



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Estudio sobre la regulación del operón fimbrial *ecp* de *Citrobacter rodentium*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

L.B.M. María Inés Isidro Coxca

TUTOR PRINCIPAL

Dr. José Luis Puente García
[Instituto de Biotecnología-UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos
[Instituto de Biotecnología-UNAM](#)

Dr. Miguel Castañeda Lucio
[Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas
CICM-ICUAP-BUAP](#)

Ciudad de México. Mayo 2018.



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.

“...No te rindas, por favor no cedas, aunque el frío queme, aunque el miedo muerda, aunque el sol se ponga y se calle el viento, aún hay fuego en tu alma, aún hay vida en tus sueños, porque cada día es un comienzo nuevo, porque esta es la hora y el mejor momento, porque no estás solo, porque yo te quiero”.

– Mario Benedetti

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

Durante la realización de mi trabajo, recibí una beca por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de beca 405034 y número de registro 575306, durante el periodo comprendido de febrero 2015 a enero 2017.

El comité tutorial estuvo integrado por:

Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos

(Instituto de Biotecnología-UNAM)

Dr. Miguel Castañeda Lucio

(Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas-ICUAP-BUAP)

Dr. José Luis Puente García

(Instituto de Biotecnología-UNAM)

El comité revisor y Jurado de Tesis:

Dr. Enrique Merino Pérez

(Instituto de Biotecnología-UNAM)

Dra. Clarita Olvera Carranza

(Instituto de Biotecnología-UNAM)

Dra. Margarita María de la Paz Arenas Hernández

(Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas-ICUAP-BUAP)

Dra. Bertha María Josefina González Pedrajo

(Instituto de Fisiología Celular-UNAM)

Dra. Claudia Rodríguez Almazán

(Instituto de Biotecnología-UNAM)

DEDICATORIA

A mis padres, a quienes les debo lo que soy y por los que pretendo ser mejor cada día.

A mi hermanito, la luz de mi vida y el mejor regalo que mis padres me pudieron haber dado.

A Aldo, que siempre ha estado ahí para todo y que siempre me acompaña en mi camino.

Al Dr. José Luis, gracias por el apoyo y la confianza que ha depositado en mí, por las largas y divertidas discusiones de trabajo y también por todos los momentos divertidos fuera del lab. He aprendido mucho en estos años, tanto académicamente como emocionalmente, y gran parte de eso se lo debo a usted por lo que siempre le estaré infinitamente agradecida.

A "las niñas" (Betí, Arís, Cris, Mai y Marianela), mis amiguitas de la maestría, que aun siendo tan diferentes forjamos una bonita amistad.

A los buenos amigos que tuve la oportunidad de conocer al venir aquí, Vic, Marco, Xade, Pepe y Leo.

A mis compañeros y amigos del lab: Vero, Panchis, Ale, Pao, Gerardo, Álvaro, Luci, Claudia P, Claudia S, Deya, Jess, Magda, Paloma, Crispín, Emilio, Lili, Esteban, Dr. Ismael, Marcos, Dr. Victor, Emma, Mario, Amapola y Rosalvita.

A doña Rebe, porque además de proveerme de material limpio cuando lo necesitaba con urgencia, también veía que comiera a mis horas y tomará una dosis de café para estar despierta, gracias por ofrecerme su amistad y su cariño de mamá.

A Gus, por ayudarme con mis primeros ensayos, siempre con una sonrisa y con la mejor disposición, haciéndome ver que las cosas no son tan difíciles como parecen a primera vista.

A Ramón, por enseñarme la importancia de la frase "si vas a hacer las cosas hazlas bien, sino mejor ni las hagas", que ha sido mi lema de batalla.

Al Dr. Richard, por estar ahí cuando tengo dudas express, por contribuir al desarrollo del proyecto aportando ideas y comentarios muy interesantes, pero también por acompañarnos en muchas aventuras.

A Steph, por adentrarme en el mundo del futbol y por hacer agradable y divertida la estancia en la mesa.

A Carmen, por su ayuda para familiarizarme con ciertas técnicas, compartir ideas, soluciones y trabajar en equipo; pero también por todas las aventuras de las que me hiciste participe.

A Haydee, por todo lo que aprendimos juntas, las largas charlas de la vida y de los experimentos, y resumiendo tantas cosas, por acompañarme en "las buenas y las malas".

Y finalmente, si algún nombre se me ha olvidado escribir o resaltar, me disculpo con anticipación y quiero que sepan que esta etapa ha sido muy constructiva y sigue formándome; pertenecer a una comunidad como el IBt me hace sentir orgullosa. Muchas gracias a todas las personas que contribuyeron a que este período de mi vida académica y personal se hiciera uno solo, y con uno solo me refiero a "UNO MEMORABLE".

Gracias

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. José Luis, por haberme aceptado en su grupo de trabajo y por su entera disposición para planear, discutir y analizar los experimentos.

A los miembros de mi comité tutorial, la Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos y al Dr. Miguel Castañeda Lucio, por todos sus comentarios, ideas y sugerencias para el desarrollo y continuación de este proyecto y además por su plena disposición para ayudarme.

A los miembros del comité revisor, por todos sus comentarios y contribuciones a este escrito.

Al Dr. Ricardo Oropeza por la asesoría, el aporte de ideas y su plena disposición.

A la Dra. Lucía Perezgasga Ciscomani, al Biol. Francisco Santana, al M.C. Marcos Fernández y a la Dra. Alejandra Vázquez por el apoyo técnico brindado para la realización de este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada (405034) durante mis estudios de maestría, así como a la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA-IN213516) y a CONACyT CB-239659 y FC-2015-2/950 por los recursos otorgados para la realización de este proyecto.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP-UNAM) por los apoyos otorgados para poder presentar los avances de este proyecto en los siguientes congresos:

- ✓ **Regulatory mechanisms controlling the expression of the *ecp* fimbrial operon in *Citrobacter rodentium*.** Isidro-Coxca María I., Martínez-Santos Verónica I., Escalera-Maurer Andrés, Medrano-López Abraham, Caballero-Flores Gustavo, Vázquez Alejandra y Puente José Luis. IV Congreso de Bioquímica y Biología Molecular de Bacterias. 4 al 8 de octubre de 2015, Atlixco, Puebla, México.
-

-
- ✓ **Regulatory mechanisms controlling the expression of the *ecp* fimbrial operon in *Citrobacter rodentium*.** María Inés Isidro Coxca, Verónica I. Martínez Santos, Andrés Escalera, Abraham Medrano, Gustavo Caballero, Alejandra Vázquez y José Luis Puente. XXXI Congreso Nacional de Bioquímica. 6 al 11 de noviembre 2016 Aguascalientes, Aguascalientes, México.
-

ÍNDICE

ABSTRACT	1
RESUMEN.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1 Relevancia de los patógenos A/E	3
1.2 <i>Citrobacter rodentium</i> como modelo de estudio	9
1.3 Fimbrias	12
1.3.1 Clasificación por su vía de ensamble	13
a) Vía chaperona-acomodador (CU)	13
b) Vía de secreción general (Pili tipo IV)	14
c) Vía de nucleación/precipitación extracelular.....	14
d) Vía chaperona-acomodador alterna.....	15
1.3.2 Mecanismos de regulación de la expresión de fimbrias.....	16
1.4 Operones fimbriales de <i>Citrobacter rodentium</i>	18
1.5 La fimbria ECP	20
1.6 di-GMP-c y su relación con la virulencia.....	23
2. ANTECEDENTES.....	27
2.1 El operón fimbrial <i>ecp</i> de EPEC	27
2.2 El operón fimbrial <i>ecp</i> de <i>Citrobacter rodentium</i>	28
3. JUSTIFICACIÓN	32
4. HIPÓTESIS	32
5. OBJETIVOS.....	33
5.1 Objetivo general	33
5.2 Objetivos particulares	33
5.3 Objetivos específicos.....	33
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
6.1 Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento.....	34
6.2 Oligonucleótidos utilizados.....	37
6.3 Generación de cepas mutantes.....	41
6.4 Construcción de fusiones transcripcionales al gen reportero <i>cat</i>	43

6.5 Construcción de la fusión transcripcional al gen reportero <i>lacZ</i>	43
6.6 Ensayo de la actividad CAT	44
6.7 Ensayo de proteínas secretadas	45
6.8 Cuantificación de biopelícula <i>in vitro</i>	45
6.9 Inmunodetección por <i>western blot</i>	46
6.10 Determinación de la actividad β -galactosidasa	47
6.11 Mutagénesis al azar	48
6.12 Ensayos de colonización en ratón	49
7. RESULTADOS.....	52
7.1 IHF y CreR son esenciales para la expresión del operón <i>ecp</i> aun en ausencia de H-NS.....	52
7.2 ECP se expresa preferencialmente en fase estacionaria pero el efecto de represión por H-NS es evidente desde fase exponencial.....	54
7.3 El elemento DRE está localizado entre las posiciones -378 y -358, siendo las posiciones -373 a -364 esenciales para la activación mediada por CreR.....	56
7.4 El promotor del operón <i>ecp</i> es activo en <i>E. coli</i> MC4100 solo en presencia de CreR y con el DRE intacto.....	59
7.5 Identificación de reguladores positivos del operón <i>ecp</i>	61
7.5.1 Generación de herramientas	63
7.5.2 Determinación de las condiciones óptimas de expresión de la fusión pR <i>SecA-lacZ</i>	65
7.5.3 Búsqueda de reguladores transcripcionales del operón <i>ecp</i>	66
7.6 ECP y CreR no están implicados en la formación de biopelícula por <i>C. rodentium</i>	70
7.7 El sistema ECP-CreR no está involucrado en el proceso de colonización en ratón.....	73
8. DISCUSIÓN.....	76
9. CONCLUSIONES	83
10. PERSPECTIVAS	84
11. ANEXOS.....	85

12. REFERENCIAS	90
------------------------------	-----------

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Causas globales de muerte en niños.....	3
Figura 2. Lesión A/E sobre la superficie de los enterocitos producida por <i>C. rodentium</i>	5
Figura 3. Representación esquemática de la isla de patogenicidad LEE de EPEC E2348/69.....	7
Figura 4. Etapas del establecimiento del patógeno y la formación de la lesión A/E.....	8
Figura 5. Representación esquemática de la estructura y biogénesis de la fimbria tipo 1 y el pilus P por la vía chaperona-acomodador.....	14
Figura 6. Modelo de la arquitectura de ECP en <i>E. coli</i>	22
Figura 7. Genes ortólogos de <i>ecp</i> de EPEC encontrados en otras bacterias.....	23
Figura 8. Estructura y procesos celulares en los que se encuentra implicado el di-GMP-cíclico.....	24
Figura 9. Proteínas relacionadas con la señalización por di-GMP-c encontradas en <i>C. rodentium</i> 25	
Figura 10. Modelo del control de la expresión de la fimbria Mrk de <i>K. pneumoniae</i> mediada por di-GMP-c	26
Figura 11. Regulación transcripcional del operón <i>ecp (mat)</i>	28
Figura 12. Esquema comparativo de la organización del operón <i>ecp</i> de EPEC y <i>C. rodentium</i>	29
Figura 13. La presencia de IHF y CreR es determinante para que el operón <i>ecp</i> se exprese, aun en ausencia de H-NS.....	54
Figura 14. El promotor de <i>ecp</i> es 16 veces más activo en fase estacionaria que en fase exponencial, pero el efecto represor de H-NS es evidente desde la fase exponencial.....	55
Figura 15. La secuencia entre las posiciones -383 y -357, con respecto al inicio de transcripción, es esencial para la expresión del operón <i>ecp</i>	57
Figura 16. El DRE se localiza en la región comprendida de -378 a -358 de la región reguladora de <i>ecp</i> donde las bases de -373 a -364 son esenciales para la activación mediada por CreR.....	59
Figura 17. El <i>ecpAp</i> se expresa en <i>E. coli</i> K-12 solo en presencia de CreR y con la secuencia DRE silvestre.....	61
Figura 18. Mapa de la serie de plásmidos pBSL118.....	62
Figura 19. Las mutaciones en <i>lacZ</i> , <i>creR</i> y/o <i>hns</i> no afectan la secreción de proteínas LEE a través del SST3.....	63

Figura 20. Esquema representativo del plásmido pRSecpA-lacZ.....	64
Figura 21. La fusión transcripcional pRSecpA-4.1 es activa en tres diferentes medios de cultivo.....	64
Figura 22. La fusión pRSecpA-lacZ es más activa en la cepa mutante en <i>hns</i>	66
Figura 23. Actividad transcripcional de la fusión pRSecpA-lacZ en las cepas seleccionadas de la mutagénesis con Tn5.....	67
Figura 24. Perfil de plásmidos de las cepas candidatas resultantes de la mutagénesis al azar con mini Tn5	69
Figura 25. Cinética de formación de biopelícula por <i>C. rodentium</i>	71
Figura 26. ECP no participa en la formación de biopelícula y aunque CreR no es un regulador clave en su formación, su sobreexpresión la inhibe	72
Figura 27. ECP no se expresa en las condiciones donde <i>C. rodentium</i> forma biopelícula.....	73
Figura 28. CreR no está involucrada en el proceso de colonización en ratón.....	75
Figura 29. Modelo de la regulación del operón fimbrial <i>ecp</i> de <i>C. rodentium</i>	82
Figura 30. Sitios de inserción de mTn5 en el genoma de <i>C. rodentium</i>	89

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Operones fimbriales presentes en el genoma de <i>Citrobacter rodentium</i>	19
Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo.....	34
Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo.....	35
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	37

ANEXOS

Anexo 1. Medios de cultivo y soluciones.....	85
Anexo 2. Inserciones del transposón mTn5 en el genoma de <i>C. rodentium</i>	89

Abreviaturas

A/E	Adherencia y esfacelamiento (“ <i><u>A</u>ttaching and <u>e</u>ffacing</i> ”)
aEPEC	EPEC atípicas
Ap	Ampicilina
BCA	Ácido bicinconínico (“ <i><u>b</u>icin<u>ch</u>oninic <u>a</u>cid</i> ”)
BFP	Pili formadores de mechones (“ <i><u>b</u>undle-<u>f</u>orming <u>p</u>ili</i> ”)
CAT	Cloranfenicol acetiltransferasa
Cm	Cloranfenicol
CreR	<i><u>C</u>itrobacter <u>r</u>odentium <u>e</u>cp <u>r</u>egulator</i>
CU	Chaperona-acomodador (“ <i><u>C</u>haperone-<u>U</u>sher</i> ”)
DGC	Diguanilatociclase
di-GMP-c	<i>bis-(3'-5') <u>c</u>yclic-<u>d</u>i-<u>g</u>uanosine-<u>m</u>onophosphate</i>
DMEM	<i><u>D</u>ulbecco's <u>M</u>odified <u>E</u>agle's <u>M</u>edium</i>
DRE	Elemento de regulación distal (“ <i><u>D</u>istal <u>R</u>egulatory <u>E</u>lement</i> ”)
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EAL	Ácido glutámico-Alanina-Leucina
EIL	Ácido glutámico-Isoleucina-Leucina
ECP	Pilus común de <i>E. coli</i> (“ <i><u>E</u>. <u>c</u>oli <u>c</u>ommon <u>p</u>ilus</i> ”)
<i>ecpAp</i>	Promotor de <i>ecp</i>
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
FDE	Fosfodiesterasa
GEMS	“ <i><u>G</u>lobal <u>E</u>nteric <u>M</u>ulticentre <u>S</u>tudy</i> ”
GGDEF	Glicina-Glicina-Ácido aspártico-Ácido glutámico-Fenilalanina
HD-GYP	Histidina-Ácido aspártico-Glicina-Tirosina-Prolina
H-NS	“ <i><u>H</u>istone-like <u>N</u>ucleoid-<u>S</u>tructuring protein</i> ”

IHF	<i>“Integration Host Factor”</i>
IP	Isla de patogenicidad
Km	Kanamicina
LB	Luria-Bertani
LB-NS	LB sin NaCl (<i>“Luria-Bertani-Not salt”</i>)
LEE	<i>“Locus of Enterocyte Effacement”</i>
Lrp	<i>“Leucine-responsive Regulatory Protein”</i>
MM-Glc	Medio mínimo con Glucosa
MPEC	<i>“Mouse-pathogenic E. coli”</i>
NFEC	<i>“Normal flora E. coli”</i>
Nles	<i>“non-LEE-encoded effectors”</i>
pEAF	<i>“E. coli adherence factor plasmid”</i>
PEPEC	<i>“Pig pathogenic E. coli”</i>
REPEC	<i>“Rabbit pathogenic E. coli”</i>
SEM	<i>“Scanning Electron Microscopy”</i>
SOB	<i>“Super optimal broth”</i>
SOC	<i>“Super optimal broth plus glucose”</i>
SST3	Sistema de secreción tipo 3
tEPEC	EPEC típicas
Tir	<i>“translocated intimin receptor”</i>
TMCH	Hiperplasia colónica transmisible en ratón
UPEC	<i>E. coli</i> uropatógena
Tc	Tetraciclina
TCA	<i>“Trichloroacetic acid”</i>
WT	Silvestre (<i>“Wild type”</i>)

ABSTRACT

Citrobacter rodentium is a highly infectious Gram-negative bacterium that causes colitis and transmissible murine crypt hyperplasia in mice. This bacterium is related to human pathogens enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). EPEC is a major cause of infantile diarrhea and EHEC causes hemorrhagic colitis and the hemolytic uremic syndrome (HUS), which could lead to kidney failure and be fatal. *C. rodentium*, EPEC and EHEC produce the A/E (attaching and effacing) lesion on the surface of intestinal epithelial cells during the colonization process, which is mediated by the gene products encoded within a pathogenicity island known as LEE (Locus of Enterocyte Effacement). *C. rodentium* infection in mice has been used as a study model to elucidate the role of conserved genes among A/E pathogens and to understand the virulence mechanisms that allow these bacteria to colonize and cause disease in the host.

The fimbriae or pili are one of the essential structures to carry out the adhesion to different environmental substrates or reservoirs, as well as to epithelial cells and with this proceed with a successful colonization. The *E. coli* common pilus is present in commensal and pathogenic *E. coli*, and an ortholog has been found in *C. rodentium*. The *C. rodentium* *ecp* operon is a cluster of five genes (*ecpABCDE*) encoding proteins involved in the assembly of the fimbria, which expression is favored during stationary phase and in static DMEM cultures at 26°C. However, the *ecpR* gene, encoding the positive regulator of *ecp* in EPEC is not at the start of the operon but downstream in the opposite direction and separated by the *creR* gene that is not present in *E. coli*. Interestingly, while EcpR does not seem to be expressed or have a role in *ecp* regulation in *C. rodentium*, *creR*, encoding a putative phosphodiesterase, is essential for *ecp* activation.

In this work we continued with the analysis of the *ecp* fimbrial operon expression regulation in *C. rodentium* and we began to explore aspects about the ECP function. Using transcriptional fusions to the *cat* reporter gene we identified a *cis*-acting regulatory sequence, named Distal Regulatory Element (DRE), was shown to be essential for the CreR-mediated activation of *ecp* expression and we propose is the binding site of a positive regulatory protein responding to c-di-GMP levels. This regulatory protein is being sought by transposon mutagenesis. Moreover, we found that the global regulators IHF and H-NS regulate, as in EPEC and EHEC, *C. rodentium* *ecp* expression in a positive and negative manner, respectively, and that the presence of CreR and IHF were still needed even in absence of H-NS. Comparing the biofilm formation of the WT strain with a set of mutants, we determined that CreR is not a key regulator for biofilm formation but its overexpression exerts a negative effect.

RESUMEN

Citrobacter rodentium es una bacteria Gram-negativa altamente infecciosa que causa colitis e hiperplasia colónica transmisible en ratón. Esta bacteria está relacionada con dos patógenos de humano, *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). EPEC es una de las principales causas de diarrea infantil, y EHEC provoca colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico, las cuales pueden derivar en falla renal y ser fatales. *C. rodentium*, EPEC y EHEC pertenecen a la familia de patógenos causantes de la lesión A/E (*attaching and effacing* o de adherencia y esfacelamiento) sobre la superficie de los enterocitos durante el proceso de colonización, la cual es mediada por los productos génicos codificados dentro de la isla de patogenicidad LEE (*“Locus of Enterocyte Effacement”*). Se ha utilizado la infección por *C. rodentium* en ratones como modelo de estudio para dilucidar el papel que juegan los genes conservados entre estos patógenos y entender mejor los mecanismos de virulencia que les permiten colonizar y causar enfermedad en el hospedero.

Las fimbrias o pili son una de las estructuras esenciales para llevar a cabo la adherencia a diferentes sustratos ambientales o reservorios, así como a células epiteliales y con esto proceder con una colonización exitosa. El *“E. coli common pilus”* (ECP) está presente en cepas comensales y patógenas de *E. coli* y un ortólogo ha sido encontrado en *C. rodentium*, lo que nos ofrece la oportunidad de estudiar su papel en la colonización intestinal de ratón. El operón *ecp* de *C. rodentium* consta de cinco genes (*ecpABCDE*) que codifican para proteínas involucradas en el ensamble de la fimbria, cuya expresión se favorece durante la fase estacionaria y en cultivos estáticos a 26°C. Sin embargo, el gen *ecpR* que codifica para el regulador positivo de *ecp* en EPEC, no se encuentra al principio del operón sino corriente abajo en dirección opuesta y separado del operón por el gen *creR* que no está presente en *E. coli*. De manera interesante, mientras no se ha visto que EcpR se exprese o tenga un papel en la regulación de *ecp* en *C. rodentium*, *creR* codifica para una posible fosfodiesterasa que es esencial para la activación de *ecp*.

En este trabajo se continuó con el análisis de la regulación de la expresión del operón *ecp* de *C. rodentium* y se comenzó a explorar aspectos a cerca de la función de ECP. Utilizando un conjunto de fusiones transcripcionales acopladas al gen reportero *cat* se identificó una secuencia reguladora esencial para la expresión de *ecp* mediada por CreR, a la que le llamamos DRE (por las siglas en inglés de *“Distal Regulatory Element”*) y proponemos que es el sitio de unión de una proteína reguladora capaz de responder a los cambios en los niveles de di-GMP-c y que estamos buscando mediante una mutagénesis al azar utilizando el transposón mTn5. Además, se encontró que los reguladores globales IHF y H-NS regulan a *ecp*, como en EPEC y EHEC, de manera positiva y negativa, respectivamente, y que la presencia de IHF y CreR es necesaria aun en ausencia de H-NS. Comparando la formación de biopelícula de la cepa WT con un conjunto de mutantes, se determinó que CreR no es un regulador clave en la formación de biopelícula, pero su sobreexpresión la afecta negativamente.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Relevancia de los patógenos A/E

Las enfermedades diarreicas son causa de alta morbilidad y mortalidad alrededor del mundo en especial en niños menores de cinco años y particularmente en países de África sub-sahariana y el sur de Asia (Revisado en Croxen *et al.*, 2013). Black *et al.*, reportaron en 2010 un estudio en el que estimaron las causas principales de mortalidad infantil para 193 países, con particular énfasis en muertes neonatales y provocadas por enfermedades infecciosas, encontrando que de 8.795 millones de muertes en infantes que ocurrieron en 2008, el 68% fueron causadas por enfermedades infecciosas, siendo la diarrea la séptima causa de muerte en neonatos de 0-27 días y una de las más importantes en niños menores de 5 años de edad (**Figura 1**) (Black *et al.*, 2010).

