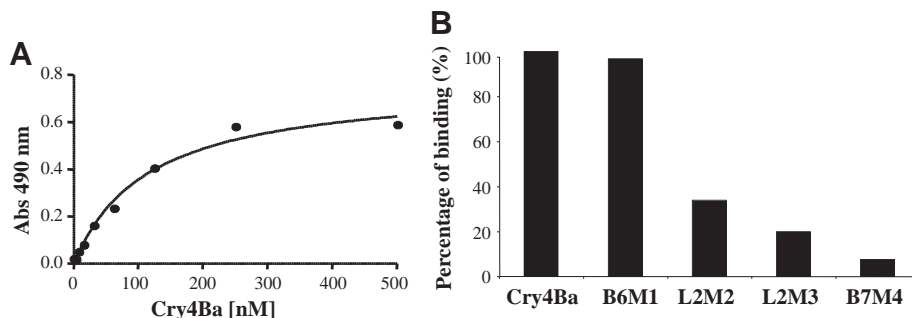


Fig. 2. Cry4Ba domain II loop 2 is involved in binding to ALP1. A. Cry4Ba binding to ALP1 analyzed by ELISA saturation binding assays. ELISA binding assay was performed by fixing 2.5 μ g of ALP1 in ELISA plates and incubating with different concentrations of Cry4Ba and revealing bound Cry4Ba with polyclonal anti-Cry4Ba antibody. B. ELISA binding assays of 2.5 μ g of Cry4Ba or loop 2 mutants to 50 nM ALP1. ELISA was revealed with anti-His antibody.

this decrease in toxicity was correlated with a decrease in ALP1 transcript levels but not that of a homologous ALP, mALP (Dechklar et al., 2011). Moreover, protein levels of ALP1 were also observed to decrease in ALP1 silenced mosquitoes.

To further analyze the role of ALP1 as a receptor of the Cry4Ba toxin, we characterized four Cry4Ba mutants located near or in loop 2 of domain II, since loop 2 was previously shown to be important for *A. aegypti* toxicity (Khaokhiew et al., 2009). All the mutants analyzed showed a decreased in toxicity. Our data also showed a correlation between the binding of Cry4Ba loop 2 mutants to the ALP1 receptor and toxicity (Fig. 3). The binding of loop 2 mutants to *A. aegypti* BBMV was also affected. These results suggest that the Cry4Ba protein relies on ALP1 binding to exert its toxic effect. Nevertheless, B6M1 mutant did not fit in this correlative effect since it showed reduced binding to BBMV, reduced toxicity but no significant effect on ALP1 binding. Also, since ALP1 silencing showed a moderate effect on Cry4Ba toxicity, it is possible that Cry4Ba mutations described here in addition affected Cry4Ba binding to other receptor proteins such as mALP. This remains to be determined.

Our results show that the GPI-anchored ALP1 is an important Cry toxin-binding molecule that is involved in Cry11Aa and Cry4Ba toxicity. In addition, it was previously shown that expression of a homologous ALP, mALP, in insect cells conferred susceptibility to

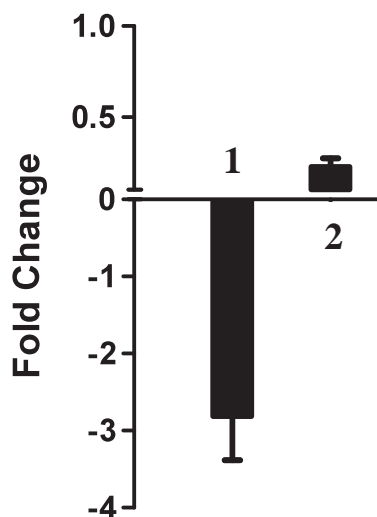


Fig. 3. ALP1 silenced *A. aegypti* larvae have reduced ALP1 transcript levels. qPCR analysis of ALP1 transcript (lane 1) or mALP (lane 2). ALP1 and mALP qPCR was performed from total RNA extracted from control (Effectene treated larvae) or ALP1 silenced larvae. ALP1 transcript levels are the average of three independent experiments, while those of mALP are from two independent experiments.