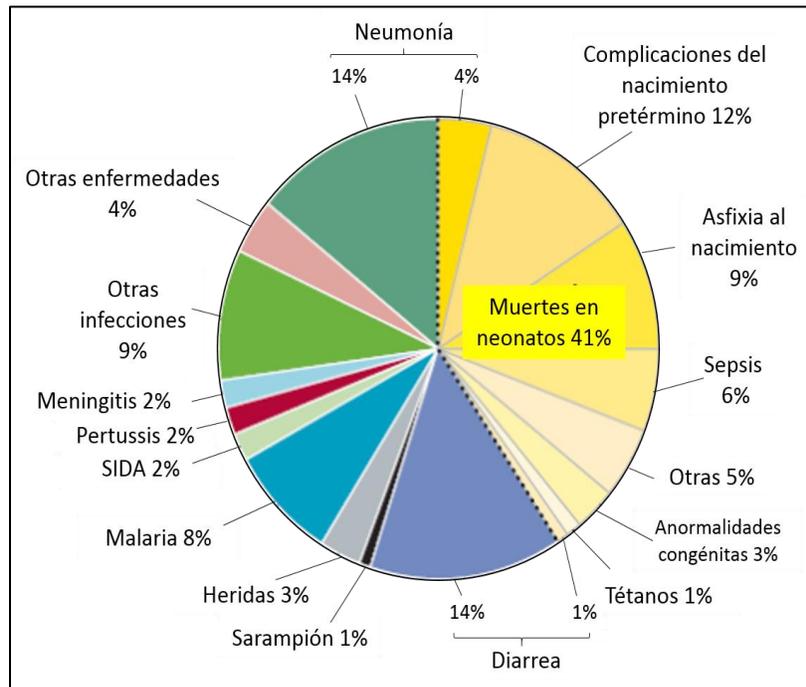


FIGURA 1 | Causas globales de muerte en niños. Los datos están separados en la mortalidad en neonatos de 0-27 días de nacidos (mostrado en la gama de color amarillo) y mortalidad en niños de 1 a 59 meses (Modificado de Black *et al.*, 2010).

En México, no existen reportes detallados acerca de las enfermedades diarreicas y sus agentes etiológicos, pero se sabe que las infecciones gastrointestinales agudas con presencia de diarrea de moderada a severa figuran entre las infecciones más frecuentes, siendo los grupos más vulnerables, los niños y los ancianos, que cursan con una deshidratación severa debido a la excesiva pérdida de electrolitos durante la enfermedad (Hernández *et al.*, 2011). En 2001 la Secretaría de Salubridad (SSA) reportó que las enfermedades gastrointestinales causadas por bacterias o parásitos ocupaban la decimocuarta causa de fallecimientos a nivel nacional y los estados con mayor incidencia eran: Chiapas, Oaxaca, Guanajuato, Veracruz, Puebla y D.F. (hoy CdMx). En 2008, el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) brindó 2 millones 188 consultas por enfermedades gastrointestinales y los estados con mayor incidencia fueron: Chihuahua, Coahuila, Jalisco, Michoacán, Guerrero y Oaxaca (Hernández *et al.*, 2011). Aunque la mortalidad ha descendido particularmente a partir de 1990 como consecuencia de la mejora general en las condiciones de vida de la población y el uso de la terapia de rehidratación oral, la incidencia es aún importante (Perdigón y Fernández, 2008).

Si bien hay muchos agentes etiológicos que causan diarrea, diferentes patotipos de *Escherichia coli*, entre los que se encuentran *E. coli* enteropatógena (EPEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), son de los mayores contribuyentes (Revisado en Croxen *et al.*, 2013, Kaper *et al.*, 2004).

EPEC es agente causal de diarrea en niños menores de 2 años de edad principalmente de países en vías de desarrollo, mientras que EHEC provoca colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico, una afección renal que puede ser fatal, tanto en niños como en adultos sobre todo en países desarrollados. Se han descrito dos subtipos de EPEC, las denominadas EPEC típicas (tEPEC) y atípicas (aEPEC) con base en la presencia o ausencia del plásmido pEAF ("*E. coli* adherence factor plasmid") (Ochoa y Contreras, 2011). En un estudio reciente denominado GEMS ("*global enteric multicenter study*") se encontró que las infecciones por aEPEC excedían a las causadas por tEPEC tanto en países en

desarrollo como en países desarrollados; sin embargo, las cepas tEPEC fueron asociadas con casos de diarrea más grave (de moderada a severa) en niños menores de 2 años. aEPEC es un grupo altamente heterogéneo y aunque presenta alta prevalencia incluso en niños asintomáticos, tEPEC se relaciona con un mayor riesgo de muerte en pacientes de 0-11 meses de edad. La incidencia de diarrea causada por tEPEC disminuye con la edad y las infecciones en adultos son raramente reportadas; esta aparente resistencia se ha atribuido a la pérdida de receptores específicos para EPEC y al desarrollo de inmunidad (Kotloff *et al.*, 2013).

EPEC y EHEC, así como algunas cepas de *E. coli* que infectan animales como cerdos y conejos (PEPEC y REPEC por sus siglas en inglés) y el patógeno de ratón *Citrobacter rodentium*, pertenecen a la familia de patógenos causantes de la lesión A/E (“*attaching and effacing*” o de adherencia y esfacelamiento), sobre la superficie de los enterocitos durante el proceso de colonización (**Figura 2**). Estas lesiones se caracterizan por la adherencia íntima al epitelio intestinal, la eliminación de las microvellosidades intestinales y la formación de una estructura rica en actina parecida a un pedestal donde se posa la bacteria y se mantiene adherida estrechamente (Revisado en Collins *et al.*, 2014). La mayoría de las proteínas asociadas a este fenotipo se encuentran codificadas en una isla de patogenicidad (IP) cromosomal denominada LEE (“*locus of enterocyte effacement*”).

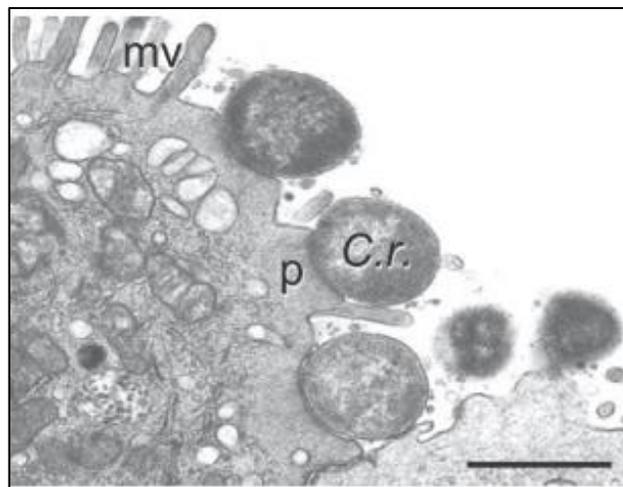


FIGURA 2 | Lesión A/E sobre la superficie de los enterocitos producida por *C. rodentium*.

Microfotografía electrónica de una sección de colon de ratón 14 días después de la inoculación oral con *C. rodentium* (*C.r.*) mostrando una distintiva lesión A/E caracterizada por la adherencia íntima de la bacteria (*C.r.*), la destrucción de las microvellosidades intestinales (mv) y las alteraciones de la superficie celular debido a la formación de una estructura rica en actina semejante a un pedestal (p). La escala de la barra es igual a 1 μm (Tomado de Yang *et al.*, 2010).

La IP LEE consta de 41 genes, contenidos en 35.6 kb insertados en el locus *se/C* en la cepa prototipo EPEC E2348/69, los cuales son suficientes para conferir la capacidad de producir el fenotipo A/E sobre células epiteliales en cultivo incluso a *E. coli* K-12 (McDaniel y Kaper, 1997). Otras cepas de patógenos A/E poseen, además de la región conservada del LEE (o región “core”), elementos genéticos adicionales como secuencias de inserción o IS por sus siglas en inglés o profagos que también codifican para factores de virulencia adicionales. En EHEC EDL933 el LEE se encuentra también insertado en *se/C* junto con el profago 933L, mientras que en otras cepas el sitio de inserción es *pheU* o *pheV* y puede ir acompañado de otras regiones o profagos que codifican para factores de virulencia adicionales (Schmidt, 2010). Los 41 genes del “core” están agrupados en 5 operones policistrónicos (*LEE1*, *LEE2*, *LEE3*, *LEE5* y *LEE4*), dos operones bicistrónicos (*LEE6* o *espGorf1* y *LEE7* o *grIRA*) y cuatro unidades transcripcionales (*etgA*, *cesF*, *map* y *escD*) (Gaytán *et al.*, 2016), los cuales codifican para reguladores transcripcionales, componentes estructurales del Sistema de Secreción Tipo 3 (SST3), proteínas efectoras y sus chaperonas, además de la proteína Intimina y su receptor Tir que es translocado a través del SST3 hacia la célula hospedera para establecer la adherencia íntima. La IP LEE de *C. rodentium* si bien no es idéntica a la de EPEC, está altamente relacionada en cuanto a estructura y función, incluyendo la conservación de todos los genes (**Figura 3**); sin embargo, su localización en el cromosoma difiere de *E. coli* ya que se encuentra en la vecindad de un gen que codifica para un transportador ABC (Deng *et al.*, 2001). La localización del LEE en diferentes regiones del cromosoma sugiere que fue adquirida por los patógenos A/E en eventos evolutivos independientes a la IP LEE de la cepa prototipo de EPEC. Además de los genes LEE, los patógenos A/E poseen un repertorio adicional de entre 27 y 62 genes localizados en otras islas de

patogenicidad y elementos genéticos móviles, como profagos y secuencias de inserción, que codifican proteínas efectoras conocidas como Nles (“*non-LEE-encoded effectors*”), que son sustrato del SST3 codificado en el LEE. Aunque éstas no son necesarias para la formación de la lesión A/E, su función e importancia durante la colonización bacteriana es diversa (Deng *et al.*, 2004, Pearson *et al.*, 2016).

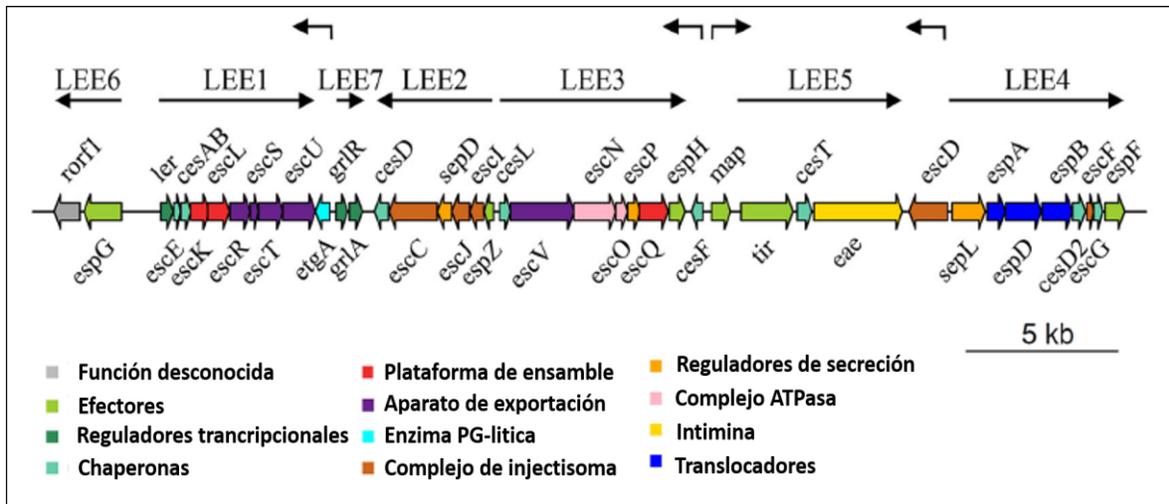
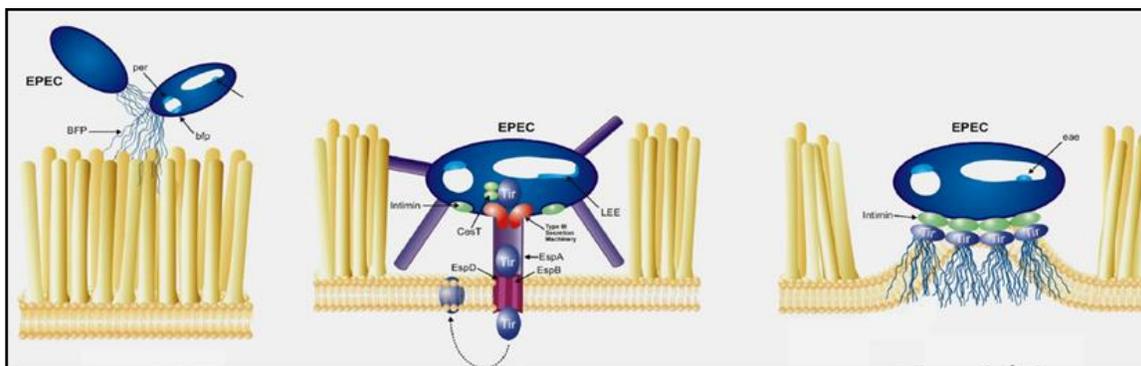


FIGURA 3 | Representación esquemática de la isla de patogenicidad LEE de EPEC E2348/69. Los genes están organizados en siete operones (*LEE1* al *LEE7*) y cuatro unidades transcripcionales (*etgA*, *cesF*, *map* y *escD*). Los genes se encuentran indicados con un color diferente según su categoría funcional (Tomado de Gaytán *et al.*, 2016).

Una vez translocados, los efectores subvierten múltiples vías de señalización en la célula hospedera alterando varios procesos como la polimerización de actina, la integridad de las uniones estrechas (“*tight junctions*”), apoptosis, tráfico endosomal, fagocitosis y respuesta inmune innata, así como el recambio de las células epiteliales reduciendo así la pérdida de la adhesión. Sin Tir, Intimina o un SST3 funcional, *C. rodentium* no es virulenta y su dinámica de colonización es similar a las cepas comensales de *E. coli* (Deng *et al.*, 2004).

Otros determinantes de virulencia de *C. rodentium* que han sido menos estudiados son los sistemas de secreción adicionales como SSTI, SSTII y SSTVI, adhesinas fimbriales y no fimbriales (como LifA), entre otros (Petty *et al.*, 2009).

La formación de la lesión A/E (**Figura 2**) se lleva a cabo en tres estadios principalmente (**Figura 4**). El primero es llamado de “adherencia inicial” en el que destaca la participación de fimbrias como es el caso de BFP (“*bundle-forming pilii*”) para EPEC. El segundo es el de “transducción de señales” en el que a través del SST3 se translocan las proteínas efectoras al citosol de la célula eucariote, las cuales conducen, entre otras alteraciones, a la reorganización del citoesqueleto, la disrupción de la barrera intestinal y la reabsorción de las microvellosidades intestinales. El tercer estadio es el de “adherencia íntima” establecida por dos proteínas codificadas en LEE, la Intimina que es una proteína de superficie de la bacteria y Tir (“*Translocated Intimin receptor*”) que es una proteína efectora translocada a la célula hospedera a través del SST3. Tir se inserta en la membrana de la célula eucariote exponiendo al exterior la región que interactúa con la Intimina, mientras que a través de su extremo carboxilo terminal promueve la polimerización localizada de actina por tres diferentes vías que convergen en la activación del factor neural del síndrome de Wiskott-Aldrich (N-WASP) y, por tanto, de la nucleación dependiente del complejo proteico regulador de actina 2/3 (Arp2/3) para dar inicio a la formación de la lesión A/E (Donnenberg y Kaper, 1992; Wales *et al.*, 2005; Lai *et al.*, 2013).



1. Adherencia inicial

**2. Translocación de efectores/
Transducción de señales**

3. Adherencia íntima

Figura 4 | Etapas del establecimiento del patógeno y la formación de la lesión A/E. 1. Adherencia inicial. Las bacterias de manera individual o como agregados se unen a las células epiteliales valiéndose de adhesinas, en el caso de EPEC la fimbria BFP (*bundle-forming pilus*) se asocia con el fenotipo conocido como adherencia localizada. BFP está codificado en el plásmido

pEAF presente en las cepas típicas de EPEC y su expresión es regulada por el activador transcripcional PerA codificado por el operón *per* en el mismo plásmido. La adhesión de otros patógenos A/E está mediada por otras adhesinas fimbriales. **2. Translocación de efectores.** Mediante del SST3 codificado en la IP LEE se lleva a cabo la translocación de proteínas efectoras de la bacteria hacia la célula hospedera, tales como Tir y varios otros efectores que subvierten diferentes funciones de la célula. **3. Adherencia íntima.** Una vez translocada, Tir se inserta en la membrana eucariote exponiendo un asa en la superficie de la célula que funciona como el receptor de la proteína Intimina, una proteína de membrana externa también codificada por el LEE. Esta interacción focaliza el rearrreglo del citoesqueleto de actina mediado por el extremo carboxilo de Tir, dando lugar a la formación de estructuras parecidas a una copa-pedestal sobre las cuales la bacteria se mantiene unida estrechamente (Modificado de DeVinney *et al.*, 1999, www.helmholtz-hzi.de/en).

1.2 *Citrobacter rodentium* como modelo de estudio

C. rodentium es una bacteria Gram-negativa, miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, altamente infecciosa que causa colitis e hiperplasia colónica transmisible en ratón (TMCH). Su genoma consiste de un cromosoma circular de 5.3 Mb y cuatro plásmidos (pCROD1 al 3 y pCRP3) y está genéticamente relacionada a los patotipos de *E. coli* EPEC y EHEC pertenecientes a la familia A/E, compartiendo con éstos alrededor del 67% de sus genes (Petty *et al.*, 2009).

C. rodentium fue primeramente descrito en la década de 1960, cuando se reportaron dos brotes de diarrea en colonias de ratones de laboratorio en dos continentes diferentes. En ambos casos, la diarrea estaba asociada a alta morbilidad y mortalidad y se acompañaba por un engrosamiento del colon. En Estados Unidos la cepa aislada fue nombrada *Citrobacter freundii*, y en Japón fue clasificada como *Escherichia coli* Ex30 que también es conocida como MPEC (“*Mouse-pathogenic E. coli*”). Posteriormente, se registró otro brote en Estados Unidos en el cual el agente causal provocaba prolapso rectal pero sin la presencia de diarrea. Con base en la relación genética que había entre las cepas de *C. freundii* atípicas y MPEC, se reclasificaron en una especie diferente que hoy conocemos como *C. rodentium* (Mundy *et al.*, 2005).

Las múltiples características que comparte *C. rodentium* con EPEC y EHEC, y su capacidad para infectar un modelo animal pequeño como lo es el ratón, produciendo fenotipos semejantes a los observados con los patógenos A/E en el humano, han convertido a la infección por *C. rodentium* en el modelo más usado para el estudio de los mecanismos de virulencia de los patógenos A/E (Borenshtein *et al.*, 2008, Crepin *et al.*, 2016).

Durante la infección por *C. rodentium* el ratón desarrolla colitis causando una disbiosis pronunciada caracterizada por un sobrecrecimiento del patógeno que alcanza a constituir del 1-3% de la microbiota intestinal total (10^9 UFC's por gramo de heces en el colon), así como hiperplasia del colon y heces suaves entre los días 7-14 post-infección. Inicialmente, *C. rodentium* coloniza el ciego, posteriormente el colon y el recto. La severidad de la enfermedad inducida por *C. rodentium* es influenciada por la edad y las características genéticas del hospedero; en algunos ratones la infección es fatal, mientras que en otros la respuesta del hospedero limita la inflamación del ciego y del colon y elimina al patógeno. Los ratones lactantes son más susceptibles a la infección presentando alta mortalidad, mientras que en los adultos la infección suele ser subclínica (Wales *et al.*, 2005). Para colonizar *C. rodentium* requiere superar la competencia que por fuentes nutricionales imponen bacterias de la microbiota residente del lumen intestinal. Diversos factores de virulencia le permiten a *C. rodentium* acceder a nichos cercanos a la superficie del intestino evitando dicha competencia; sin embargo, el pico de carga bacteriana empieza a declinar después de la primera semana ya que *C. rodentium* induce la generación de respuesta humoral, mayoritariamente de anticuerpos IgG dirigidos contra factores de virulencia codificados en la IP LEE como la Intimina, y dicha opsonización determina que las bacterias virulentas sean eliminadas por neutrófilos. Por su parte, la inactivación de la expresión de los genes de virulencia codificados por el LEE en etapas tardías de la infección, promueve la relocalización de parte de la población de *C. rodentium* a la luz intestinal donde es eliminada por la competencia con las bacterias comensales residentes (Kamada *et al.*, 2015).

Después de la primera semana de infección, la eliminación de la bacteria también se favorece conforme las células epiteliales colonizadas son desprendidas hacia el lumen intestinal hasta que el patógeno ya no aparece en las heces 2 a 3 semanas post-infección. Las bacterias que son eliminadas durante el pico de infección son altamente infecciosas y son diseminadas fácilmente vía coprofagia a otros ratones sanos (Collins *et al.*, 2014).

El estudio de los mecanismos de patogenicidad en condiciones de laboratorio puede cambiar con respecto al comportamiento de la bacteria *in vivo* y en la interacción con su hospedero. Por ejemplo, se ha visto que aquellas bacterias adaptadas al hospedero muestran una alta expresión de los genes del SST3 en comparación con las bacterias cultivadas en el laboratorio, además de que las bacterias provenientes de una infección en ratón presentan un alto grado de adherencia cuando se analizan *in vitro*, lo que sugiere que las células cultivadas de *C. rodentium* podrían requerir señales provenientes de la microbiota o del propio hospedero para regular la patogénesis y proceder con la colonización (Collins *et al.*, 2014).

El modelo de infección *C. rodentium*-ratón es una herramienta fundamental para investigar *in vivo* los mecanismos que permiten el establecimiento de una infección por un patógeno A/E, y por extrapolación proponer similitudes para los patógenos A/E de humanos. Ha permitido también realizar estudios sistemáticos para definir de manera integral la función de los genes que conforman la IP LEE, demostrando su utilidad para estudios similares que permitan evaluar el papel de grupos de genes con funciones en apariencia redundantes o mecanismos de patogenicidad que se encuentran conservados entre los patógenos A/E (Deng *et al.*, 2004). Además, este modelo permite estudiar el efecto que en la infección tienen modificaciones genéticas o inmunológicas del hospedero, o alteraciones en la composición de la microbiota residente (Wales *et al.*, 2005).

1.3 Fimbrias

La adhesión a la superficie de las células hospederas es un paso determinante durante la colonización del hospedero y el establecimiento de una infección (revisado en Proft y Baker, 2009). Este proceso es mediado por adhesinas que se encuentran expuestas en la superficie de las bacterias (Smyth *et al.*, 1996). Estas estructuras, que se comportan como lectinas, reconocen receptores específicos de naturaleza glicoproteica o glicolipídica sobre las células hospederas, lo que les puede conferir tropismo por un tejido específico. Las adhesinas también pueden unirse a elementos de la membrana basal o proteínas de la matriz extracelular, como colágeno, fibronectina y laminina (revisado en Proft y Baker, 2009).

En particular las fimbrias (del latín para hilo/fibra) o pili (del latín para pelo), son importantes factores de virulencia en especial en bacterias causantes de infecciones de los tractos genitourinario y gastrointestinal, por lo que se han estudiado como blancos potenciales para el desarrollo de vacunas. Si bien las fimbrias se describen como organelos adhesivos, también se ha visto que participan en procesos como: transferencia de DNA, unión de bacteriófagos, formación de biopelículas, agregación interbacteriana, invasión de células hospederas y “*twitching motility*”. Son estructuras filamentosas de longitud variable que se extienden fuera de la superficie celular bacteriana, generalmente tienen una adhesina localizada en la punta y están compuestas de cientos a miles de subunidades de la pilina cuyo peso molecular va de 15 a 25 kDa (revisado en Proft y Baker, 2009).

Las fimbrias se descubrieron en bacterias Gram-negativas como receptores para bacteriófagos, desde entonces han sido motivo de intenso estudio, en especial su estructura, ensamble, modificaciones post-traduccionales, regulación de la expresión y su papel en la enfermedad (Smyth *et al.*, 1996).

1.3.1 Clasificación de acuerdo a la vía de ensamble

Las fimbrias de las bacterias Gram-negativas pueden ser clasificadas en cuatro grupos de acuerdo a su vía de ensamble.

- a) Vía chaperona-acomodador (CU, por sus siglas en inglés).** Los mejor caracterizados son la fimbria tipo I y el pilus P. La fimbria tipo I es la más prevalente en *E. coli* uropatógena (UPEC) y contribuye significativamente a las cistitis. Los pili P son factores de virulencia críticos en casos de pielonefritis. Durante su ensamble, las pilinas son transportadas hacia el espacio periplásmico a través de la vía general de secreción y se unen a una chaperona específica que las asiste en el plegamiento y previene el ensamble prematuro de las subunidades. El complejo pilina/chaperona es entonces entregado a la proteína acomodadora o “*usher*” en la membrana externa, el cual sirve como plataforma para el ensamble del pilus (**Figura 5**) (Hospenthal *et al.*, 2017). Los genes involucrados en la biogénesis de fimbrias por esta vía usualmente están agrupados en operones y codifican al menos para la subunidad principal, la proteína acomodadora o *usher*, la chaperona y, en algunos casos, adhesinas accesorias, reguladores transcripcionales o proteínas adicionales de función hasta ahora desconocida (Busch y Waksman 2012).

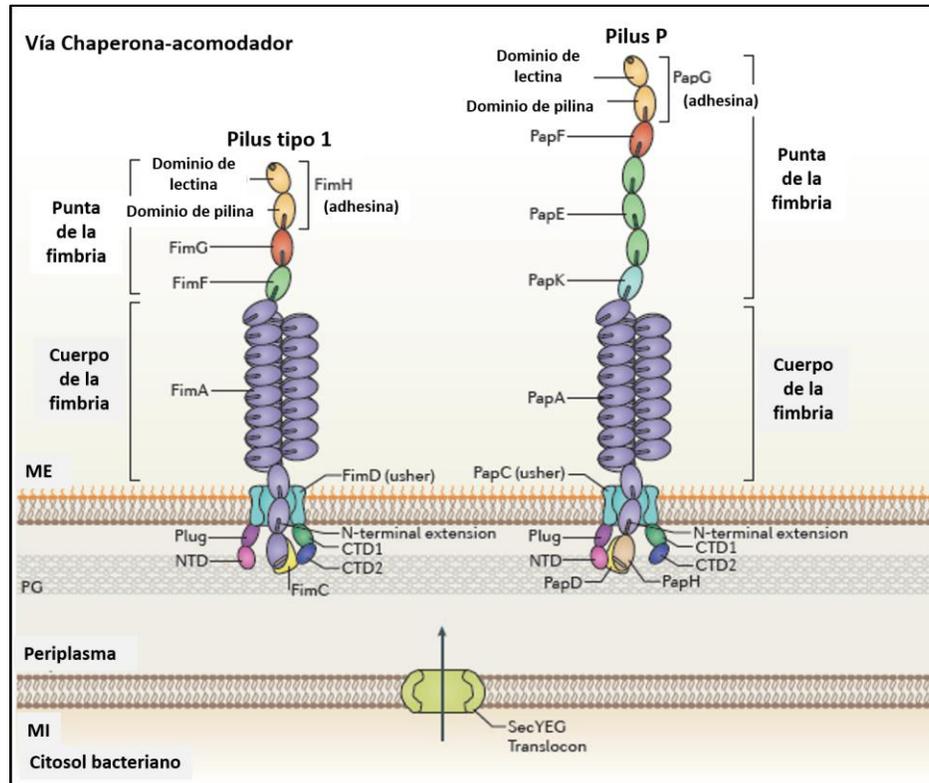


Figura 5 | Representación esquemática de la estructura y biogénesis de la fimbria tipo I y el pilus P por la vía chaperona-acomodador (Modificado de Hospenthal *et al.*, 2017).

b) Vía de secreción general (Pili tipo IV). En adición a la participación en la adhesión a la célula hospedera y la formación de biopelícula, también se asocian con la adquisición de DNA durante la transformación, la transducción de fagos y una forma de movimiento independiente de los flagelos conocida como “movilidad contráctil” o “*twitching motility*”. Estos atributos se basan en la capacidad de la fimbria tipo IV de retraerse generando una significativa fuerza mecánica. Las subunidades del pilus tipo IV son sintetizadas como prepilinas con un péptido líder hidrofílico con una glicina al final la cual es escindida por una peptidasa líder específica. La biogénesis del pilus tipo IV involucra 12 o más proteínas que están conservadas en una gran cantidad de especies bacterianas y cuyos genes, dependiendo del organismo, forman o no largos operones. Dentro de las proteínas que son requeridas para su ensamble se encuentran: a) la

subunidad mayor “pilina”, b) una peptidasa específica en la membrana interna, c) una ATPasa específica que aporte la energía para el ensamble, d) una proteína integral de membrana interna que reclute a la ATPasa del citoplasma, y e) una proteína de membrana externa “secretina” necesaria para que el pilus emerja sobre la superficie de la bacteria (Revisado en Proft y Baker, 2009).

c) Vía de nucleación/precipitación extracelular. Mediante esta vía se ensambla el curli, que son fibras enroscadas encontradas en la superficie de algunas bacterias entéricas. La subunidad mayor se llama CsgA, también conocida como curlina, carece de homología estructural con otras pilinas conocidas; sin embargo, comparte algunas características bioquímicas y propiedades estructurales con las fibras amiloides eucariotas encontradas en algunas enfermedades neurodegenerativas. A diferencia de las fibras amiloides eucariotas, el curli es producido por procesos altamente regulados. El curli ha sido implicado en formación de biopelícula, agregación celular, adhesión a la célula hospedera, invasión y como potente inductor de la respuesta inflamatoria. El curli se une a la proteína de matriz extracelular fibronectina. CsgA (curlina) y CsgB son secretadas como proteínas solubles al medio extracelular con ayuda de una lipoproteína de membrana externa CsgG, este proceso requiere las proteínas accesorias CsgE y CsgF que facilitan la secreción y el ensamble de CsgA. Fuera de la célula CsgB nuclea a CsgA en una fibra (Revisado en Proft y Baker, 2009).

d) Vía chaperona-acomodador alterna. Los pili ECP (*E. coli common pilus*), CS1, CS2 y CFA, son ejemplos de pili ensamblados por esta vía. Al igual que para el sistema clásico, se requieren principalmente cuatro proteínas para el ensamble de estas fimbrias: la subunidad principal, la chaperona, la proteína *usher* y una adhesina; sin embargo, la chaperona, a diferencia de la vía clásica, mantiene a la pilina en un estado semi-plegado previo al ensamble (Proft y Baker, 2009; Pakharukova *et al.*, 2015).

1.3.2 Mecanismos de regulación de la expresión de fimbrias

Se han descrito diversos mecanismos que controlan la expresión de las fimbrias principalmente a nivel transcripcional. Los mecanismos mejor caracterizados pueden ser clasificados en distintas categorías para fines ilustrativos; sin embargo, comúnmente se pueden encontrar sistemas de regulación complejos donde la expresión de una fimbria requiere un conjunto de factores actuando simultáneamente. A continuación se ejemplifican algunos de estos mecanismos.

- Elementos invertibles de DNA. Este es el caso de la fimbria tipo 1, donde la transcripción del operón *fim* depende de la orientación de un segmento de DNA invertible (*fimS*) en su región reguladora, comúnmente conocido como el “*switch fim*” y cuya orientación es mediada principalmente por dos recombinasas sitio específicas llamadas FimB y FimE. *fimS* contiene al promotor y está flanqueado por dos secuencias repetidas invertidas de 9 pb. En la orientación conocida como *on*, el promotor se encuentra en sentido de los genes *fim* y la transcripción puede llevarse a cabo; el sentido contrario se conoce como *off* y en este estado la transcripción no puede ser efectuada. FimE principalmente media la inversión hacia el estado *off*, mientras que FimB puede cambiar la orientación en ambas direcciones. Otros ejemplos de elementos invertibles se encuentran en la fimbria Mrp de *Proteus mirabilis* y Kpc de *Klebsiella pneumoniae* (revisado en Clegg *et al.*, 2011).
- Metilación de DNA. Un ejemplo bien estudiado es la influencia de la metilación del DNA en el control de la expresión de la fimbria Pap de UPEC. Se ha descrito que cuando en la célula hay altos niveles de Lrp (“*Leucine-responsive Regulatory Protein*”) y bajas concentraciones del PapI (regulador positivo específico del operón *pap*), Lrp se une eficientemente a la región GATC en sitios cercanos al promotor (proximal) y esto resulta en una inhibición de la transcripción. Esta unión solo sucede cuando los sitios

GATC no están metilados y entonces Lrp puede competir con la DNA adenina metilasa por los sitios de unión. Cuando hay bajas concentraciones de Lrp y en presencia de PapI, Lrp se une a los sitios distales GATC al promotor Pap, impidiendo que se una la metilasa pero permite la metilación del sitio proximal; en este estado si puede llevarse a cabo la transcripción. Otros operones fimbriales regulados por este mecanismo son la fimbria K88 o F4 y K99 de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), las cuales utilizan proteínas homólogas a las descritas para Pap (revisado en Clegg *et al.*, 2011).

- Sistemas que involucran la participación de di-GMP-c. La regulación de *fim* en *K. pneumoniae* presenta diferencias importantes, como la presencia de FimK, una fosfodiesterasa (FDE) cuyo gen se encuentra localizado inmediatamente corriente abajo del operón. La delección de *fimK* conduce a un incremento en la expresión de la fimbria tipo 1 sobre la superficie de la bacteria. En la regulación de otras fimbrias como Mrk de *K. pneumoniae* (de la que se hablará más adelante) y Sfa de *Vibrio cholerae*, también se ha descrito estar involucrado el di-GMP-c (ver más adelante **di-GMP-c y su relación con la virulencia**) (Wilksch *et al.*, 2011).
- Reguladores de unión a DNA adicionales. Una amplia variedad de proteínas se han descrito como reguladores involucrados en los mecanismos complejos de regulación de estas estructuras. Desde reguladores globales como IHF, HU, H-NS y Lrp, hasta reguladores específicos de cada sistema comúnmente codificados dentro del mismo operón fimbrial o en regiones cercanas a éste. Por citar algunos ejemplos, la fimbria BFP de EPEC requiere de PerA, un regulador transcripcional de la familia AraC que se encuentra codificado en el mismo plásmido que el operón *bfp* (Martínez-Laguna *et al.*, 1999). También la expresión óptima de ECP de EPEC es regulada por EcpR, que es el primer gen del operón *ecp* en *E. coli* (Martínez-Santos *et al.*, 2012).

1.4 Operones fimbriales de *C. rodentium*

C. rodentium tiene un total de 19 operones fimbriales contenidos en su genoma, aunque a la fecha no se conoce si todos se expresan o son funcionales, incluso algunos se encuentran incompletos o contienen pseudogenes (Petty *et al.*, 2009). Los operones funcionales que se han relacionado con la colonización del tracto gastrointestinal del ratón codifican para la fimbria Gcf (“*Gut colonization factor*”), descrita en nuestro grupo de trabajo (Caballero *et al.*, 2015), la fimbria K99 (K99-“*like factor involved in Citrobacter colonization*”) (Hart *et al.*, 2008), y la fimbria CFC (“*Colonization factor Citrobacter*”) (Mundy *et al.*, 2003) (**Tabla 1**).

Tabla 1 | Operones fimbriales presentes en el genoma de *Citrobacter rodentium*.

Identificación CDS	Genes	Descripción ^c	Ortólogos en EPEC	Ortólogos en Sakai
1 ROD_01101–01121	<i>hofCB-ppdD</i>	Fimbria tipo IV	E2348_C_0109–0111	ECs0110–0112
2 ROD_03631–03691	<i>gcfFGABCDE</i>	Fimbria chaperona-usher (Fimbria Gcf)		
3 ROD_03351–10951–11021	<i>crl csgGFEDBAC</i>	Fimbria Curli	E2348_C_0233, 1129–1136	ECs0267, 1414–1412
4 ROD_11771–11781		Fimbria chaperona-usher ^e		
5 ROD_18141–18181	<i>lpfEDCBA</i>	Fimbria polar larga (fimbria tipo I chaperona-usher)		
6 ROD_19341–19381		Fimbria chaperona-usher		
7 ROD_22311–22341		Fimbria tipo IV chaperona-usher		
8 ROD_27771–27801		Fimbria tipo IV chaperona-usher		
9 ROD_29101–29191	<i>fimBEAICDFG HK</i>	Fimbria tipo I chaperona-usher	E2348_C_4619–4627 ^a	ECs5271–5279 ^a
10 ROD_29201–29241	<i>ecpABCDE</i>	Fimbria chaperona-usher alterna	E2348_C_0247–0249 ^b	ECs0321–0323 ^b
11 ROD_29351–29391		Fimbria tipo IV chaperona-usher ^d		
12 ROD_34961–35021		Fimbria chaperona-usher		
13 ROD_41241–41291		Kfc (K99 like factor) involucrado en la colonización de <i>C. rodentium</i> Fimbria chaperona-usher		
14 ROD_41381–41551	<i>flp1 rcpC A tadZABCD tadVEFG</i>	Locus de adherencia estrecha (tad) (fimbria tipo IV)		
15 ROD_44281–44321	<i>hofMNOPQ</i>	Fimbria tipo IV	E2348_C_3635–3639	ECs4233–4237
16 ROD_46461–46571	<i>cfcABCDEFG HIJPV</i>	CFC (<i>colonization factor Citrobacter</i>) Fimbria tipo IV		
17 ROD_50611–50651		Fimbria tipo IV chaperona-usher ^d		
18 ROD_p1161–p1201		Fimbria chaperona-usher		
19 ROD_p1291–p1301		Fimbria tipo I chaperona-usher ^{d,e}		

Tabla 1 | Operones fimbriales presentes en el genoma de *Citrobacter rodentium*. Se indican el número de identificación y la nomenclatura de los operones implicados en la biosíntesis de fimbrias presentes en *C. rodentium*, su vía de ensamble y los ortólogos en EPEC y EHEC. ^a *fimK* no se encuentra en EPEC y EHEC. ^b No se reconocen como ortólogos de ROD_29231 o ROD_29241 debido a su bajo porcentaje de identidad. ^c Los operones fimbriales chaperona-usher han sido agrupados en clados y subclados de acuerdo al esquema de clasificación de la proteína fimbrial acomodadora o *usher*. ^d Contiene pseudogenes. ^e Parte del operón se perdió (Modificado de Petty *et al.*, 2009).

1.5 La Fimbria ECP

La adhesión a los tejidos del hospedero es un proceso complejo y que involucra la participación de distintas adhesinas las cuales pueden actuar al mismo tiempo o en diferentes etapas de la infección, e incluso, son necesarias para el exitoso establecimiento de las bacterias comensales en distintos nichos.

En 2001 fue descrita por primera vez una fibra adhesiva extracelular que estaba asociada a cepas de *E. coli* que causaban meningitis y septicemia (NMEC) en recién nacidos, por lo cual fue llamada Mat (“*meningitis-associated and temperature-regulated*”) y la subunidad principal (producto del gen *yagZ*) fue llamada MatB (Pouttu *et al.*, 2001).

En 2007, se describió que una fimbria ortóloga de Mat estaba presente en el 96% de las cepas de *E. coli* que se analizaron, entre las que se encontraban cepas de la flora normal (NFEC) y representantes de los principales patotipos como EPEC, EHEC, ETEC, *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), UPEC, REPEC y *E. coli* patógena de aves (APEC). Debido a su aparente amplia distribución la llamaron “*E. coli common pilus*” (ECP), y a la subunidad principal EcpA (Rendón *et al.*, 2007).

Mediante ensayos de adherencia utilizando células HEp-2 y cultivos en diferentes medios y condiciones de crecimiento *in vitro*, se observó que no se requiere algún factor de la célula hospedera o del contacto celular para la expresión del pilus. En EHEC la expresión de ECP se ve favorecida por el crecimiento en DMEM (“*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*”) a 26°C y bajo una atmósfera de 5% de CO₂ (Rendón *et al.*, 2007). Mutantes en *ecpA* de NFEC y EHEC son deficientes en la adherencia a células epiteliales (Rendón *et al.*, 2007), al igual que una mutante de UPEC que a la vez forma menos biopelícula y presenta defectos en la invasión del urotelio de la vejiga del ratón comparada con la cepa silvestre (Saldaña *et al.*, 2014). La producción de ECP a partir de un plásmido promueve la formación de

biopelículas a cepas que de manera natural no lo hacen, lo que apoya su participación en el desarrollo de este fenotipo (Lehti *et al.*, 2010).

Aunado a lo anterior, ECP tiene particularidades en su expresión que pueden ser relevantes en el ciclo de vida de la bacteria fuera de su hospedero.

Es bien conocido que los alimentos contaminados son una fuente de infección de ciertas bacterias patógenas y en especial de cepas diarreogénicas. A este respecto, en un estudio en 2011 donde se evaluaron varios factores de virulencia importantes para la colonización de EHEC, se reportó que ECP es una de las estructuras de superficie de esta bacteria que están involucradas en la colonización de los estomas de hojas de plantas comestibles, en este caso de espinacas que son con frecuencia la causa de brotes de EHEC sobre todo en los EU. Se sugirió que la colonización de los estomas puede constituir una estrategia mediante la cual EHEC sobrevive en un microambiente rico en nutrientes y protegida de daños externos, de esta manera convirtiendo a los alimentos en una potencial fuente de contaminación para los humanos (Saldaña *et al.*, 2011). Posteriormente se observó que ECP se une a residuos de arabinosa que son abundantes en la pared de las células vegetales, lo que correlaciona con la asociación de bacterias patógenas que expresan ECP con las hojas de plantas comestibles como las espinacas y la lechuga (Rossez *et al.*, 2014).

Las proteínas involucradas en la biogénesis de ECP están codificadas por el operón *ecpRABCDE* en *E. coli* (**Figura 7**). El producto del gen *ecpA* es la subunidad principal, una proteína de ~18 kDa. EcpB y EcpE son chaperonas, EcpC la proteína *usher*, y EcpD es la adhesina que se posiciona en la punta del pilus. A través de microscopía electrónica de barrido (SEM) se ha visto que los pili son fibras delgadas flexibles que se extienden sobre la superficie de la bacteria y tienen una alta tendencia a agregarse ordenándose paralelamente y formando superestructuras de ~12 nm de grosor (cada fibra mide ~6.5 nm de ancho por ~1 µm de longitud). Aunque hay similitud con las fimbrias ensambladas por la vía

chaperona-*usher*, el mecanismo de ensamble es por la vía alterna, además de que posee otras características que la distinguen del resto de fimbrias CU, por ejemplo, se ha visto que EcpD puede formar fimbrias de manera independiente a EcpA (**Figura 6**) (Garnett *et al.*, 2012, Pakharukova *et al.* 2015).