Cry4Ba (Dechklar et al., 2011). Both results support the view that ALP's are functional receptors for the Cry4Ba toxin.

Several other GPI-anchored proteins may also be involved in the mode of action of these toxins suggesting a complex binding mechanism of these toxins with GPI-anchored receptors to exert their toxicity to *A. aegypti* larvae. For example three *A. aegypti* APN isoforms were silenced and also resulted in a tolerant phenotype to Cry4Ba (Saengwiman et al., 2011). Nevertheless, it was shown that silencing one particular APN isoform (APN12783) conferred a stronger tolerant phenotype to Cry4Ba than the silencing of the two other APN isoforms, indicating that APN12783 has a predominant role in Cry4Ba toxicity (Saengwiman et al., 2011). It is surprising that three APN and two ALP isoforms are involved in Cry4Ba toxicity to *A. aegypti*. If all these GPI-anchored proteins fulfill the same role in Cry4Ba toxicity it should be expected that silencing one molecule should not result on a tolerant phenotype since the other GPI-anchored proteins should compensate for the absence of the silenced molecule. This could explain the moderate effect of silencing ALP1 on Cry4Ba toxicity. Nevertheless, it is possible that the different GPI-anchored molecules involved in Cry4Ba toxicity could be involved in different steps on the mode of action of this toxin.

It has been proposed that GPI-anchored proteins fulfill two roles – binding the monomeric toxin with low binding affinity to concentrate it in the microvilli membrane before the toxin binds to cadherin and also to bind with high affinity the pre-pore oligomer facilitating its insertion into the membrane (Pardo-López et al., 2006; Pacheco et al., 2009). Thus, it is possible that different GPI-anchored proteins identified could have differential roles on the mode of action of Cry4Ba. This remains to be determined by analyzing the binding affinities of the monomeric and oligomeric forms of Cry4Ba to pure GPI-anchored receptors. Alternatively, it is also possible that different GPI-anchored proteins could form a protein complex that functions as a Cry toxin receptor, thus silencing one GPI-anchored protein could affect the binding of Cry4Ba to this complex receptor. It is interesting to mention that GPI-anchored proteins are specifically localized in lipid rafts and disruption of lipid rafts by sequestering cholesterol with methyl- β -cyclodextrin was shown to inhibit Cry1A pore-formation (Zhuang et al., 2002). Thus the integrity of lipid rafts could be important to maintain a set of GPI-anchored proteins together as complex of proteins that function as receptor of Cry4Ba. It will be interesting to compare the effect of silencing of the three APN isoforms on Cry11Aa and Cry4Ba toxicity to *A. aegypti*.

Although we identify here an important role for ALP1 in Cry4Ba toxicity in *A. aegypti* it is important to cognize of the fact that in other mosquito species other proteins may be involved in toxicity. Clearly in *Anopheles gambiae* the Cry4Ba toxin targets the cadherin-like protein, which also synergizes its toxicity (Hua et al., 2008), and

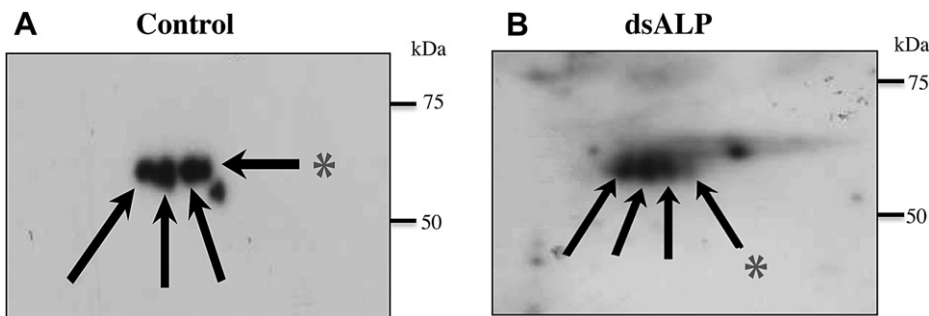


Fig. 4. ALP1 silenced larvae show reduced levels of one ALP isoform. Western blot analysis of ALP protein in two-dimensional electrophoresis from 70 µg of midgut protein from *A. aegypti* larvae. Arrows show four anti-ALP1 cross-reacting proteins, the asterisk show the ALP isoform that with reduced expression in ALP1 silenced larvae.