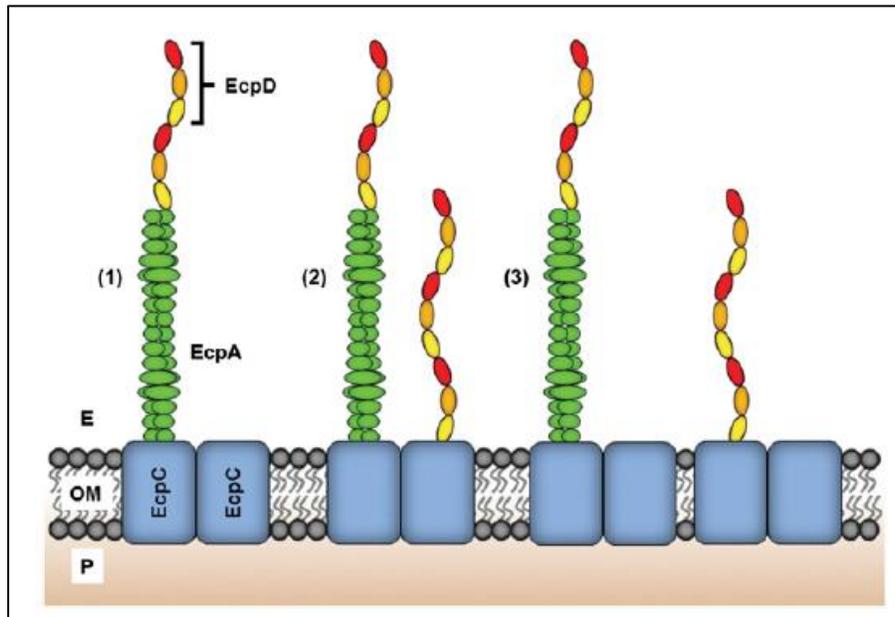


Figura 6 | Modelo de la arquitectura de ECP en *E. coli*. Se han propuesto diferentes modelos de la biogénesis y estructura de ECP. 1) Una sola fibra es exportada a través de un poro de un dímero de EcpC. El pilus está compuesto de EcpD polimerizada en la punta y EcpA en el resto de la fimbria. 2) Una fimbria idéntica al modelo 1 y una fibra de EcpD, ambas polimerizadas sobre un dímero de EcpC. 3) Como el modelo 2, pero las fibras son exportadas a través de dímeros separados de EcpC. E, espacio extracelular; OM, membrana externa, P, espacio periplásmico (Modificado de Garnett *et al.*, 2012).

La importancia del papel biológico de ECP puede extenderse más allá de *E. coli*, porque homólogos a *ecpA* han sido encontrados en *K. pneumoniae* (Alcántar-Curiel *et al.*, 2013), *Shigella boydii*, *Aeromonas hydrophila*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis* y *C. rodentium* (**Figura 7**).

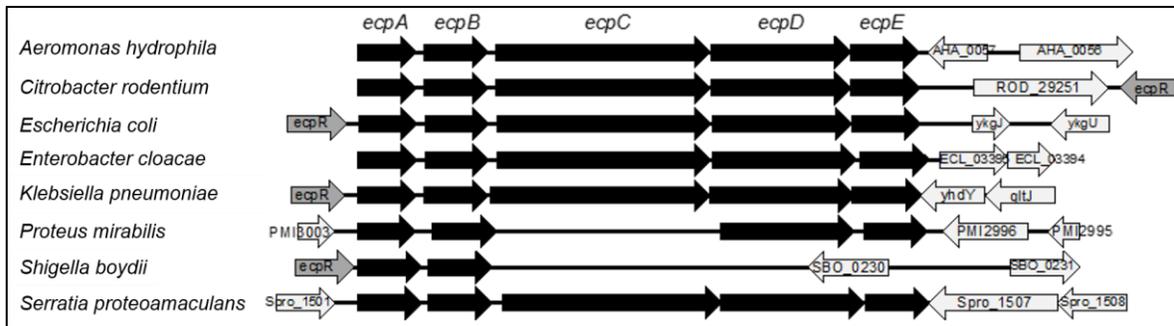


Figura 7 | Genes ortólogos de *ecp* de EPEC encontrados en otras bacterias. Esquema comparativo de los genes del operón *ecp* encontrados en diferentes bacterias. La figura muestra la representación completa de todo el operón fimbrial *ecpRABCDE* de *E. coli* y su comparación con sus ortólogos en otras bacterias de importancia médica (Modificado de Martínez-Santos, datos no publicados).

1.6 di-GMP-c y su relación con la virulencia

El di-GMP-c (*bis*-(3'-5') *cyclic-di-guanosine-monophosphate*) es una molécula soluble de señalización bacteriana que es clave en el cambio del estado planctónico al estado sésil. De manera general, este segundo mensajero, estimula la biosíntesis de adhesinas y exopolisacáridos que son importantes en la formación de biopelículas e inhibe la movilidad. Además de esto, está implicado en la regulación de la expresión de factores de virulencia en bacterias patógenas (**Figura 8**) (Hengge, 2009).

El di-GMP-c es sintetizado por diguanilato ciclasas (DGCs) a partir de dos moléculas de GTP y es degradado por fosfodiesterasas específicas (FDEs) que lo convierten en "5'-phosphoguananylyl-(3'-5')-guanosine" (pGpG), el cual posteriormente es escindido a dos moléculas de GTP. Las DGCs se caracterizan por la presencia del dominio GGDEF (llamado así por la secuencia de aminoácidos del motivo que es una parte esencial del sitio activo de la enzima); la actividad de muchas de estas enzimas puede ser inhibida por producto a través de la unión del di-GMP-c a un sitio secundario (sitio-I). Por su parte, las FDEs

rodentium posee 8 proteínas con dominios GGDEF, 11 proteínas con dominios EAL, una con un dominio HD-GYP y 7 más que poseen un dominio GGDEF y uno EAL (Figura 9).

Dominio GGDEF	Dominios GGDEF-EAL	Dominio EAL	Dominio HD-GYP	Dominio PilZ
ROD_04291	ROD_15471	ROD_05121	ROD_35151	ROD_18241 YcgR PilZ
ROD_12671	ROD_17141	ROD_13481		ROD_42741 BcsA celulosa sintasa
ROD_15211	ROD_22031	ROD_15371		
ROD_15461	ROD_24461	ROD_18531		
ROD_16621	ROD_28141	ROD_23071		
ROD_20351	ROD_42781	ROD_29191		
ROD_25541	ROD_45641	ROD_29251		
ROD_48701		ROD_29321		
		ROD_34461		
		ROD_42821		
		ROD_p1231		

Figura 9 | Proteínas relacionadas con la señalización por di-GMP-c encontradas en *C. rodentium*. Para la búsqueda de estas proteínas se utilizó la herramienta computacional “*Biology Branch*” de NCBI y KEGG (“*Kyoto Enciclopedia of Genes and Genomes*”). Los genes marcados en azul son aquellos encontrados con NCBI pero no con KEGG. El gen marcado en rojo corresponde a *creR* (ver **antecedentes**). Los genes en amarillo contienen un dominio PilZ según la herramienta de NCBI y se encuentran conservados en *E. coli* (Amikan y Galperin, 2006).

Un módulo mínimo funcional para la señalización por di-GMP-c incluye una DGC, una FDE y un componente efector que une y responde directamente a la concentración de di-GMP-c, que a su vez activa o reprime un blanco generando una respuesta celular. A pesar de la aparente redundancia de proteínas relacionadas con el di-GMP-c, se ha planteado un paradigma de “alta especificidad local” en la señalización por di-GMP-c por distintas DGCs o FDEs (Povolotsky y Hengge, 2015).

Los mecanismos por los cuales estas proteínas ejercen sus efectos, así como sus blancos directos empiezan a emerger. Hoy sabemos que la señalización por di-GMP-c opera a través de muchas y muy diversas familias de proteínas de unión a di-GMP-c (proteínas con dominios PilZ, factores de transcripción, proteínas con dominios GGDEF, EAL o HD-GYP enzimáticamente inactivos, y *riboswitches*) (Ryan *et al.*, 2012).

Un ejemplo bastante estudiado de la señalización por di-GMP-c es la síntesis de la fimbria tipo 3 (FT3, que es ensamblada por la vía chaperona-acomodadora) codificada por el operón *mrkABCDF* de *K. pneumoniae*, al cual se encuentra adyacente el gen *mrkJ* que codifica para una fosfodiesterasa con dominio EAL. MrkJ controla la producción de la fimbria tipo 3 de manera negativa, pues la mutación de *mrkJ* resulta en un incremento en la producción de la fimbria y la formación de biopelícula como resultado de la acumulación intracelular de di-GMP-c (Johnson y Clegg, 2010). La proteína efectora de este sistema encargada de responder a los niveles de di-GMP-c y de activar directamente el operón *mrkABCDF*, es el regulador transcripcional MrkH que posee un dominio PilZ de unión a di-GMP-c (Figura 10) (Wilksch *et al.*, 2011).

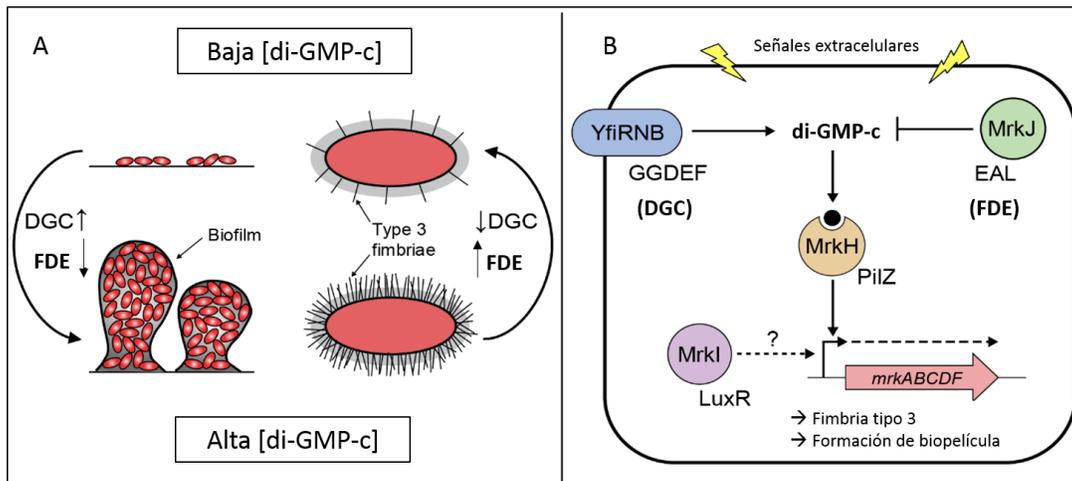


Figura 10 | Modelo del control de la expresión de la fimbria Mrk de *K. pneumoniae* mediado por di-GMP-c. MrkJ tiene un papel esencial en la formación de biopelícula de *K. pneumoniae*. Altas concentraciones de di-GMP-c promueven la formación de biopelícula (panel A), en este caso, a través de la activación transcripcional del operon *mrkABCDF* (panel B) dependiente de MrkH que detecta y une a di-GMP-c a través de su dominio PilZ y entonces es capaz de unirse a la región promotora de dicho operón. Bajos niveles de di-GMP-c promueven la dispersión de la biopelícula y el estado planctónico (panel A) a través del decremento de MrkH activo debido a la degradación de di-GMP-c por MrkJ (Tomado de Wilksch *et al.*, 2011).

2. ANTECEDENTES

2.1 El operón fimbrial *ecp* de EPEC

Debido a su aparente función como factor de colonización bajo diferentes condiciones ambientales y en diferentes nichos, ha sido de interés para nuestro grupo estudiar el mecanismo molecular que modula la expresión de ECP.

Además de los genes involucrados en la biogénesis de ECP, el operón está encabezado por el gen *ecpR* que codifica para el regulador transcripcional (**Figura 7**). EcpR es una proteína con un dominio HTH (*helix-turn-helix*) C-terminal de unión a DNA tipo LuxR, que actúa como regulador positivo de la transcripción del operón uniéndose a dos cajas TTCCT distantes localizadas río arriba del promotor de *ecp* (en adelante abreviado como *ecpAp*). La activación mediada por EcpR es asistida por IHF (*Integration Host Factor*) el cual es esencial para contrarrestar la represión conferida por H-NS (*Histone-like Nucleoid-Structuring protein*) sobre el *ecpAp*. Se sugiere que IHF genera cambios estructurales en la región reguladora del operón para facilitar la interacción de EcpR con el promotor y/o interferir o prevenir la formación de complejos represores por H-NS (Martínez-Santos *et al.*, 2012 y datos no publicados, Lehti *et al.*, 2013) (**Figura 11**). También se ha involucrado al regulador de respuesta RcsB como co-activador de la expresión de *ecp* en *E. coli* (Lehti *et al.*, 2012a), función que lleva a cabo a través de formar heterodímeros con EcpR (Pannen *et al.*, 2016).

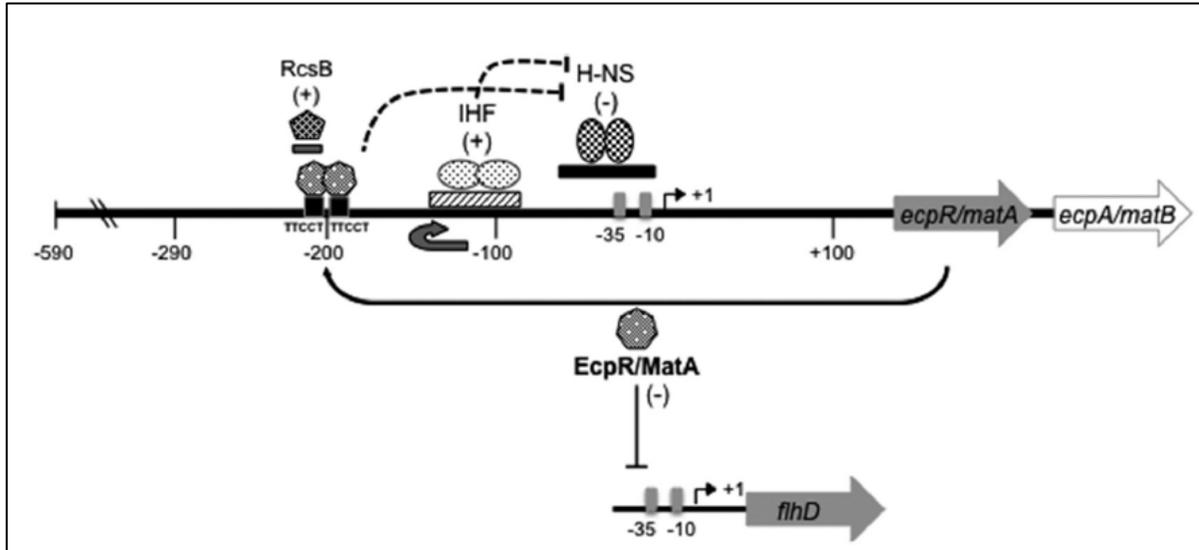


Figura 11 | Regulación transcripcional del operón *ecp* (*mat*) en EPEC y EHEC. *ecpR* (*matA*) codifica para EcpR/MatA, una proteína reguladora que contiene un dominio de unión a DNA tipo HTH que regula positivamente la expresión del operón *ecp* uniéndose a dos cajas TTCCT distantes, las cuales están localizadas en las posiciones -211 a -207 y -189 a -185 con respecto al sitio de inicio de la transcripción. IHF se une al DNA entre las cajas TTCCT y el promotor promoviendo la curvatura de esta región para acercar a EcpR al promotor y, a su vez, contrarrestar la represión ejercida por H-NS (Martínez-Santos *et al.*, 2012, Lehti *et al.*, 2013). En adición, RcsB, un regulador de respuesta que forma parte del sistema de señalización Rcs, también regula positivamente al *ecpAp* uniéndose a una secuencia que se sobrelapa con la caja TTCCT distal y formando heterodímeros con EcpR (Lenti *et al.*, 2012a, Pannen *et al.*, 2016, Martínez-Santos, datos no publicados). Además, EcpR/MatA actúa como un regulador negativo ya que reprime la expresión del operón maestro flagelar *flhDC* (Lehti *et al.*, 2012b) (Tomado de Martínez-Santos *et al.*, 2012).

2.2 El operón fimbrial *ecp* de *C. rodentium*

Como ya se mencionó, *C. rodentium* es un patógeno A/E que infecta ratones y que comparte con EPEC y EHEC muchos de los genes que codifican para factores de virulencia. En esta bacteria, el operón *ecp* conserva la organización de los genes estructurales *ecpABCDE* requeridos para la biogénesis de ECP, aunque éstos presentan divergencia significativa a nivel de secuencia ya que el porcentaje de identidad entre las proteínas para las que codifica es menor al 50% (**Figura 12**). Incluso la región reguladora con respecto a la de EPEC es totalmente distinta, lo que nos habla de diferencias claras e importantes derivadas de la evolución

paralela de este operón en estas bacterias. Otra diferencia interesante involucra al gen ortólogo *ecpR*, el cual no se encuentra al principio del operón sino corriente abajo del mismo y en sentido opuesto, además de separado del operón por el gen ROD_29251 que no está presente en *E. coli* (**Figura 12**). Con todo esto, no se puede extrapolar la regulación del operón *ecp* de *C. rodentium* con aquella del mismo operón en otros modelos bacterianos.

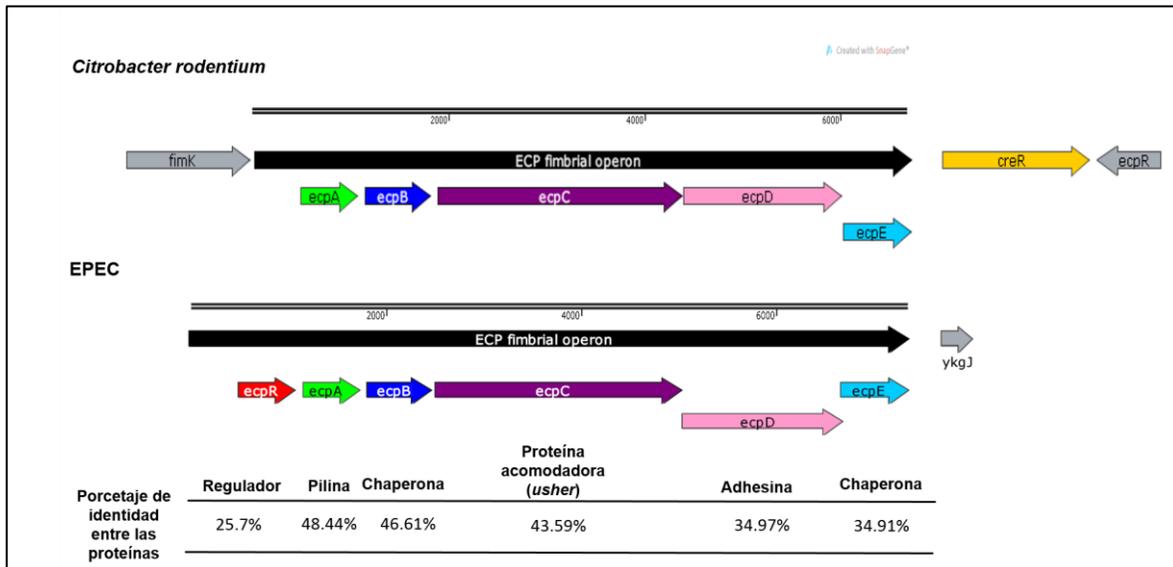


Figura 12 | Esquema comparativo de la organización del operón *ecp* en EPEC y *C. rodentium*. En la parte superior de la figura se esquematiza el operón *ecp* de *C. rodentium*. Está formado por los genes *ecpABCDE* (agrupados en color negro), el gen ortólogo de *ecpR* (coloreado en gris del lado derecho) se encuentra al final del operón, en sentido contrario y separado por el gen *creR* (ROD_29251) (coloreado en amarillo), en contraste con EPEC y otras bacterias donde forma parte del operón y se encuentra en el inicio del mismo (coloreado en rojo). SnapGene software (GSL Biotech; disponible en snapgene.com).

Con el propósito de analizar las implicaciones que estas diferencias tienen en la regulación y función de ECP, así como de estudiar su papel en un modelo animal de infección, se comenzó a caracterizar al operón *ecp* de *C. rodentium*.

Al igual que para EPEC, la expresión de *ecp* en *C. rodentium* se favorece en cultivos en DMEM crecidos en condiciones estáticas a 26°C; sin embargo, el gen *ecpR* no se expresa bajo estas condiciones y su eliminación no afecta la expresión del operón *ecp*, por lo tanto la expresión de *ecp* en *C. rodentium* es EcpR

independiente. Interesantemente, se encontró que el gen ROD_29251, renombrado como *creR* (por las siglas en inglés de “*Citrobacter rodentium ecp regulator*”), codifica para una fosfodiesterasa putativa que regula la expresión del operón de manera positiva, ya que en una cepa $\Delta creR$ no se expresa EcpA y mutaciones puntuales en su dominio EAL afectan la función de la proteína (Martínez-Santos, datos no publicados, Escalera-Maurer, Tesis de Licenciatura, 2012).

Mediante la técnica de “*primer extensión*” se determinó el sitio de inicio de la transcripción y se predijo la posición del *ecpAp* que corresponde a uno tipo σ^{70} . Utilizando un juego de diez variantes de fusiones transcripcionales de la región reguladora de *ecp* acopladas al gen reportero *cat* (*pecpA-1* a la 10), se determinó que la secuencia entre las posiciones -407 y -334, con respecto al inicio de transcripción, es esencial, ya que su eliminación abatió por completo la expresión del *ecpAp*. A dicha secuencia se le denominó Elemento de Regulación Distal (DRE por las siglas en inglés de “*Distal Regulatory Element*”) (Martínez-Santos, datos no publicados; Escalera-Maurer, Tesis de Licenciatura, 2012). Una fusión *ecp-cat* conteniendo el DRE no es activa en *E. coli* K-12, donde no existe un ortólogo de *creR*; sin embargo, su activación puede ser complementada en presencia de un plásmido a partir del cual se expresa CreR de *C. rodentium*. Este antecedente planteó la posibilidad de que el genoma de *E. coli* codificara para un ortólogo de la proteína efectora, con capacidad de reconocimiento y unión de di-GMP-c, que fuera la responsable de la activación del *ecpAp* en respuesta a los niveles de di-GMP-c modulados por CreR o que CreR fuera capaz de activar directamente al *ecpAp*, aun cuando CreR no contiene motivos evidentes de unión a DNA.

Las proteínas con un dominio PilZ son blancos de unión de di-GMP-c de los que más se han estudiado, en especial las proteínas BcsA y YgcR. BcsA codifica para la subunidad catalítica de la celulosa sintasa BcsAB, de la que hoy se sabe que el di-GMP-c es el activador alostérico y que el dominio C-terminal es el responsable de su unión (Amikan y Galperin, 2006). Por su parte, YgcR se ha descrito como un

componente de la maquinaria del flagelo que interactúa con FliM y FliG que forman parte del rotor flagelar (Ryjenkov *et al.*, 2006).

En *C. rodentium* los únicos genes que codifican para proteínas con dominio PilZ son los ortólogos de *bcsA* y *ygcR*, de manera que se analizó si estas proteínas estaban implicadas en la regulación del operón *ecp* de *C. rodentium*. La determinación de la actividad de la fusión *ecp-cat* en las cepas mutantes respectivas, reveló que ninguna estaba implicada en la activación del *ecpAp* dependiente de CreR.

Datos preliminares utilizando cepas mutantes $\Delta himA$ y Δhns sugieren que IHF y H-NS regulan, al igual que en EPEC y EHEC, la expresión de *ecp* de *C. rodentium* de forma positiva y negativa, respectivamente (Martínez-Santos, datos no publicados; Escalera-Maurer, Tesis de Licenciatura, 2012).

3. JUSTIFICACIÓN

Las fimbrias son factores de virulencia necesarios para que las bacterias puedan adherirse a superficies ambientales, reservorios y/o células epiteliales, por lo cual, son un factor determinante en el proceso de colonización. Las bacterias como EPEC, EHEC y *C. rodentium* tienen una amplia gama de operones para la biogénesis de fimbrias, entre 16 y 19, de cuya mayoría se sabe muy poco. La fimbria ECP se encuentra presente en distintos géneros bacterianos además de *E. coli*, por lo que conocer el papel que está desempeñando en otro modelo bacteriano es de suma importancia para el entendimiento de su naturaleza y como la bacteria la ha integrado a su ciclo de vida y a su compleja red de regulación génica. Con este trabajo se pretende contribuir a obtener un mejor entendimiento del papel que juega el amplio repertorio de operones fimbriales de la familia chaperona-acomodadora en el ciclo de vida de una bacteria patógena que transita entre el ambiente, sus reservorios y el hospedero. Conocer en qué situaciones necesitan cada una de estas estructuras, para qué las usan y cómo y con qué otros genes se co-regula su expresión y síntesis nos podría ayudar, además de aportar conocimiento, a proponer estrategias profilácticas o terapéuticas con un posible impacto en el campo de la salud.

4. HIPÓTESIS

La proteína CreR regula de manera positiva la expresión del operón *ecp* a través de una proteína efectora sensible a los niveles de di-GMP-c, la cual se une a una secuencia específica dentro del DRE encontrado en la región reguladora. La actividad de este efector es facilitada por la unión de IHF a una secuencia localizada entre el DRE y el promotor de *ecp* y en conjunto antagonizan la acción represora ejercida por H-NS.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General:

Estudiar la regulación transcripcional del operón fimbrial *ecp* de *Citrobacter rodentium*.

5.2 Objetivos particulares:

1. Caracterizar la región reguladora del operón fimbrial *ecp*.
2. Identificar reguladores involucrados en la activación del operón *ecp*.

5.3 Objetivos específicos:

- a) Determinar si IHF y CreR son esenciales para la activación del operón *ecp* aun en ausencia de H-NS.
- b) Delimitar el Elemento Regulador Distal (DRE).
- c) Identificar el gen que codifica para la proteína efectora requerida para la activación del promotor del operón *ecp*.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de crecimiento

Las cepas y los plásmidos utilizados en este estudio se enlistan en la **Tabla 2** y **Tabla 3**, respectivamente. Los preinóculos bacterianos se crecieron en 5 ml de medio Luria Bertani (LB) (ver **Anexo: medios y soluciones**), durante toda la noche en agitación a 37°C.

Los medios que se utilizaron fueron: LB, DMEM (conteniendo glucosa, L-glutamina y piridoxal, entre otros componentes, pH 7.4; Gibco BRL Life Technologies), MM-Glc (medio mínimo suplementado con glucosa), SOB (Super Optimal broth) y SOC (SOB sin glucosa) (ver **Anexo: medios y soluciones**), los cuales se suplementaron con los antibióticos requeridos según el caso: Ampicilina (Ap, 200 µg/ml), Kanamicina (Km, 25 µg/ml), Tetraciclina (Tc, 8 µg/ml) y Cloranfenicol (Cm, 34 µg/ml). Los medios sólidos fueron Agar LB y MacConkey.

Tabla 2 | Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Características	Referencia
<i>E. coli</i> DH5-α	F-, Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYAargF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE 44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i> . Nal ^R .	Invitrogen
<i>E. coli</i> MC4100	F-, [<i>araD139</i>]B/r, Δ(<i>argF-lac</i>)U169, λ-, e14-, <i>flhD5301</i> , Δ(<i>fruKyeiR</i>)725(<i>fruA25</i>), <i>relA1</i> , <i>rpsL150</i> (Str ^R), <i>rbsR22</i> , Δ(<i>fimBfimE</i>)632(::IS1), <i>deoC1</i> . Str ^R .	Casadaban, 1976.
DBS100	<i>C. rodentium</i> silvestre.	Schauer - Falkow, 1993.
DBS100 Δ <i>creR</i> ::Km	Se reemplazó el gen <i>creR</i> por un casete de resistencia a Kanamicina.	Este trabajo.
DBS100 Δ <i>hns</i>	Se reemplazó el gen <i>hns</i> por un casete de resistencia a Kanamicina y posteriormente éste se removió.	Caballero-Flores <i>et al.</i> , 2015.
DBS100 Δ <i>himA</i> ::Km	Se reemplazó el gen <i>himA</i> por un casete de resistencia a Kanamicina.	Martínez-Santos, datos no publicados.
DBS100 Δ <i>creR</i> ::Km Δ <i>hns</i>	En el fondo de la cepa mutante en el gen <i>hns</i> se reemplazó el gen <i>creR</i> por un casete de resistencia a Kanamicina.	Martínez-Santos, datos no publicados.

DBS100 $\Delta himA::Km \Delta hns$	En el fondo de la cepa mutante en el gen <i>hns</i> se reemplazó el gen <i>himA</i> por un casete de resistencia a Kanamicina.	Este trabajo.
DBS100 $\Delta ecpA::Km$	Se reemplazó el gen <i>ecpA</i> por un casete de resistencia a Kanamicina.	Martínez-Santos, datos no publicados.
DBS100 $\Delta ecpD::Km$	Se reemplazó el gen <i>ecpD</i> por un casete de resistencia a Kanamicina.	Martínez-Santos, datos no publicados.
DBS100 $\Delta lac::Cm$	Se reemplazó el gen <i>lacZ</i> por un casete de resistencia a Cloranfenicol.	Este trabajo.
DBS100 $\Delta lac::Cm/\Delta creR::Km$	En el fondo mutante en <i>lacZ::Cm</i> se reemplazó el gen <i>creR</i> por un casete de resistencia a Kanamicina.	Este trabajo.
DBS100 $\Delta lac::Cm/\Delta hns$	En el fondo mutante en <i>hns</i> , se reemplazó el gen <i>lacZ</i> por un casete de resistencia a Kanamicina.	Caballero-Flores, datos no publicados.
DBS100 $\Delta lac::Cm/\Delta hns/\Delta creR::Km$	En el doble fondo mutante en <i>lacZ::Cm/hns</i> se reemplazó el gen <i>creR</i> por un casete de resistencia a Kanamicina.	Este trabajo.
DBS100 $\Delta lac::Cm/\Delta hns::mTn5$ pRSecpA 11A	Contiene al transposón mTn5 insertado en el gen ROD_31831.	Este trabajo.
DBS100 $\Delta lac::Cm/\Delta hns::mTn5$ pRSecpA 12B	Contiene al transposón mTn5 insertado en el gen ROD_42451.	Este trabajo.
DBS100 $\Delta lac::Cm/\Delta hns::mTn5$ pRSecpA 28B	Contiene al transposón mTn5 insertado en el gen ROD_00801.	Este trabajo.
DBS100 $\Delta lac::Cm/\Delta hns::mTn5$ pRSecpA 30B	Contiene al transposón mTn5 insertado en el gen ROD_20811.	Este trabajo.

Tabla 3 | Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características	Resistencia	Referencia
pKD46	Contiene el gen de la recombinasa λ -Red bajo el control del promotor <i>araB</i> .	Ap	Datsenko y Wanner, 2000.
pKD3	Contiene un casete de resistencia a Cloranfenicol que sirve de DNA molde para ser amplificado.	Ap, Cm	Datsenko y Wanner, 2000.
pKD4	Contiene un casete de resistencia a Kanamicina que sirve de DNA molde para ser amplificado.	Ap, Km	Datsenko y Wanner, 2000.
pKK232-8	Vector útil para hacer fusiones transcripcionales acopladas al gen reportero <i>cat</i> . Derivado del pBR322, contiene un gen <i>cat</i> sin promotor, un sitio de múltiple clonación, que facilita la inserción de fragmentos en el extremo 5'.	Ap	Brosius, 1984.
pecpA-1	Fusión transcripcional de la región		Escalera-

	reguladora de <i>ecp</i> (desde -494 a +211) al gen reportero <i>cat</i> en pKK-232-8.	Ap	Maurer, 2012.
pMPM-T3	Vector de clonación derivado del pACYC177 (p15A <i>ori</i>) con un casete de resistencia a Tetraciclina y el sitio de múltiple clonación del pBSKS.	Tc	Mayer, 1995.
pT3- <i>creR</i> -Flag	Contiene clonado el gen <i>creR</i> etiquetado con un epítoto de 3X-Flag.	Tc	Martínez-Santos, datos no publicados.
pT3- <i>hns</i>	Contiene clonado el gen <i>hns</i> de <i>E. coli</i> K-12.	Tc	Bustamante <i>et al.</i> , 2001.
pT3- <i>ihfA</i>	Contiene clonado el gen <i>himA</i> de EPEC.	Tc	Martínez-Santos, datos no publicados.
<i>pecpA</i> -4	Fusión transcripcional de la región reguladora de <i>ecp</i> (desde -407 a +211) al gen reportero <i>cat</i> en pKK232-8.	Ap	Escalera-Maurer, 2012.
<i>pecpA</i> -4.1	Fusión transcripcional de la región reguladora de <i>ecp</i> (desde -383 a +211) al gen reportero <i>cat</i> en pKK232-8.	Ap	Este trabajo.
<i>pecpA</i> -4.2	Fusión transcripcional de la región reguladora de <i>ecp</i> (desde -357 a +211) al gen reportero <i>cat</i> en pKK232-8.	Ap	Este trabajo.
<i>pecpA</i> -DRE1	Fusión transcripcional de la región reguladora de <i>ecp</i> (desde -383 a +211) al gen reportero <i>cat</i> en pKK-232-8. Las primeras 5 bases de DRE fueron sustituidas por transversión.	Ap	Este trabajo.
<i>pecpA</i> -DRE2	Fusión transcripcional de la región reguladora de <i>ecp</i> (desde -383 a +211) al gen reportero <i>cat</i> en pKK232-8. Las bases de la 6-10 de DRE fueron sustituidas por transversión.	Ap	Este trabajo.
<i>pecpA</i> -DRE3	Fusión transcripcional de la región reguladora de <i>ecp</i> (desde -383 a +211) al gen reportero <i>cat</i> en pKK232-8. Las bases de la 11-15 de DRE fueron sustituidas por transversión.	Ap	Este trabajo.
<i>pecpA</i> -DRE4	Fusión transcripcional de la región reguladora de <i>ecp</i> (desde -383 a +211) al gen reportero <i>cat</i> en pKK232-8. Las bases de la 16-20 de DRE fueron sustituidas por transversión.	Ap	Este trabajo.
<i>pecpA</i> -DRE5	Fusión transcripcional de la región reguladora de <i>ecp</i> (desde -383 a +211) al gen reportero <i>cat</i> en pKK232-8. Las bases de la 21-25 de DRE fueron sustituidas por transversión.	Ap	Este trabajo.
<i>pecpA</i> -DRE6	Fusión transcripcional de la región reguladora de <i>ecp</i> (desde -383 a +211) al gen reportero <i>cat</i> en pKK232-8. Las bases de la 26-30 de DRE fueron sustituidas por transversión.	Ap	Este trabajo.

pRS415	Vector de clonación útil para hacer fusiones transcripcionales acopladas al gen reportero <i>lacZ</i> .	Ap	Simmons <i>et al.</i> , 1987.
pRSecpA	Fusión transcripcional de la región reguladora de <i>ecp</i> (desde -407 a +91) al gen reportero <i>lacZ</i> en pRS415.	Ap	Este trabajo.
pBSL118	Vector que contiene al elemento mini-Tn5 con un casete de resistencia a Kanamicina.	Ap, Km	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995).

6.2 Oligonucleótidos utilizados

Los oligonucleótidos utilizados en este estudio fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología-UNAM, y se enlistan en la **Tabla 4**. Todos los oligonucleótidos se diluyeron a una concentración de 25 µM.

Tabla 4 | Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia 5'→3'	Características	Uso
Para fusiones génicas			
EcpA-582F	GTTTTTCAGGGATCCCTCATC TCAC	Contiene un sitio de restricción BamHI.	Como delantero para amplificar la región reguladora de <i>ecp</i> para la fusión <i>pecpA-1</i> .
EcpA-497F	AAATGAGTTGGATCCGACGGA TAG	Contiene un sitio de restricción BamHI.	Como delantero de la fusión <i>pecpA-4</i> .
EcpABH1Fw-383	CGCGACATTGGATCCCGCGGA AAATTA	Contiene un sitio de restricción BamHI.	Como delantero de la fusión <i>pecpA-4.1</i> .
EcpABH1Fw-357	ATCGGATCCATTAGCCTTTTAT TATAG	Contiene un sitio de restricción BamHI.	Como delantero de la fusión <i>pecpA-4.2</i> .
EcpA-ERD-1F	CCCGGGGATCCATATTA TAAGAATATCCCT	Delantero de la fusión transcripcional 4.1 con cambios en las bases de la 1-5 del DRE (CGCGG→ATATT) Contiene un sitio de restricción BamHI.	Como delantero de la fusión <i>pecpA-DRE1</i> .
EcpA-ERD-2F	CCCGGGGATCCCGCGGCC CGTAAGAATATCCCTGAAAT	Delantero de la fusión transcripcional 4.1 con cambios en las bases de la 6-10 del DRE (AAAAT→CCCCG). Contiene un sitio de restricción BamHI.	Como delantero de la fusión <i>pecpA-DRE2</i> .
EcpA-ERD-3F	CCCGGGGATCCCGCGGAAA ATGCCTCATATCCCTGAAAT TAGCC	Delantero de la fusión transcripcional 4.1 con cambios en las bases	Como delantero de la fusión <i>pecpA-DRE3</i> .

		de la 11-15 del DRE (TAAGA→GCCTC). Contiene un sitio de restricción BamHI.	
EcpA-ERD-4F	CCCGGGGATCCCGCGGAA AATTAAGACGCGACCTGAA ATTAGCCTTTTA	Delantero de la fusión transcripcional 4.1 con cambios en las bases de la 16-20 del DRE (ATATC→CGCGA). Contiene un sitio de restricción BamHI.	Como delantero de la fusión <i>pecpA</i> -DRE4.
EcpA-ERD-5F	CCCGGGGATCCCGCGGAA AATTAAGAATATCAAGTCAA TTAGCCTTTTATTAT	Delantero de la fusión transcripcional 4.1 con cambios en las bases de la 21-25 del DRE (CCTGA→AAGTC). Contiene un sitio de restricción BamHI.	Como delantero de la fusión <i>pecpA</i> -DRE5.
EcpA-ERD-6F	CCCGGGGATCCCGCGGAAA ATTAAGAATATCCCTGACCG GCGCCTTTTATTATAGGATT	Delantero de la fusión transcripcional 4.1 con cambios en las bases de la 26-30 del DRE (AATTA→CCGGC). Contiene un sitio de restricción BamHI.	Como delantero de la fusión <i>pecpA</i> -DRE6.
EcpAH3R	GTAATAACAAGCTTGCTTCT GGTG	Contiene un sitio de restricción HindIII.	Como reverso para amplificar la región reguladora de <i>ecp</i> de las fusiones transcripcionales <i>pecpA</i> -1, 4, 4.1, 4.2.
EcpA-lacZERI-F	CGCGCGGAATTCGACGGATA GCGCGACATTTTA	Contiene un sitio de restricción EcoRI.	Como delantero de la fusión transcripcional pR <i>SecpA</i> .
EcpA-lacZBHI-R	CGCGCGGGATCCCACTTTTG TCTTCTCCTGAGA	Contiene un sitio de restricción BamHI	Como reverso de la fusión transcripcional pR <i>SecpA</i> .
pKK-SEQ2-F	GAGGCCCTTTCGTCTTCAAG	Delantero del vector pKK-232-8. Alinea a 208 pb del sitio BamHI.	Para secuenciar y en algunos casos verificar las construcciones en este plásmido.
pKK-SEQ1-R	CAACGGTGGTATATCCAGTG	Reverso del vector pKK-232-8. Alinea a 90 pb de HindIII.	Para secuenciar y en algunos casos verificar las construcciones en este plásmido.
pKK-BHIF	GGAATTCTCGGGGAT	Delantero del vector pKK-232-8. Alinea sobre el sitio BamHI.	Para verificar las construcciones en este plásmido.
pKK-HD3R	GTTTTGTCCTACTCAAGC	Reverso del vector pKK-232-8. Alinea sobre el sitio HindIII.	Para verificar las construcciones en este plásmido.

LacZ-R	GCCAGGGTTTTCCAGTCAC GACG	Reverso del vector pRS415 y pMC1871. Alinea dentro de <i>lacZ</i> a 157 pb del sitio BamHI.	Para verificar las fusiones a <i>lacZ</i> por PCR y mandar a secuenciar.
Para mutagénesis por reemplazo alélico			
D-lacZ-Fw	AACAATTTTAAACAGGACTGAA CCATGAACCTCAATACTGATTC ACTGTGTAGGCTGGAGCTGCT TCG	Oligo mutagénico para <i>lacZ</i> .	Como delantero para la mutagénesis de <i>lacZ</i> .
D-lacZ-Rv	AGGCGCTGACCTGCCCGGTTT TTATTATTTCTGGCCCCAGACG ATCTGCATATGAATATCCTCCT TAG	Oligo mutagénico para <i>lacZ</i> .	Como reverso para la mutagénesis de <i>lacZ</i> .
Para amplificar una región mutada y usarla como fragmento para reemplazo alélico en otro fondo y para confirmar cepas mutantes			
ROD29251F	TAAAACGGACTAAAATTAAGAG G	Oligo externo al gen <i>creR</i> , usado como delantero.	Para amplificar la región mutada de $\Delta creR::Km$ desde la cepa <i>creR::Km</i> $\Delta hns1$ y generar la mutación en otras cepas.
ROD29251-R	CGGCTTGAAAACTCATTAT TG	Oligo externo al gen <i>creR</i> , usado como reverso.	Para amplificar la región mutada de <i>creR::Km</i> desde la cepa $\Delta creR::Km$ $\Delta hns1$ y generar la mutación en otras cepas.
Cr-himA-F	CGTAAATCAGGTAGTTGGCGT	Oligo externo al gen <i>himA</i> , usado como delantero.	Para amplificar la región mutada de $\Delta himA::Km$ y generar la mutación en la cepa Δhns . Además, como delantero para confirmar la mutación en el gen <i>himA</i> .
himA-Rv-MIIC	CCGTTTGATACGCCGAGTAA	Oligo externo al gen <i>himA</i> , usado como reverso.	Para amplificar la región mutada de $\Delta himA::Km$ y generar la mutación en la cepa Δhns . Además, como reverso para confirmar la mutación en el gen <i>himA</i> .
H-NS-Fw	GGCTATTGCACATCTGAATTT AACG	Oligo externo al gen <i>hns</i> , usado como delantero.	Como delantero para confirmar la mutación en el gen <i>hns</i> .
H-NS-Rv	CCCTCATTTACTCTTCAGC	Oligo externo al gen <i>hns</i> , usado como reverso.	Como reverso para confirmar la mutación en el gen <i>hns</i> .
LacZ-Fw	CGTCCTTTACAGCGTTAACG	Oligo externo al gen <i>lacZ</i> , usado como delantero.	Como delantero para confirmar la mutación en el gen <i>lacZ</i> .

Lac-Z-Rv	GGATTCCTTATGCGAATATCG	Oligo externo al gen <i>lacZ</i> , usado como reverso.	Como reverso para confirmar la mutación en el gen <i>lacZ</i> .
Mch-Fw2	GAGTAACTCGAGCTGAATTAC CCAAAAGCGCATTAC	Delantero que alinea al final del gen <i>mchF</i> de <i>C. rodentium</i> . Contiene un sitio de restricción XhoI.	Como oligonucleótido específico de <i>C. rodentium</i> como control para verificar identidad de las cepas.
3691_Rv2	CACCAAGGATCCCGTTGATTT CCTGCACATGT	Reverso que alinea al inicio del gen <i>gcfF</i> . Contiene un sitio de restricción BamHI.	Como oligonucleótido específico de <i>C. rodentium</i> como control para verificar identidad de las cepas.
K1	CAGTCATAGCCGAATAGCCT	Reverso del casete de resistencia a Kanamicina. Se alinea a ~71 pb dentro del gen y a ~499 pb del casete.	Como oligonucleótido general para verificar las cepas mutantes en las que se había utilizado el casete de resistencia a Kanamicina para el reemplazo alélico.
K2	CGGTGCCCTGAATGAACTGC	Delantero del casete de resistencia a Kanamicina. Se alinea a ~634 pb dentro del gen y a ~888 pb del casete.	Como oligonucleótido general para verificar las cepas mutantes en las que se había utilizado el casete de resistencia a Kanamicina para el reemplazo alélico.
Cat-1	TTATACGCAAGGCGACAAGG	Delantero del casete de resistencia a Cloranfenicol se alinea casi al final del casete ~214 pb. Lo utilizamos como reverso, (el casete se inserta en la orientación opuesta).	Como oligonucleótido reverso general para verificar las cepas mutantes en las que se había utilizado el casete de resistencia a Cloranfenicol para el reemplazo alélico.
Cat-2	GATCTCCGTCACAGGTAGG	Reverso del casete de resistencia a Cloranfenicol se alinea casi al inicio del casete ~90 pb. Lo utilizamos como delantero, (el casete se inserta en la orientación opuesta).	Como oligonucleótido delantero general para verificar las cepas mutantes en las que se había utilizado el casete de resistencia a Cloranfenicol para el reemplazo alélico.
Km2.2-pBSL118	ACCGCTTCCTCGTGCTTTAC	Reverso del casete de resistencia a Kanamicina. Alinea a 83 pb del extremo 3' dentro de la región estructural	Para mandar a secuenciar las cepas mutantes en las que se había insertado el mTn5 con el casete

		del gen.	de resistencia a Kanamicina para conocer la ubicación de su inserción.
Otros			
pKD46-Fw	TCAGGAGTTCAGCCATGAAC	Delantero del plásmido pKD46.	Para verificar la presencia del plásmido en las cepas que se iban a utilizar para la mutagénesis por reemplazo alélico.
pKD46-Rv	GTACAGGATTCATTGTCCTGC	Reverso del plásmido pKD46.	Para verificar la presencia del plásmido en las cepas que se iban a utilizar para la mutagénesis por reemplazo alélico.
pMPPM3Fw2	AATCGGAACCCTAAAGGGA GC	Reverso del vector de clonación pMPPM-T3.	Para verificar por PCR la presencia de pMPMT3 en alguna cepa o verificar que un gen estuviera clonado.
pMPMT3 Rv1	GCGTTATCCCCTGATTCTGT GG	Delantero del vector de clonación pMPPM-T3.	Para verificar por PCR la presencia de pMPMT3 en alguna cepa o verificar que un gen estuviera clonado.
pMPPM-T3/K3-Fw	TGTGGAATTGTGAGCGGAT AAC	Delantero del vector de clonación pMPPM-T3 y pMPPM-K3.	Para mandar a secuenciar genes clonados en este vector.
PMPM-T3/K3-Rv	AAGGCGATTAAGTTGGGTA ACG	Reverso del vector de clonación pMPPM-T3 y pMPPM-K3.	Para mandar a secuenciar genes clonados en este vector.