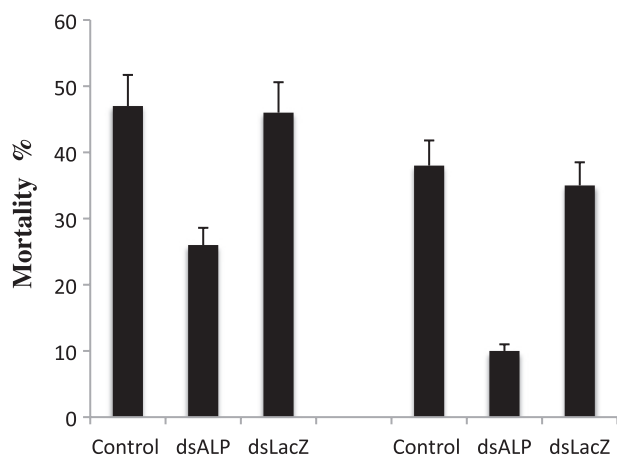


Fig. 5. ALP1 silenced larvae are more tolerant to Cry4Ba and Cry11Aa. Two hundred control, or ALP1 silenced (dsALP) or lacZ dsRNA treated (dsLacZ) larvae were exposed to Cry4Ba or Cry11Aa at the LC50 dose and mortality was recorded. Bars show average of three independent repetitions with standard deviations.

in *Anopheles albimanus* an α -amylase acts as a Cry4Ba receptor (Fernández-Luna et al., 2010).

Finally, it is essential to note that there is an even greater diversity of proteins involved in binding mosquitocidal toxins. The diversity is too extensive for a discussion here but can be assessed in recent reviews (Bravo et al., 2011; Likitvivanavong et al., 2011).

Acknowledgments

We thank Lizbeth Cabrera for technical assistance. Research was funded in part through grants from the National Institutes of Health [1R01 AI066014], DGAPA/UNAM [IN218608 and IN210208-N], CONACyT [81639] and UCR RSAP.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ibmb.2012.06.001.

References

Arenas, I., Bravo, A., Soberón, M., Gómez, I., 2010. Role of alkaline phosphatase from *Manduca sexta* in the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *J. Biol. Chem.* 285, 12497–12503.

Bayyareddy, K., Andacht, T.M., Abdullah, M.A., Adang, M.J., 2009. Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut from *Aedes (Stegomyia) aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 279–286.

Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D.J., Li, J., 2005. Crystal structure of the mosquito larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. *J. Mol. Biol.* 348, 363–382.

Bravo, A., Gomez, I., Conde, J., Munoz-Garay, C., Sanchez, J., Miranda, R., Zhuang, M., Gill, S.S., Soberón, M., 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. et Biophys. Acta* 1667, 38–46.

Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicol.* 49, 423–435.

Bravo, A., Likitvivanavong, S., Gill, S.S., Soberón, M., 2011. *Bacillus thuringiensis*: a story of a successful bioinsecticide. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 423–431.

Cancino-Rodezno, A., Alexander, C., Villaseñor, R., Pacheco, S., Porta, H., Pauchet, Y., Gill, S.S., Soberón, M., Bravo, A., 2010. The mitogen-activated protein kinase p38 pathway is involved in insect defense against Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40, 58–63.

Chang, C., Yu, Y.M., Dai, S.M., Law, S.K., Gill, S.S., 1993. High-level cryIVD and cytA gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-kilodalton protein, and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 815–821.

Chen, J., Aimanova, K.G., Fernandez, L.E., Bravo, A., Soberón, M., Gill, S.S., 2009a. *Aedes aegypti* cadherin serves as a putative receptor of the Cry11Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Biochem. J.* 424, 191–200.

Chen, J., Aimanova, K.G., Pan, S., Gill, S.S., 2009b. Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11Aa toxin. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 688–696.