6.3 Generación de cepas mutantes

Las cepas mutantes (**Tabla 2**) se construyeron por el método de mutagénesis en un solo paso utilizando productos de PCR desarrollado por Datsenko y Wanner (2000). La cepa de interés se transformó con el plásmido pKD46, que provee las funciones lambda red para facilitar recombinación homóloga, y se creció a 30°C ya que es un vector cuya replicación es sensible a la temperatura. Por otra parte, se

diseñaron dos pares de oligonucleótidos por cada remplazo alélico, los primeros son de un tamaño de entre 60 a 80 pb donde las primeras 20 bases del extremo 3' son idénticas a la secuencia templado que flanquea los casetes de resistencia a Km o Cm de los plásmidos pKD4 o pKD3, respectivamente, y el resto de la secuencia de los oligonucleótidos es similar a la región adyacente corriente arriba y corriente abajo del gen que se desea reemplazar. Con estos oligonucleótidos se amplificó el casete de resistencia por el que se reemplazó el gen de interés utilizando como DNA molde los plásmidos pKD4 o pKD3. Los productos de PCR se concentraron mediante extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico y se resuspendieron en 12 µl de agua. La cepa de interés con pKD46 se creció en 5 ml de LB durante toda la noche en agitación a 30°C con Ap. Al día siguiente se inocularon 50 ml de SOB con una dilución 1:100 del cultivo de toda la noche y los cultivos se llevaron hasta una O.D.₆₀₀ de entre 0.6 a 0.8. La producción de la recombinasa λ Red codificada en este plásmido se indujo con la adición de 5 ml de L-arabinosa 1M desde el inicio del crecimiento del cultivo. A partir de este cultivo se prepararon células electrocompetentes muy concentradas y se transformaron con 6 µl del producto de PCR limpio. Las células transformantes se recuperaron en 1 ml de SOC durante 5 horas a 30°C y se plaquearon en cajas de agar LB con los antibióticos correspondientes y se incubaron a 37°C toda la noche. Las colonias obtenidas se replicaron en agar LB, suplementado con Km o Cm, dependiendo del casete de resistencia utilizado, y se incubaron toda la noche a 42°C para que perdieran el plásmido pKD46. Después de tres pases en esta condición, aquellas colonias que ya no crecieron en cajas con Km y Ap o Cm y Ap pero si con los antibióticos Km o Cm, se analizaron por PCR usando el segundo par de oligonucleótidos específicos que alinean en las secuencias adyacentes a los sitios de inserción, además de combinaciones con los oligonucleótidos K1 y K2/Cat1 y Cat2 que alinean dentro del casete de Km o Cm, respectivamente (Datsenko y Wanner, 2000).

6.4 Construcción de fusiones transcripcionales al gen reportero *cat*

Para la construcción de las fusiones transcripcionales utilizando el gen reportero *cat*, se utilizaron los oligonucleótidos enlistados en la **Tabla 4**. Las regiones de interés que se deseaban clonar se amplificaron con los oligonucleótidos correspondientes a partir de DNA genómico de la cepa *C. rodentium* DBS100. Una vez obtenidos los productos de PCR, se limpiaron utilizando el “*kit*” comercial de Roche para productos de PCR. Posteriormente, se digirieron con las enzimas de restricción BamHI y HindIII (Thermo Scientific) según las instrucciones del fabricante, incubando durante 5 horas a 37°C. Los productos se limpiaron mediante precipitación con glucógeno y etanol. Se utilizó el plásmido pKK232-8 como vector y fue digerido con las mismas enzimas. Se procedió entonces a la ligación con los insertos y el vector en una relación 3:1, respectivamente, utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Scientific) según el protocolo del fabricante. Las reacciones se incubaron toda la noche a 4°C, se limpiaron y concentraron mediante precipitación con glucógeno y etanol y se utilizaron para transformar la cepa *E. coli* DH5- α por electroporación. Las cepas transformadas fueron recuperadas en 1 ml de SOC por 1 hora a 37°C y se plaquearon en agar LB con Ap para seleccionar a las que tuvieran el plásmido. Varias colonias candidatas se analizaron por PCR (los oligonucleótidos están enlistados en la **Tabla 4**) y también con las enzimas de restricción esperando que se liberara del plásmido el fragmento insertado. Finalmente, la integridad del inserto se confirmó mediante secuenciación en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología-UNAM.

6.5 Construcción de la fusión transcripcional al gen reportero *lacZ*

Para la construcción de la fusión transcripcional utilizando el gen reportero *lacZ*, se utilizaron los oligonucleótidos enlistados en la **Tabla 4**, con los que se amplificó la región correspondiente a la región reguladora del operón *ecp* (de las posiciones -407 a +91 con respecto al inicio de transcripción a partir de DNA genómico de la

cepa DBS100. Los fragmentos amplificados, se limpiaron utilizando el “*kit*” comercial de Roche para productos de PCR. Posteriormente, se digirieron con las enzimas de restricción EcoRI y BamHI (Thermo Scientific), incubando toda la noche a 37°C. Los productos se limpiaron mediante precipitación con glucógeno y etanol. El vector utilizado fue el plásmido pRS415 que fue digerido con las mismas enzimas. Se procedió entonces a la ligación, con el inserto y el vector en una relación 3:1, respectivamente, utilizando la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Scientific). Las reacciones se incubaron toda la noche a 4°C y posteriormente se introdujeron en la cepa *E. coli* DH5- α por electroporación. Las cepas transformadas fueron recuperadas en 1 ml de SOC por 1 hora a 37°C y se plaquearon en agar LB con Ap para seleccionar a las que tuvieran el plásmido. Varias colonias candidatas se analizaron por PCR (los oligonucleótidos están enlistados en la **Tabla 4**) y también con las enzimas de restricción esperando que se liberara del plásmido el fragmento insertado. Posteriormente, se mandaron a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología-UNAM para confirmar la secuencia del inserto.

6.6 Ensayo de la actividad de CAT

La determinación de la actividad de las fusiones transcripcionales utilizando el gen reportero *cat* (que codifica para la enzima cloranfenicol acetiltransferasa (CAT)) se realizaron como se describió anteriormente (Martínez-Laguna *et al.*, 1999). Las cepas transformadas con las fusiones se cultivaron en 5 ml de LB adicionado con Ap y los antibióticos correspondientes, a 37°C durante 12 horas. Posteriormente, se tomaron 100 μ l para inocular 5 ml de DMEM con Ap más el antibiótico de la cepa respectiva y se incubaron por 14 horas a 30°C en crecimiento estático. Se tomaron muestras de 1.5 ml de cada cultivo, se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 min, se lavaron con 800 μ l de *buffer* TDTT (ver **Anexo: medios y soluciones**) y posteriormente, se resuspendieron en 300 μ l de *buffer* TDTT. Las muestras se sonicaron durante 3 min con pulsos de 10 segundos y descansos de 5 segundos, y se centrifugaron a 12,000 rpm por 5 min para eliminar la basura celular.

La concentración de proteínas en 10 µl de cada extracto por duplicado se determinó con el estuche comercial BCA (Pierce). La actividad CAT se determinó mediante una cinética de actividad enzimática, usando 5 µl de cada muestra por duplicado en 200 µl de una mezcla de la reacción (ver **Anexo: medios y soluciones**), en un lector de microplacas computarizado tipo Ceres (Biotek). La actividad específica se determinó dividiendo la actividad CAT entre la concentración de proteína de cada extracto.

6.7 Ensayo de proteínas secretadas

Las cepas de interés se cultivaron en 5 ml de LB durante toda la noche con los antibióticos correspondientes. Tubos con 5 ml de DMEM se incubaron durante toda la noche a 37°C con 5% de CO₂. Al día siguiente, se inocularon con 100 µl del inóculo, se dejaron crecer durante por lo menos 8 horas a 37°C con 5% de CO₂. Se colectaron 4.5 ml de cada cultivo, se centrifugaron a 14,000 rpm durante 5 min y el sobrenadante se separó en tres tubos con 1.5 ml, a los cuales se le agregó 10% de Ácido Tricloroacético (TCA) y se dejó precipitando toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los tubos se centrifugaron a 14,500 rpm durante 30 min, se descartó todo el sobrenadante y las muestras se dejaron secando a temperatura ambiente. Posteriormente, se resuspendió uno de los precipitados con 50 µl de *sample buffer* (ver **Anexo: medios y soluciones**) y 3 µl de Tris pH 11 para neutralizar el TCA. Esto se pasó al segundo tubo y a continuación al tercero para concentrar toda la muestra. Las muestras se calentaron durante 10 min y se corrieron en geles de poliacrilamida al 12%.

6.8 Cuantificación de biopelícula *in vitro*

Se cultivaron las cepas de interés en tubos con 5 ml de LB más el antibiótico correspondiente a 37°C toda la noche en agitación. Al día siguiente se hicieron diluciones 1/100 v/v en 5 ml de LB sin NaCl (LB-NS por las siglas en inglés de Luria-Bertani *not salt*), condiciones previamente reportadas como permisivas para

la formación de biopelícula por *C. rodentium* (Bhullar *et al.*, 2015). Adicionalmente, se probaron LB, LB/Agua 1:1 y DMEM. Con 200 μ l de cada dilución se cargó una microplaca de 96 pozos en esterilidad y se incubó sin agitación (cultivo estático) por 5 días a 30°C estático, temperatura que favorece la expresión del *ecpAp*. Pasado este tiempo, se leyó el crecimiento bacteriano D.O._{620 nm} en un lector de microplacas computarizado tipo Ceres (Biotek). El medio de cultivo se desechó, se lavaron los pozos 3 veces con 200 μ l de amortiguador PBS 1X, se fijó la biopelícula con 200 μ l de metanol por 10 min, se retiró el metanol y se dejó secar la placa a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó 200 μ l del colorante Cristal Violeta y se incubó 15 min, se retiró el colorante y se procedió a hacer 3 lavados con agua. Después se dejó secar la placa a temperatura ambiente y sucedido esto, se agregaron 200 μ l de ácido acético 33%, se incubó por 15 min en agitación y pasado este tiempo se leyó en un lector de microplacas computarizado tipo Ceres (Biotek) a una D.O.₅₆₂. La cantidad de biopelícula fue calculada dividiendo la absorbancia O.D.₅₆₂ (cristal violeta)/O.D.₆₂₀ (crecimiento bacteriano).

6.9 Inmunodetección por *western blot*

Las bacterias se cultivaron en 5 ml de LB a 37°C en agitación durante 12 horas. Posteriormente, 100 μ l de estos precultivos se usaron para inocular 5 ml de DMEM y los tubos se incubaron a 30°C en estático durante 14 horas. Se colectaron muestras de 1.5 ml de cada cultivo, se centrifugaron y las pastillas se resuspendieron en 80 μ l de urea 8 M (la O.D.₆₀₀ fue similar en todas las muestras) y 20 μ l de *sample buffer* (ver **Anexo: medios y soluciones**). A continuación se calentaron a 95°C durante 5 min previo a cargar 30 μ l de cada muestra en geles de poliacrilamida 12% (acrilamida 30%, bisacrilamida 0.8%). Una vez resueltas las muestras por electroforesis, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.22 μ m de tamaño de poro (Amersham) en una cámara de transferencia semi-seca (BioRad) por 43 min a 17 V; previamente, la membrana, el papel Watman y el gel se sumergieron en *buffer* de transferencia (ver **Anexo: medios y soluciones**). Enseguida se verificó la transferencia utilizando el colorante rojo de

Ponceau, después la membrana se lavó perfectamente con agua y se bloqueó con leche descremada (Svelty) disuelta en PBS-T (ver **Anexo: medios y soluciones**) por 1 hora en agitación. Se realizaron tres lavados con PBS-T de 10 minutos cada uno en agitación. Después se incubó con el anticuerpo primario toda la noche a 4°C en agitación (la dilución recomendada para el anticuerpo monoclonal α -Flag (Sigma-Aldrich) es 1:1,500 en TBS-T 1X y para el policlonal α -GroEL (Sigma-Aldrich) es 1:50,000 en PBS-T 1X). Posteriormente, se lavó la membrana tres veces por 10 minutos con PBS-T y se añadió el anticuerpo secundario anti-ratón para el α -Flag y anti-conejo para el α -GroEL (Rockland) acoplado a peroxidasa (HRP por las siglas en inglés de *horseradish peroxidase*), ambos a una dilución 1:10,000 en PBS-T, y se incubó por 1 hora. Por último, se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con PBS-T y se reveló con el estuche comercial de quimioluminiscencia Western Lightning Plus ECL (Perkin Elmer) y se expuso a películas fotográficas (Kodak).

6.10 Determinación de la actividad β -galactosidasa

Las cepas se cultivaron en 5 ml de LB en condiciones estáticas durante toda la noche con los antibióticos correspondientes a 30°C ó 37°C. Al día siguiente se tomaron 1.5 ml de estos cultivos, se centrifugaron y se resuspendieron en 500 μ l de amortiguador Z (ver **Anexo: medios y soluciones**). Posteriormente, se tomaron 20 μ l de muestra para cargar dos microplacas, una para cuantificar proteínas y otra para la actividad β -galactosidasa. En el primer caso, se agregaron 100 μ l de la solución D para la cuantificación de proteínas por el método de Lowry y se incubó 10 min a temperatura ambiente en agitación, después se agregó 100 μ l de la solución E y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente en agitación, al finalizar el tiempo de incubación la placa se leyó en un lector de microplacas computarizado tipo Ceres (Biotek). Para la determinación de la actividad β -galactosidasa, a las muestras se les agregaron 100 μ l de la solución A, se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente en agitación, y enseguida se agregaron 100 μ l de la solución B y se leyó en un lector de microplacas computarizado tipo Ceres

(Biotek). La actividad específica β -galactosidasa se determinó dividiendo la actividad registrada entre la cantidad de proteína de la muestra determinada por el método de Lowry.

6.11 Mutagénesis al azar

El transposón mini-Tn5 contenido en el plásmido pBSL118 se utilizó para llevar a cabo la mutagénesis al azar en *C. rodentium* $\Delta lacZ::Cm \Delta hns$ llevando la fusión pRSecpA. Se prepararon células electrocompetentes muy concentradas (~300 μ l) a partir de un cultivo a 37°C con agitación en 100 ml de LB al llegar a una O.D._{600nm} de entre 0.6 a 0.8. Se tomaron 200 μ l de estas células y se mezclaron con 8 μ g del plásmido pBSL118 (extraído con el estuche comercial Zymo Research); el volumen final se dividió en 3 reacciones y las células se transformaron por electroporación (Bio-Rad electroporator). Las células se recuperaron en 3 ml de SOC (1 ml por reacción) con 1 mM de IPTG (Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido) para inducir la transposasa por 1 hora a 37°C. Las bacterias resultantes se sembraron en placas de Agar-LB con los antibióticos Km, Cm y Ap, al día siguiente todas las colonias resultantes se replicaron en placas de Agar-LB con los antibióticos correspondientes y X-Gal (*5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-D-Galactopyranoside*). Las transformantes que mostraran una disminución en color con respecto al resto, indicaban una disminución en la actividad de la fusión pRSecpA por lo que se separaron para medir actividad específica β -galactosidasa y su posterior caracterización en detalle (Flores *et al.*, 2003, Fernández *et al.*, 2004).

Para determinar el sitio de la inserción del transposón en el genoma de las mutantes seleccionadas, se diseñó el oligonucleótido Km2.2-pBSL118 (**Tabla 4**) en la cadena codificante (5' \rightarrow 3') que alinea a 83 pb del extremo 3' del casete de resistencia a Kanamicina que está dentro del transposón, y con él se mandó a secuenciar directamente desde DNA genómico purificado de cada cepa. El

resultado de la secuenciación nos confirmó la inserción del transposón, así como su ubicación.

6.12 Ensayos de colonización en ratón

Los inóculos bacterianos para este ensayo se prepararon como se describe a continuación. Preinóculos de las cepas utilizadas se sembraron en 5 ml de LB y se crecieron durante toda la noche a 37°C con agitación. Al día siguiente se inocularon 1:100 en matraces con 50 ml de LB y se incubaron hasta una O.D.₆₀₀ de ~1.0 en las mismas condiciones. Con anterioridad, se había determinado que en 1 ml a una O.D.₆₀₀ de 1.0 hay ~5x10⁸ UFC/ml (Caballero-Flores, 2016), así que de estos cultivos se tomaron 100 µl de cultivo (que correspondería a ~5x10⁷ UFC) por cada ratón a inocular (de ser necesario se ajustó el volumen a tomar). Las bacterias se centrifugaron a 8,500 rpm por 5 minutos y se lavaron dos veces con una solución PBS 1X en frío y estéril y se resuspendieron finalmente en PBS 1X de manera que quedaran 200 µl por cada ratón a inocular (Caballero-Flores *et al.*, 2015, Caballero-Flores, Tesis de Doctorado, 2016).

Los ratones inoculados fueron machos de la línea C57BL/6 de 4 a 5 semanas de edad provenientes del bioterio del Instituto de Biotecnología-UNAM. Los animales se dividieron en 4 grupos de 5 (WT, $\Delta creR::Km$, $\Delta creR::Km$ pT3-creR y $\Delta ler::Km$). Cada grupo se mantuvo en jaulas con libre acceso a agua y a alimentos en condiciones estériles. El día de la inoculación, los ratones se mantuvieron sin alimento por aproximadamente 4 horas para vaciar el contenido intestinal. Los animales se pesaron y se marcaron de manera individual en la cola para su identificación. Cada ratón se inoculó con 200 µl de la preparación bacteriana correspondiente, se utilizaron sondas nasogástricas adaptadas a jeringas de insulina de 1 ml.

Posterior al día de la infección, se tomaron muestras de heces fecales de cada ratón cada tercer día. Para esto, por la mañana los animales se colocaron en cajas

individuales estériles (de puntas azules) hasta que defecaron (~1h). Se colectaron ~50 mg de heces con pinzas de metal estériles (flameadas) en una campana de flujo laminar. Las muestras se resuspendieron en 1 ml de PBS 1X en tubos Eppendorf pesados antes y después de agregar las muestras de heces.

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 medio selectivo agar MacConkey (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, color fucsia 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* (como control específico de *C. rodentium*), así como para la cepa mutante en *creR* con los oligonucleótidos anotados en la **Tabla 4** y usando como molde DNA extraído de al menos 5 colonias colectadas a diferentes días post-inoculación.

El cálculo de las UFC's 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 cada tercer día 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 dislocación cervical después de ser anestesiados por inhalación de CO₂.

Los protocolos establecidos fueron aprobados por el comité de bioética del Instituto de Biotecnología-UNAM y realizados siguiendo sus instrucciones.

7. RESULTADOS

7.1 IHF y CreR son esenciales para la expresión del operón *ecp* aun en ausencia de H-NS

Una manera de analizar el papel de determinadas proteínas en la activación de la transcripción de un gen en particular, es mediante el uso de mutantes en los genes respectivos y una fusión transcripcional de la región reguladora del gen a analizar acoplada a un gen reportero. Con el propósito de determinar en mayor detalle el papel que juegan los reguladores globales IHF y H-NS en la regulación del operón *ecp* dependiente de CreR, se cuantificó la actividad del *ecpAp* utilizando la fusión *pecpA-1* en la cepa WT de *C. rodentium* DBS100, en las mutantes sencillas en los genes *creR*, *hns* y *himA* (subunidad A de IHF) y en las dobles mutantes $\Delta creR \Delta hns$ y $\Delta hns \Delta himA$ (**Tablas 2 y 3**).

Como lo reportó Escalera-Maurer en su Tesis de Licenciatura en 2012, las proteínas CreR e IHF son necesarias para la expresión del operón *ecp*. En este trabajo se utilizaron las cepas mutantes respectivas como controles para poder analizar el papel de CreR e IHF en una cepa que carece de *hns* (regulador negativo) (**Figura 13**). En las cepas $\Delta creR$ y $\Delta himA$, la fusión *pecpA-1* es inactiva, lo que indica un papel positivo de ambas proteínas en la regulación de la expresión de *ecpAp*; mientras que H-NS tiene un papel negativo ya que en la mutante la actividad de la fusión casi se triplica con respecto a la observada en la cepa WT (**Figura 13**).

Para corroborar que cada disminución o aumento en la actividad fuera consecuencia de la ausencia de un gen en particular, se complementaron las cepas mutantes con el gen respectivo expresado a partir del promotor *lacZ* en un plásmido de bajo número de copias. El comportamiento en cada fondo genético es revertido cuando se complementan las cepas mutantes con los genes respectivos (pT3-*creR*, pT3-*hns* o pT3-*ihf*) (Martínez-Santos, datos no publicados; Bustamante

et al., 2001.), pero no así cuando llevan el vector vacío (pT3); además, cuando CreR se expresa en multicopia, la actividad de la fusión aumenta significativamente en las cepas WT, $\Delta creR::Km$ y Δhns , mientras que en la mutante en *himA* no sucede así (**Figura 13**). Esta observación sugiere que IHF es esencial para la expresión del operón *ecp* aun cuando el regulador positivo esté presente en mayores cantidades.

Las evidencias hasta este punto dieron pauta para hipotetizar la existencia de una proteína que, en respuesta a los niveles de di-GMP-c modulados por la probable actividad fosfodiesterasa de CreR, regula positivamente la expresión del operón interactuando directamente con una secuencia específica dentro del elemento DRE; a su vez, que junto con IHF, dicha proteína antagoniza la represión mediada por H-NS sobre el *ecpAp*. Para distinguir la función de CreR, y por tanto de la proteína efectora hipotética, en el mecanismo de activación, se analizó la actividad del *ecpAp* mediante la fusión *pecpA-1* en la cepa $\Delta creR::Km/\Delta hns$. El resultado indicó que CreR es indispensable aun en ausencia del represor H-NS, ya que no hubo actividad en la cepa doble mutante y únicamente se restauró cuando fue complementada con CreR (**Figura 13**). Este resultado plantea que la proteína efectora a través de la que parece actuar CreR, hace algo más que solo desplazar a H-NS y contrarrestar su acción represora.