Dechklar, M., Tiewisiri, K., Angsuthanasombat, C., Pootankit, K., 2011. Functional expression in insect cells of glycosylphosphatidylinositol-linked alkaline phosphatase from *Aedes aegypti* larval midgut: a *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptor. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 159–166.

Delecluse, A., Poncet, S., Klier, A., Rappoport, G., 1993. Expression of cryIVA and cryIVB Genes, independently or in combination, in a crystal-negative strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3922–3927.

Fabríck, J., Oppert, C., Lorenzen, M.D., Morris, K., Oppert, B., Jurat-Fuentes, J.L., 2009. A novel *Tenebrio molitor* cadherin is a functional receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa toxin. *J. Biol. Chem.* 284, 18401–18410.

Fernández, L.E., Aimanova, K.G., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M., 2006. A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of Cry11Aa toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem. J.* 394, 77–84.

Fernández, L.E., Martínez-Anaya, C., Lira, E., Chen, J., Evans, J., Hernández-Martínez, S., Lanz-Mendoza, H., Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2009. Cloning and epitope mapping of Cry11Aa-binding sites in the Cry11Aa-receptor alkaline phosphatase from *Aedes aegypti*. *Biochemistry* 48, 8899–8907.

Fernández-Luna, M.T., Lanz-Mendoza, H., Gill, S.S., Bravo, A., Soberón, M., Miranda-Rios, J., 2010. An α -amylase is a novel receptor for *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cry4Ba and Cry11Aa toxins in the malaria vector mosquito *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). *Environ. Microbiol.* 12, 746–757.

Gahan, L.J., Gould, F., Heckel, D.G., 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293, 857–860.

Hua, G., Zhang, R., Abdullah, M.A., Adang, M.J., 2008. *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. *Biochemistry* 47, 5101–5110.

Ibarra, J.E., del Rincón, M.C., Ordúz, S., Noriega, D., Benintende, G., Monnerat, R., Regis, L., de Oliveira, C.M., Lanz, H., Rodríguez, M.H., Sánchez, J., Peña, G., Bravo, A., 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5269–5274.

Jurat-Fuentes, J.L., Karumbaiah, L., Jakka, S.R., Ning, C., Liu, C., Wu, K., Jackson, J., Gould, F., Blanco, C., Portilla, M., Perera, O., Adang, M., 2011. Reduced levels of membrane-bound alkaline phosphatase are common to lepidopteran strains resistant to Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *PLoS One* 6, e17606.

Khaokhiew, T., Angsuthanasombat, C., Promptmas, C., 2009. Correlative effect on the toxicity of three surface-exposed loops in the receptor-binding domain of the *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin. *FEMS Microbiol. Lett.* 300, 139–145.