IHF se ha asociado con el doblado o reestructuración del DNA, función que para diferentes promotores tiene un efecto positivo en su expresión al favorecer la interacción de activadores que se unen a regiones distales del promotor o evitando la formación de complejos núcleo-represores por proteínas como H-NS (Revisado en Dillon y Dorman, 2010; Stoebel *et al.*, 2015). La actividad de la fusión *pecpA-1* en la doble mutante $\Delta himA::Km/\Delta hns$ es basal y no aumenta de manera significativa cuando se sobreexpresa CreR (**Figura 13**), confirmando que IHF es esencial para la activación del *ecpAp* dependiente de CreR. En su conjunto estos resultados indican que CreR e IHF actúan de manera coordinada principalmente

para favorecer la interacción de los elementos que determinan la activación del promotor y, a la vez, evitar que H-NS reprima.

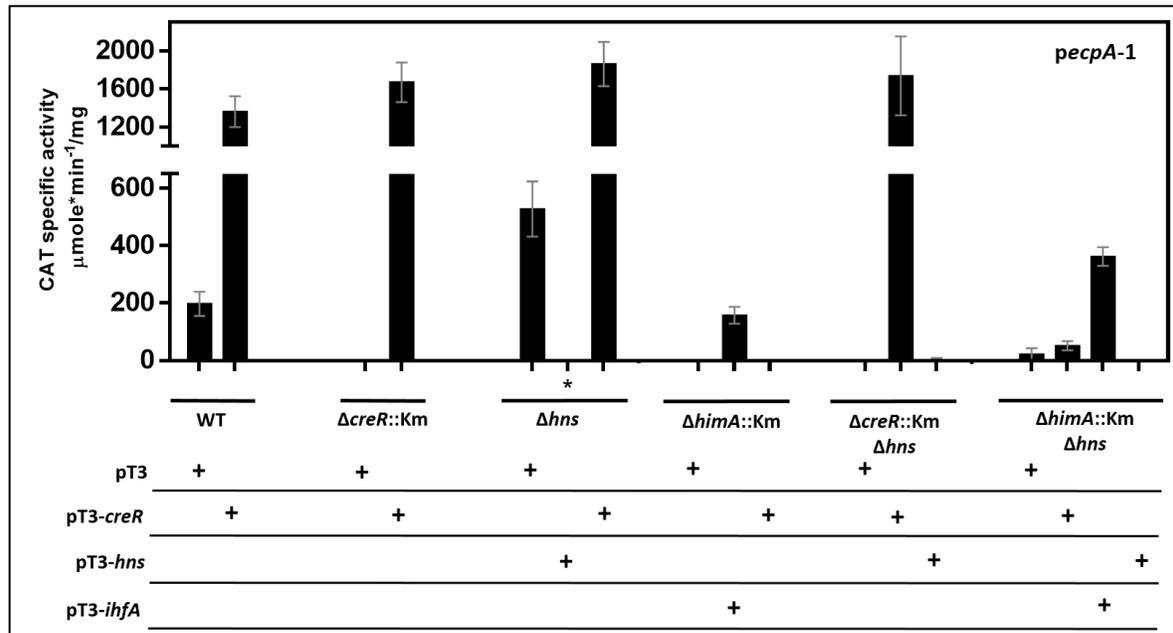


Figura 13 | La presencia de IHF y CreR es determinante para que el operón *ecp* se exprese, aun en ausencia de H-NS. Actividad específica CAT de las cepas indicadas de *C. rodentium* conteniendo la fusión transcripcional *pecpA-1* (Tabla 3) que contiene todos los elementos reguladores que controlan la expresión del operón *ecp*. Se utilizaron cultivos en tubo conteniendo 5 ml de DMEM, a 30°C, en condiciones estáticas, por 14 horas. Las barras de error representan las desviaciones estándar de la actividad de tres experimentos independientes por duplicado. *No se consideró el duplicado de la muestra del tercer experimento debido a cuestiones experimentales.

7.2 ECP se expresa preferencialmente en fase estacionaria pero el efecto de represión por H-NS es evidente desde fase exponencial

Es importante conocer en qué etapa del crecimiento bacteriano la proteína en estudio es mayormente sintetizada; una manera de saberlo es determinar la actividad transcripcional de su promotor en distintos puntos de la curva de crecimiento.

Para determinar en qué fase de crecimiento se activa el *ecpAp*, se colectaron células de la cepa WT conteniendo la fusión transcripcional *pecpA-1* a distintas

densidades ópticas (D.O.₆₀₀ 0.5, 0.8 y 1) de cultivos en matraz, y se trataron para la determinación de la actividad específica CAT.

La expresión de *ecpAp* aumenta conforme avanza el crecimiento bacteriano, presentándose una mayor actividad hacia la fase estacionaria de crecimiento (D.O.₆₀₀ de 0.8 y 1) (**Figura 14^a**); sin embargo, la actividad del promotor en la mutante Δ *hns* es evidente desde la fase exponencial (D.O.₆₀₀ de 0.5), durante la cual en la cepa WT sólo se detecta actividad basal (**Figura 14^B**). Esto confirma el papel represor de H-NS en la regulación de *ecpAp* y sugiere que todos los elementos requeridos para su activación se conjuntan hacia la fase estacionaria.

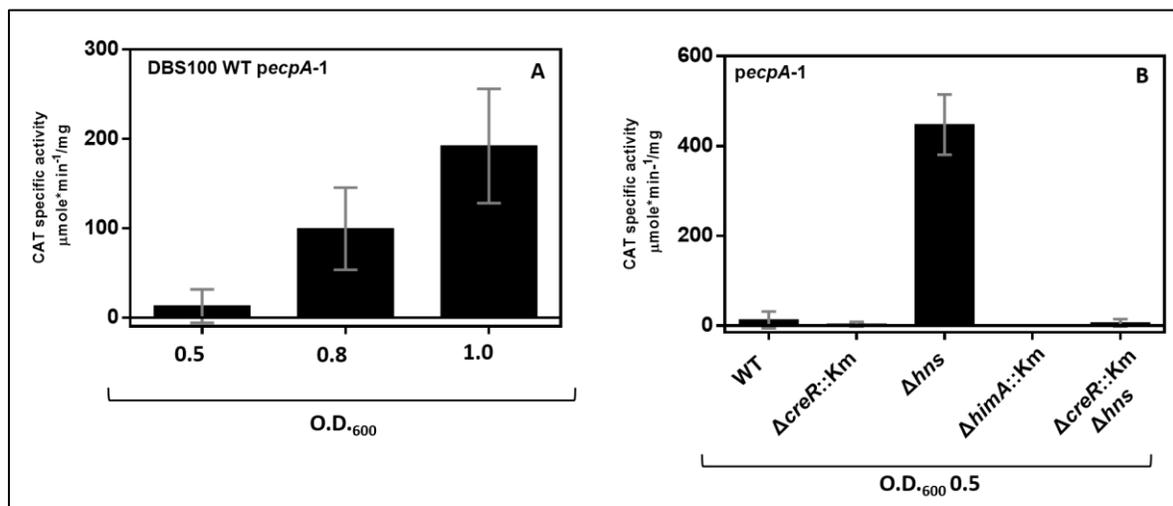


Figura 14 | El promotor de *ecp* es 16 veces más activo en fase estacionaria que en fase exponencial, pero el efecto represor de H-NS es evidente desde la fase exponencial. Determinación de la actividad específica CAT A) en la cepa WT en diferentes etapas del cultivo y B) en la cepa WT, en las mutantes sencillas y en la doble mutante en fase exponencial (O.D.₆₀₀ 0.5). Se utilizaron cultivos en matraz conteniendo 25 ml de DMEM, a 30°C, en condiciones estáticas hasta llegar a la O.D.₆₀₀ que se indica. Las barras de error representan las desviaciones estándar de la actividad de tres experimentos independientes por duplicado.

7.3 El elemento DRE está localizado entre las posiciones -378 y -358, siendo las posiciones -373 a -364 esenciales para la activación mediada por CreR

Una manera de delimitar la región reguladora mínima de un gen, es con la generación de fusiones transcripcionales con distintas longitudes del extremo 5'. En el grupo de trabajo del Dr. José Luis Puente, con anterioridad, se habían construido una serie de fusiones transcripcionales con recortes de la región reguladora del operón *ecp* acopladas al gen reportero *cat* para determinar la región mínima requerida para la activación de *ecpAp* (Martínez-Santos, datos no publicados). De este análisis, se observó que la fusión *pecpA-5*, que incluye con respecto al inicio de la transcripción la secuencia de la región reguladora de la posición -334 hasta +211 (incluyendo 123 pb dentro del gen *ecpA*), carece por completo de actividad con respecto a la fusión *pecpA-4* (posiciones -407 a +211), la cual es tan activa como la fusión más larga *pecpA-1* (posiciones -494 a +211) (**Figura 15^a**) (Escalera-Maurer, 2012; **ver antecedentes**). La diferencia entre las fusiones 4 y 5 son 67 pb (sin contar las secuencias correspondientes a los sitios de restricción), por lo que se propuso que esa secuencia contenía un elemento esencial de regulación positiva al que llamamos DRE (por las siglas en ingles de “*Distal Regulatory Element*”). Con base en este dato, para delimitar aún más la localización del DRE, se decidió hacer dos recortes de 18 y 44 pb con respecto al extremo 5' de la fusión *pecpA-4*, la longitud de estas fue decidida con base en una división de la secuencia que había entre las fusiones 4 y 5. El primer recorte comprende hasta la posición -383 (fusión *pecpA-4.1*) y el segundo hasta -357 (fusión *pecpA-4.2*) (**Figura 15^a**).

La actividad específica *cat* de las fusiones anteriormente mencionadas se determinó en las cepas WT y $\Delta creR::Km$ (**Figura 15B**), las fusiones *pecpA-1* y *pecpA-4* fueron utilizadas como control. En la cepa WT, la fusión 4 y la 4.1 presentaron la misma actividad que la fusión 1, en cambio la fusión 4.2, que corresponde al segundo recorte de la región reguladora, fue inactiva al igual que la

fusión 5 (**Figura 15B**). Estos resultados indicaron que la secuencia DRE se encuentra entre las posiciones -383 y -357.

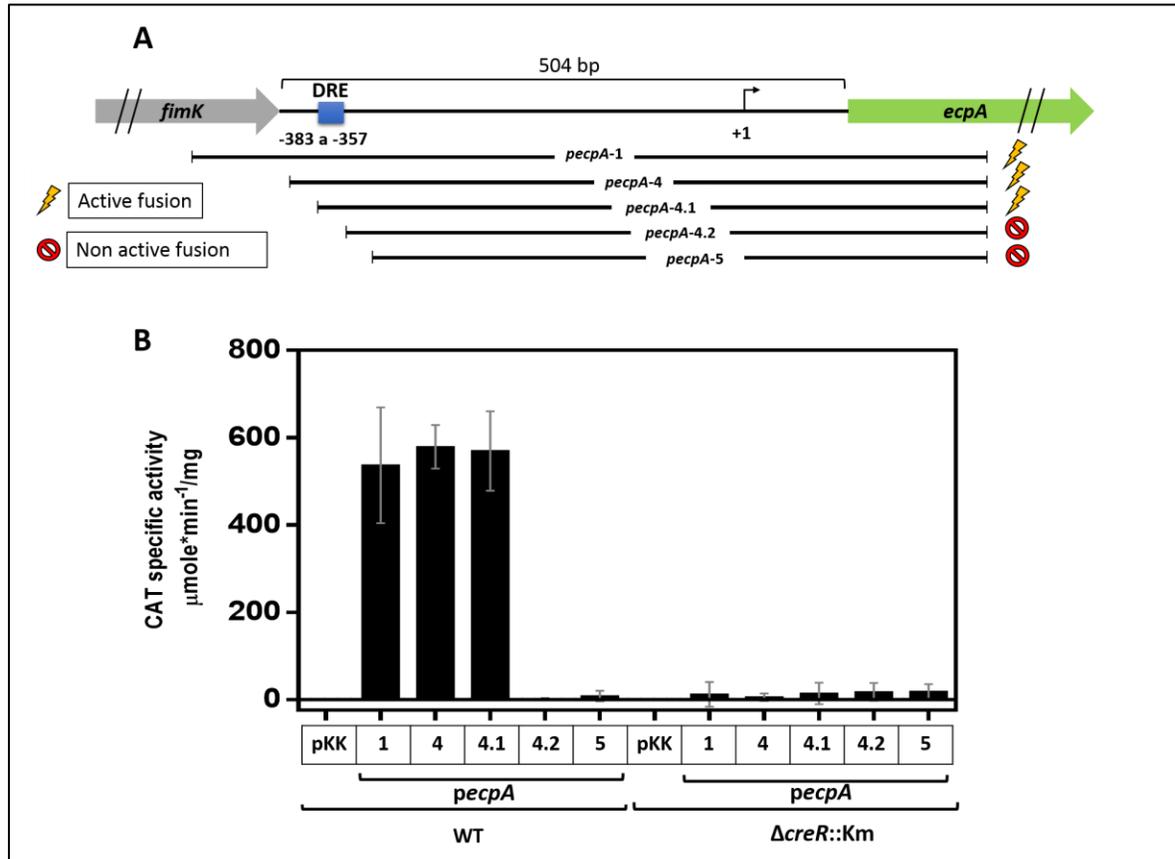


Figura 15 | La secuencia entre las posiciones -383 y -357, con respecto al inicio de transcripción, es esencial para la expresión del operón *ecp*. A) Representación esquemática de las fusiones transcripcionales que contienen diferentes porciones de la región reguladora del operón *ecp* de *C. rodentium*. La barra superior en negro esquematiza la longitud de la fusión 1 (activa, que abarca hasta -494), debajo de ésta se esquematiza la fusión *pecpA*-4 (activa, que abarca hasta -407), la barra siguiente corresponde a la fusión *pecpA*-4.1 (activa, que abarca hasta -383), enseguida está la fusión *pecpA*-4.2 (no activa, abarca hasta -357), la última barra corresponde a la fusión *pecpA*-5 (no activa, abarca hasta -334). En azul se representa el DRE y su delimitación con números. B) Actividad específica CAT en *C. rodentium* WT y $\Delta creR$ conteniendo las fusiones transcripcionales *pecpA*-1, 4, -4,1, -4.2 ó -5 y el vector pKK232-1 como control. Se utilizaron cultivos en tubo conteniendo 5 ml de DMEM, a 30°C, en condiciones estáticas, por 14 horas. Las barras de error representan las desviaciones estándar de la actividad de tres experimentos independientes por duplicado. Para la elaboración de la imagen A se utilizó el software SnapGene (GSL Biotech; disponible en snapgene.com).

Debido a la importancia que el DRE tiene en la activación del *ecpAp*, y probablemente en la interacción con una proteína efectora que responde a los niveles de di-GMP-c mediados por CreR, se realizó mutagénesis sitio dirigida sobre la secuencia que contiene dicho elemento regulador para determinar las bases esenciales que lo conforman.

La secuencia entre las posiciones -383 y -357 fue dividida en seis módulos de cinco bases, denominados DRE1 a DRE6, como se esquematiza en la **Figura 16B** y cada una de las cinco bases se modificó por transversión usando como base la fusión 4.1.

Los resultados indicaron que los cambios en DRE1 no afectaron la actividad de la fusión, la cual es similar a la observada para *pecpA-4.1*; para el caso de DRE6, los cambios solo hicieron que la actividad de la fusión disminuyera alrededor del 25% con respecto a *pecpA-4.1*, pero los cambios en DRE2 y DRE5 si redujeron considerablemente la actividad (aproximadamente en un 70% con respecto a la fusión silvestre), mientras que en DRE3 y DRE4 la anularon por completo.

Con base en los resultados anteriores podemos afirmar que el DRE se encuentra delimitado a las posiciones -378 a -358 de la región reguladora de *ecp*, siendo las posiciones -373 a -364 esenciales para la activación mediada por CreR y posiblemente el sitio de unión de un regulador positivo. La secuencia DRE no presenta características que nos permitan predecir el tipo de regulador que ahí pudiera estar interactuando ya que no presenta, por ejemplo, secuencias repetidas directas o repetidas invertidas.

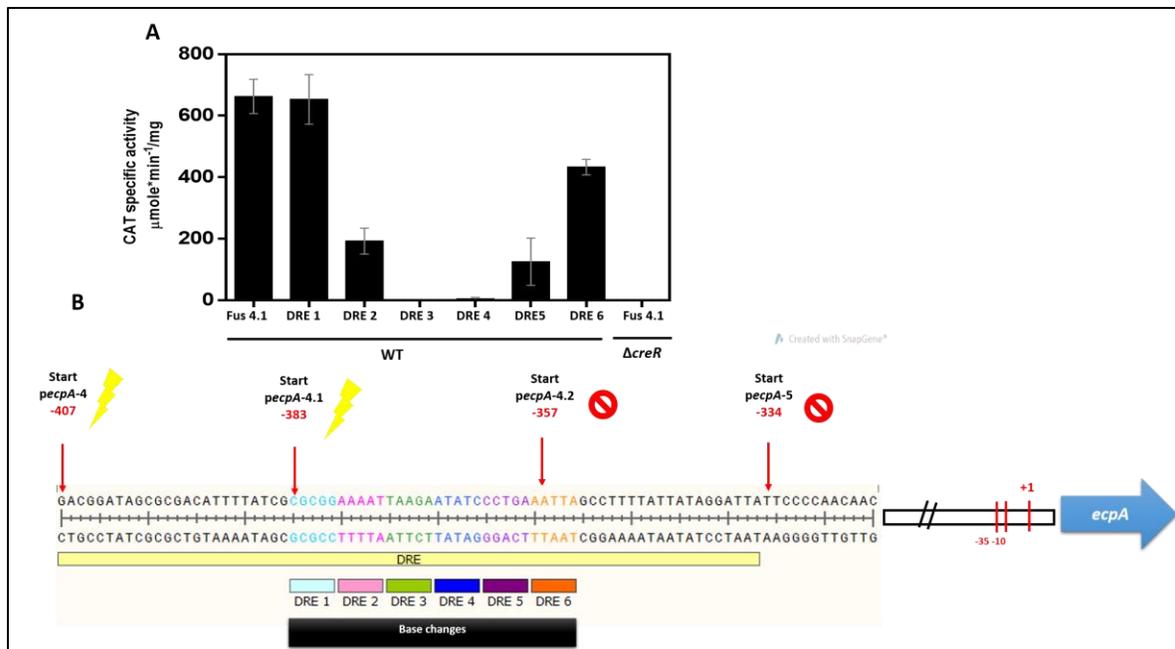


Figura 16 | El DRE se localiza en la región comprendida de -378 a -358 de la región reguladora de *ecp* donde las bases de -373 a -364 son esenciales para la activación vía CreR. A) Actividad específica de CAT de las cepas WT o mutante en *creR* conteniendo las fusiones transcripcionales indicadas. B) Representación esquemática de la región reguladora mínima y la ubicación de la secuencia DRE en la cual cinco bases consecutivas fueron modificadas secuencialmente DRE1-6 por mutagénesis sitio dirigida. Para determinar la actividad específica CAT se utilizaron cultivos en tubo conteniendo 5 ml de DMEM, a 30°C, en condiciones estáticas, por 14 horas. Las barras de error representan las desviaciones estándar de la actividad de tres experimentos independientes por duplicado. Para la elaboración de la imagen B se utilizó el software SnapGene (GSL Biotech; disponible en snapgene.com).

7.4 El promotor del operón *ecp* es activo en *E. coli* MC4100 solo en presencia de CreR y con el DRE intacto

Una manera de determinar si existen factores específicos de una cepa que son requeridos para la expresión de un gen, es analizar su expresión mediante el uso de una fusión génica en un fondo heterólogo, normalmente es utilizada una cepa de *E. coli* K-12.

La activación del *ecpAp* de *C. rodentium* mediada por CreR es específica como lo demuestra el experimento de complementación de la actividad de la fusión *pecpA-1* con un plásmido que codifica para CreR en *E. coli* K-12. En presencia de solo el vector, dicha fusión es inactiva, independientemente de las condiciones de crecimiento (Martínez-Santos, datos no publicados; Escalera-Maurer, Tesis de Licenciatura, 2012). Como en *E. coli* K-12 no existe un ortólogo de CreR se hipotetizó que la proteína capaz de unirse al DRE para permitir la transcripción del *ecpAp* en respuesta a la presencia de CreR, tendría que estar conservada en *E. coli* reconociendo la misma secuencia que en *C. rodentium*.

Con el propósito de confirmar esta observación y de determinar la importancia del DRE en un fondo heterólogo, se cuantificó la actividad específica CAT de las fusiones transcripcionales *pecpA-4.1*, *pecpA-DRE3* y *pecpA-DRE4* en la cepa *E. coli* MC4100 y en presencia del plásmido pT3-*creR*-FLAG que sobreexpresa a CreR etiquetado con un triple epítipo de “Flag” (3X-Flag); como controles se utilizó la fusión *pecpA-4.1* en el fondo de *C. rodentium*. Con las cepas resultantes se determinó la actividad de las diferentes fusiones, confirmando la expresión de CreR-FLAG mediante *western blot* (**Figura 17**).

Se encontró que a diferencia de lo que sucede en *C. rodentium*, la fusión transcripcional *pecpA-4.1* no es activa en *E. coli* MC4100 fondo WT, tal como se había observado para el caso de la fusión *pecpA-1* (Martínez-Santos, datos no publicados; Escalera-Maurer, Tesis de Licenciatura, 2012) y solo se ve expresión cuando está presente CreR; sin embargo, esta activación de la expresión no se observa con las fusiones DRE3 o DRE4 que contienen cambios en la secuencia esencial del DRE (**Figura 17**).