- Lereclus, D., Arantes, O., Chaufaux, J., Lecadet, M.-M., 1989. Transformation and expression of a cloned δ -endotoxin gene in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 60, 211–218.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., Chaufaux, J., 1995. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spo0A mutant. *Biotechnol.* 13, 67–71.
- Likitvivanavong, S., Chen, J., Evans, A.E., Bravo, A., Soberón, M., Gill, S.S., 2011. Multiple receptors as targets of Cry toxins in mosquitoes. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2829–2838.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C T}$ method. *Methods* 25, 402–408.
- Nielsen-LeRoux, C., Charles, J.F., 1992. Binding of *Bacillus sphaericus* binary toxin to a specific receptor on midgut brush-border membranes from mosquito larvae. *Eur. J. Biochem.* 210, 585–590.
- Nisnevitch, M., Cohen, S., Ben-Dov, E., Zaritsky, A., Sofer, Y., Cahan, R., 2006. Cyt2Ba of *Bacillus thuringiensis*: activation by putative endogenous protease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 26, 99–105.
- Pacheco, S., Gomez, I., Arenas, I., Saab-Rincon, G., Rodriguez-Almazan, C., Gill, S.S., Bravo, A., Soberon, M., 2009. Domain II loop 3 of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin is involved in a "ping-pong" binding mechanism with *Manduca sexta* aminopeptidase-N and cadherin receptors. *J. Biol. Chem.* 284, 32750–32757.
- Pardo-López, L., Gómez, I., Rausell, C., Sánchez, J., Soberón, M., Bravo, A., 2006. Structural changes of the Cry1Ac oligomeric pre-pore from *Bacillus thuringiensis* induced by *N*-acetylgalactosamine facilitates toxin membrane insertion. *Biochemistry* 45, 10329–10336.
- Pigott, C.R., Ellar, D.J., 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71, 255–281.
- Rodríguez-Almazán, C., Reyes, E.Z., Zúñiga-Navarrete, F., Muñoz-Garay, C., Gómez, I., Evans, A.M., Likitvivanavong, S., Bravo, A., Gill, S.S., Soberón, M., 2012. Cadherin binding is not a limiting step for *Bacillus thuringiensis* subs. *israelensis* Cry4Ba toxicity to *Aedes aegypti* larvae. *Biochem. J.* 443, 711–717.
- Saengwiman, S., Aroonkesorn, A., Dedvisitsakul, P., Sakdee, S., Leetachewa, S., Angsuthanasombat, C., Pootanakit, K., 2011. *In vivo* identification of *Bacillus thuringiensis* Cry4Ba toxin receptors by RNA interference knockdown of glycosylphosphatidylinositol linked aminopeptidase N transcripts in *Aedes aegypti* larvae. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 407, 708–713.
- Zhuang, M., Oltean, D.I., Gómez, I., Pullikuth, A.K., Soberón, M., Bravo, A., Gill, S.S., 2002. *Heliothis virescens* and *Manduca sexta* lipid rafts are involved in Cry1A toxin binding to the midgut epithelium and subsequent pore formation. *J. Biol. Chem.* 277, 13863–13872.

12.- ANEXO II.- PREMIOS Y RECONOCIMIENTOS

El presente trabajo fue acreedor del premio “**Early career scientist FEMS Congress Grant**”, otorgado por la “**Federation of European Microbiological Societies**” (FEMS) durante el congreso:

- “Identification and regulation of a novel *Citrobacter rodentium* gut colonization fimbriae (Gcf)” Caballero-Flores, G. G., Croxen, M. A, Martínez-Santos, V. I, Finlay, B. B. y Puente, J. L. 6th Congress of European Microbiologists. 7 al 11 de junio del 2015. Maastricht, Holanda.

Adicionalmente, este trabajo también fue acreedor del “**Premio Langebio 2015**”, otorgado cada año por la Unidad Langebio-Cinvestav (Irapuato) al mejor proyecto de investigación en el área químico-biológica desarrollado por estudiantes de doctorado en México.

A continuación se muestran las constancias correspondientes a dichos reconocimientos.



The 6th FEMS Congress of European Microbiologists

CERTIFICATE OF ATTENDANCE & AWARD

This is to certify that

Gustavo Gilberto Caballero Flores

was awarded with a FEMS Congress Grant and attended
the 6th FEMS Congress of European Microbiologists,
held in Maastricht, The Netherlands, 7-11 June 2015

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Piffaretti'.

Prof. Dr. Jean-Claude Piffaretti
FEMS President

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'V. Taleski'.

Prof. Dr. Vaso Taleski
FEMS Grants Committee Chairperson

DÍAS ACADÉMICOS 2015



Cinvestav - Irapuato
Langebio

EL LABORATORIO NACIONAL DE GENÓMICA PARA LA BIODIVERSIDAD
DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN
OTORGA EL PRESENTE RECONOCIMIENTO A:

GUSTAVO GILBERTO CABALLERO FLORES
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA UNAM

POR SER **GANADOR** DEL PREMIO LANGEBIO 2015,
CON SU TRABAJO:

IDENTIFICATION AND REGULATION OF A NOVEL CITROBACTER RO-
DENTIUM GUT COLONIZATION FIMBRIA (GCF)

AUDITORIO LANGEBIO

IRAPUATO,
GUANAJUATO

4 DE DICIEMBRE

DR. ALEXANDER DE LUNA FORS
COMITÉ ACADÉMICO LANGEBIO

DR. LUIS HERRERA ESTRELLA
DIRECTOR DE LANGEBIO