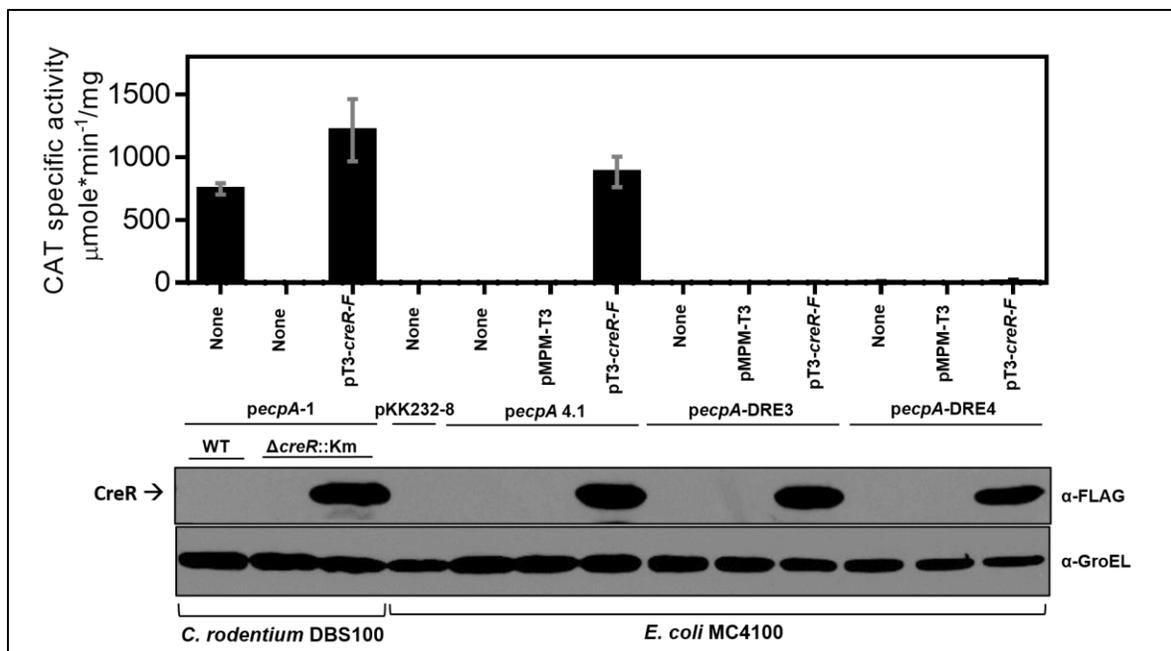


Figura 17 | El *ecpAp* se expresa en *E. coli* K-12 solo en presencia de CreR y con la secuencia DRE silvestre. Actividad específica CAT de las muestras de cultivo indicadas (*C. rodentium* DBS100 o *E. coli* K-12 MC4100) llevando la fusión transcripcional *pecpA*-4.1, *pecpA*-DRE3 o *pecpA*-DRE4. El plásmido pT3-*creR*-Flag fue utilizado para expresar la proteína CreR etiquetada con FLAG, la cual es funcional en *C. rodentium*, y la presencia de la proteína fue verificada por *western blot* con el anticuerpo monoclonal anti-FLAG. El vector pMPM-T3, así como las cepas conteniendo únicamente las fusiones transcripcionales fueron usadas como control. GroEL fue detectada con un anticuerpo anti-GroEL como control de carga. Las barras de error representan las desviaciones estándar de la actividad de dos experimentos independientes por duplicado, y el *western blot* es un experimento representativo de estos mismos.

Estas observaciones sugieren que la proteína que media la regulación positiva del operón vía CreR uniéndose a una secuencia específica dentro del DRE, se encuentra conservada en *E. coli* K-12, aunque no podemos aún descartar la posibilidad de que CreR actúe directamente sobre el promotor de *ecp*.

7.5 Identificación de reguladores positivos del operón *ecp*

La creación de una biblioteca de mutantes al azar utilizando un transposón es una herramienta muy utilizada para la identificación de elementos clave en un sistema de regulación o fenotipo. A la fecha, no son muchos los blancos de regulación

identificados capaces de responder a cambios en los niveles de di-GMP-c y de éstos pocos han sido estudiados en detalle. Los mejor caracterizados son las proteínas con dominios PilZ, FDEs o DGCs cuyos dominios GGDEF o EAL/HD-GYP se encuentran degenerados o no son funcionales pero conservan la capacidad de unión de di-GMP-c, y riboswitches.

Ante la posible existencia de una proteína efectora que responde al cambio en los niveles de di-GMP-c mediado por CreR, como estrategia para su identificación se planteó realizar una mutagénesis al azar utilizando el transposón Tn5 contenido en el plásmido pBL118 (**Figura 18**).

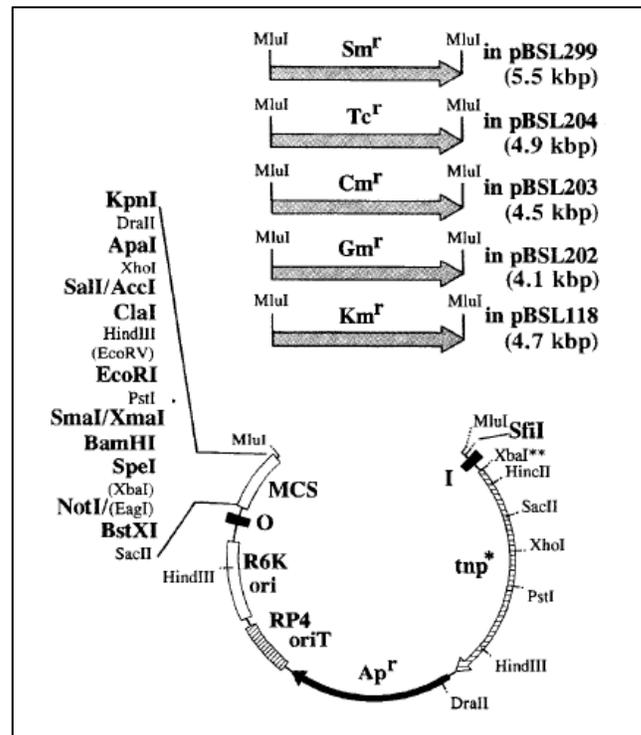


Figura 18 | Mapa de la serie de plásmidos pBSL. El esqueleto común del plásmido consiste de un Sitio de Múltiple Clonación (MCS), el origen de replicación R6K *oriV* y RP4 *oriT*, el gen de resistencia a Ampicilina, el gen de la transposasa mini-Tn5, y dos IS50 uno interno (I) y otro externo (O). El pBSL118 contiene el transposón con la resistencia a Km (Tomado de Alexeyev *et al.*, 1995).

7.5.1 Generación de herramientas

La mutagénesis se llevó a cabo utilizando el transposón mini-Tn5 y la selección de mutantes candidatas se realizó observando el efecto de los genes interrumpidos sobre la expresión de una fusión reportera de la región reguladora de *ecp* acoplada al gen reportero *lacZ*. Para esto, se generó la cepa mutante en el gen *lacZ* de *C. rodentium* para poder utilizar este gen como reportero en una fusión transcripcional; como control se generó sobre este mismo fondo una mutante en *creR* (**Tabla 2**), como se describe en **Materiales y Métodos**.

A su vez, tomando en cuenta que CreR es necesaria aun en ausencia de H-NS y que la expresión del *ecpAp* aumenta en la cepa Δhns , decidimos considerarla para realizar la mutagénesis al azar. Además, la mutante $\Delta lacZ::Cm/\Delta hns$ muestra una mejor eficiencia de transformación que la cepa silvestre (Caballero-Flores *et al.*, 2015). Como control se generó la cepa $\Delta lacZ::Cm/\Delta hns/\Delta creR::Km$ (**Tabla 2**). Todas las mutaciones fueron verificadas por PCR y como control se analizó que no se hubiera afectado la expresión de los genes de la isla de patogenicidad LEE mediante ensayos de proteínas secretadas (**Figura 19**).

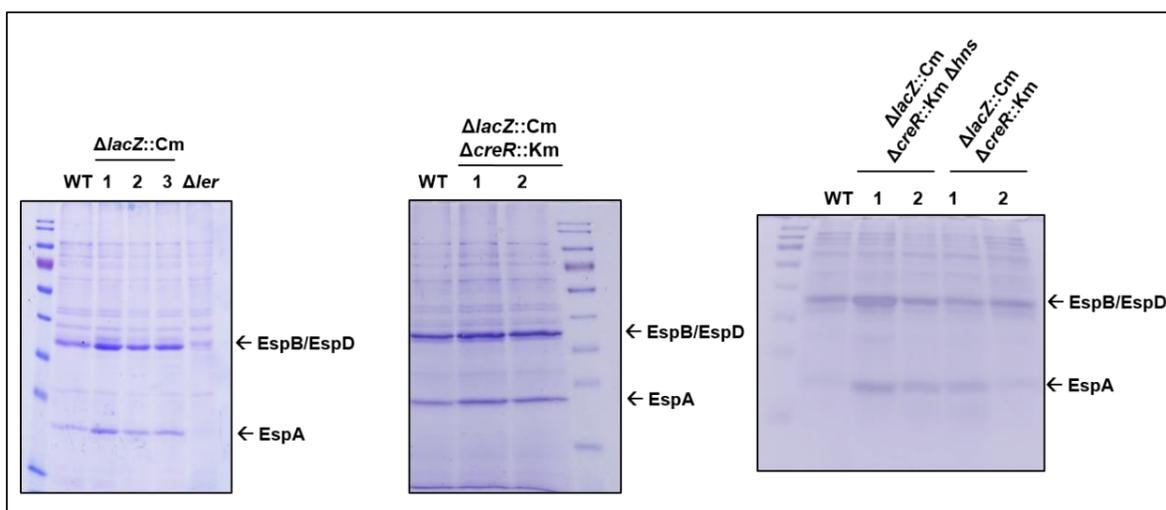


Figura 19 | Las mutaciones en *lacZ*, *creR* y/o *hns* no afectan la secreción de proteínas LEE a través del SST3. Perfiles de secreción de las cepas indicadas. Las condiciones del ensayo se describen en materiales y métodos.

Por otra parte, se construyó una fusión transcripcional en el vector pRS415 acoplada al gen reportero *lacZ* con un inserto equivalente al de la fusión *pecpA-4.1-cat*. Esta fusión se denominó pRSecpA-*lacZ* (Tabla 3; Figura 20).

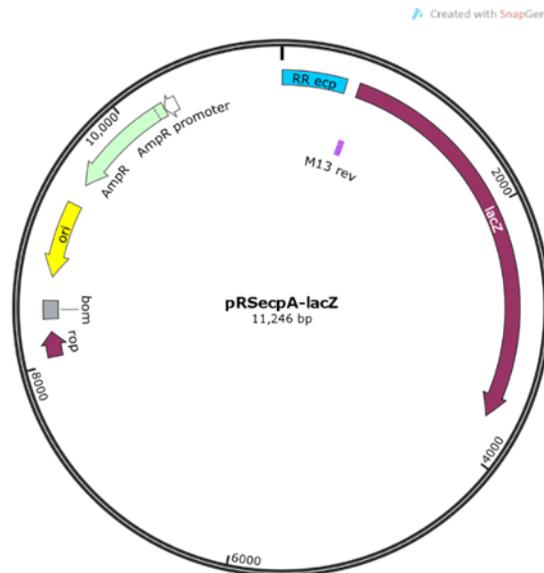


Figura 20. Esquema representativo del plásmido pRSecpA-*lacZ*. La fusión transcripcional fue construida en el plásmido pRS415 (Simmons *et al.*, 1987), la longitud y secuencia de la fusión es similar a la *pecpA-4.1-cat*. Para la elaboración de la imagen B se utilizó el software SnapGene (GSL Biotech; disponible en snapgene.com).

Una vez generada la fusión pRSecpA-*lacZ* se transformó en la cepa mutante en *lacZ* y su expresión se probó de manera visual en tres diferentes medios de cultivo, a 37°C durante 12 horas para determinar cuál sería el que permitiera una visualización más clara del fenotipo de cada mutante (Figura 21).

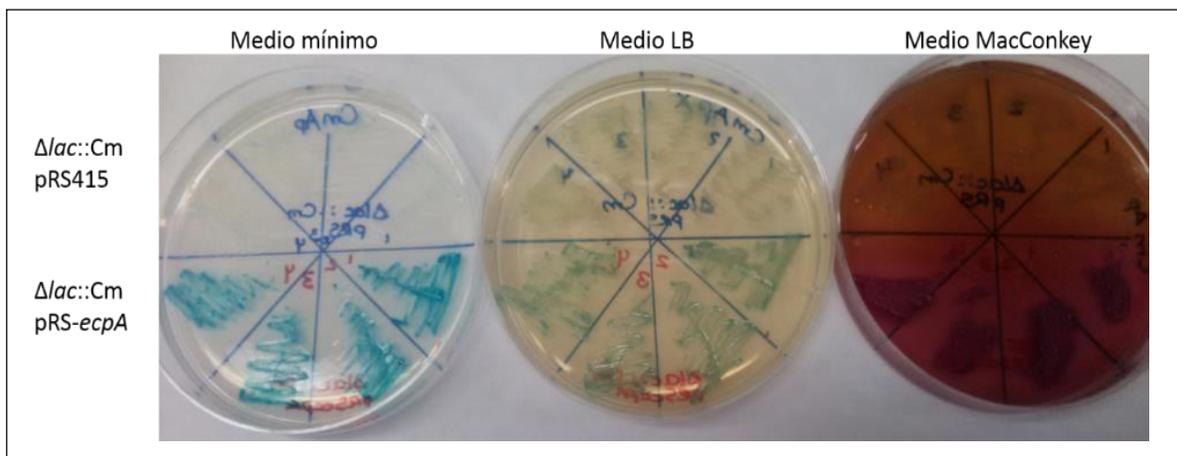


Figura 21 | La fusión transcripcional pRSecpA es activa en tres diferentes medios de cultivo.

Las cepas mutantes en *lacZ* conteniendo el vector pRS415 vacío o la fusión transcripcional, fueron sembradas en placas de medio mínimo y LB con X-Gal o en placas de medio MacConkey, todas con los antibióticos correspondientes. La actividad de la fusión pudo verse claramente a comparación de la misma cepa con el vector vacío.

7.5.2 Determinación de las condiciones óptimas de expresión utilizando la fusión pRSecpA-lacZ

Aunque en medio mínimo la expresión de la fusión pRSecpA-lacZ es más evidente y contrasta más claramente con el control, a las células les resulta difícil crecer, mientras que en MacConkey el fondo oscuro dificulta distinguir variaciones sutiles en la coloración de las colonias aisladas. Con base en estas observaciones, se continuó trabajando con LB.

Para continuar con la caracterización de la fusión pRSecpA-lacZ, y de las condiciones en la que se realizaría el tamizaje del banco de mutantes, se analizó la actividad β -galactosidasa generada por dicha fusión en las cepas con distintos fondos mutantes que alteran la expresión del *ecpAp* crecidas en LB a 30°C y 37°C (**Figura 22**).

Como ya se había visto, el crecimiento en LB no es la condición óptima para la expresión del *ecpAp*, por lo menos en la cepa silvestre, lo que concuerda con la baja actividad del promotor en la cepa $\Delta lacZ::Cm$ (**Figura 22**). Por su parte, y como era de esperarse, en la cepa $\Delta lacZ::Cm/\Delta hns$ la fusión fue considerablemente más activa; sin embargo, y en consistencia con nuestros datos anteriores, en la triple mutante $\Delta lacZ::Cm/\Delta hns/\Delta creR$ la actividad se redujo significativamente (**Figura 22**), aunque no se abatió por completo como sucede con las fusiones al reportero *cat* (**Figura 13**). Este comportamiento se presentó en las dos temperaturas probadas.

Los resultados anteriores confirmaron observaciones hechas previamente por otros métodos, aunque a diferencia de las fusiones *cat*, la fusión *ecpA-lacZ* contenida en el plásmido pRSecpA produce un fondo de actividad que dificulta observar el efecto de la mutación en *creR*; sin embargo, para la selección de mutantes resultantes de la mutagénesis al azar, incluso utilizando LB como medio de cultivo, esto se pudo solventar utilizando la doble mutante $\Delta lacZ::Cm/\Delta hns$ donde se espera que cualquier mutación que afecte la expresión de *ecpAp*, debe mostrar una disminución significativa de la actividad similar a la observada en la triple mutante $\Delta lacZ::Cm/\Delta hns/\Delta creR$ (Figura 22).

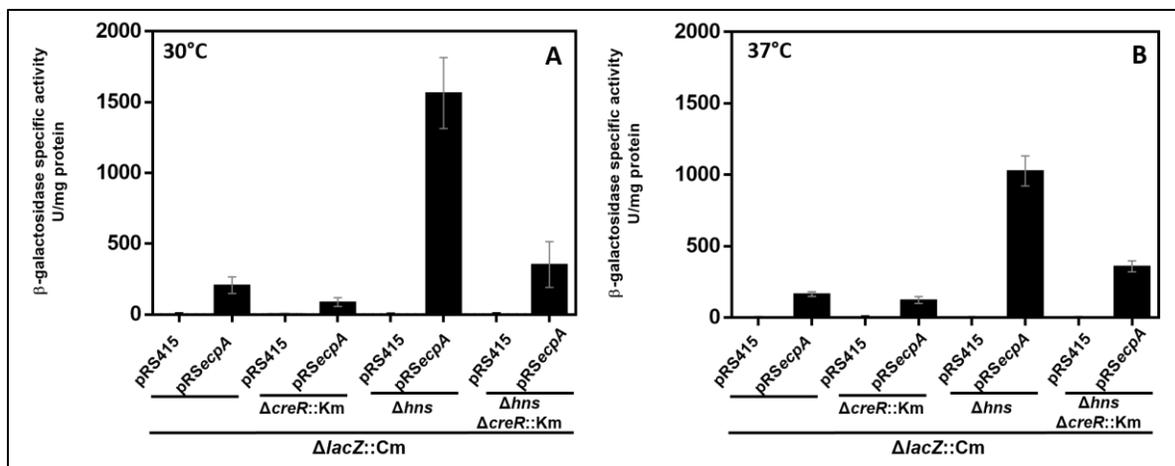


Figura 22. La fusión pRSecpA-lacZ es más activa en la cepa mutante en *hns*. La actividad β-galactosidasa se determinó para las cepas de *C. rodentium* que se indican en la gráfica, conteniendo la fusión pRSecpA-lacZ o el vector como control. Las muestras son de cultivos en tubo con 5 ml de LB crecidos a 30°C (A) o 37°C (B) en condiciones estáticas, por 14 horas. Las barras de error representan las desviaciones estándar de la actividad de dos experimentos independientes por duplicado.

7.5.3 Búsqueda de reguladores transcripcionales del operón *ecp*

Se llevaron a cabo los primeros experimentos de mutagénesis al azar en la cepa doble mutante $\Delta lacZ::Cm/\Delta hns$ pRSecpA. Las condiciones para llevar a cabo cada experimento con alta eficiencia quedaron estandarizadas, como se describe en materiales y métodos. Para la selección de mutantes candidatas, se consideró que si el transposón interrumpía el marco de lectura abierto de un gen involucrado en

la regulación positiva del operón *ecp*, esperaríamos ver la disminución de la actividad β -galactosidasa de la fusión *pRSepA-lacZ*, lo que se reflejaría en la disminución del color azul intenso observado en la cepa que carece de H-NS creciendo en una placa de LB-agar con X-Gal. Es importante destacar que las colonias candidatas serían de un color azul claro y no totalmente blancas, debido a, como se describió anteriormente, la actividad de fondo que genera la fusión *ecp-lacZ* a partir del plásmido *pRSepA*.

De esta manera, de 3000 colonias que fueron analizadas en dos experimentos, se encontraron cinco candidatas donde la expresión de la fusión *pRSepA-lacZ* se mostró disminuida al ser replicadas en cajas de agar-LB con X-Gal. De éstas, cuatro presentaron un color azul menos intenso que la cepa mutante en *hns* (control) e igual que la cepa mutante tanto en *hns* como en *creR*. La colonia 11B fue totalmente blanca probablemente debido a una inserción en el gen *lacZ* de la fusión.

La actividad específica β -galactosidasa de las cepas candidatas seleccionadas 11^a, 12B, 28B y 30B fue similar a la de la cepa control $\Delta hns/\Delta creR::Km$, mientras que la cepa 11B tuvo una actividad mucho menor a éstas (**Figura 23**).

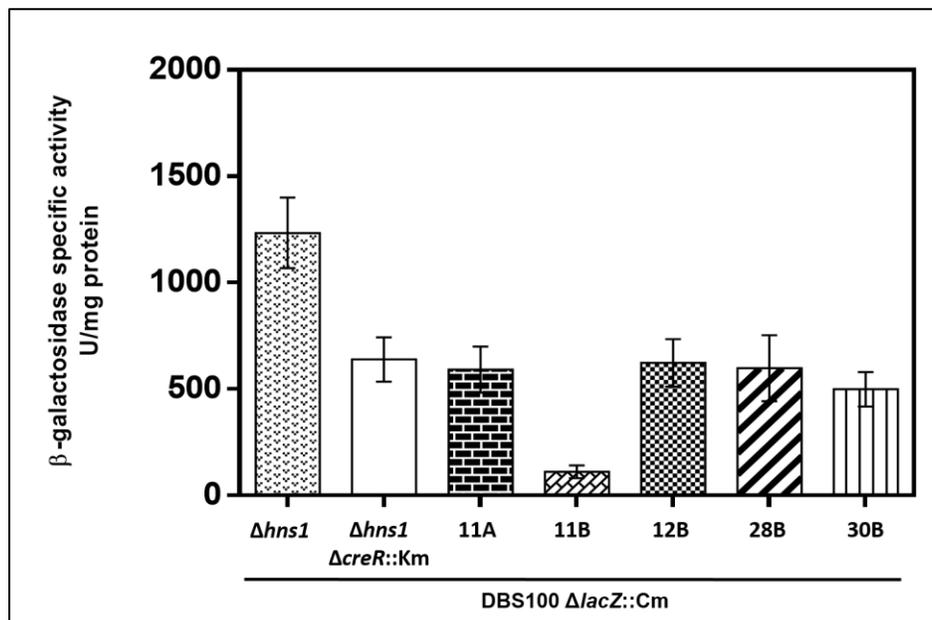


Figura 23 | Actividad transcripcional de la fusión pRSecpA-lacZ en las cepas seleccionadas de la mutagénesis con Tn5. La actividad específica β -galactosidasa de cada cepa se determinó a partir de muestras de cultivos en tubo con 5 ml de LB, crecidos en condiciones estáticas por 14 horas a 30°C. La actividad obtenida en las cepas $\Delta hns/\Delta creR::Km$ y Δhns se incluyó como control. La determinación de la actividad específica β -galactosidasa se realizó como se describe en materiales y métodos. Las barras de error representan las desviaciones estándar de la actividad de tres experimentos independientes por duplicado.

Para descartar posibles interacciones del transposón en el plásmido de la fusión pRSecpA, se extrajeron los plásmidos de las cepas candidatas y su perfil electroforético se comparó con el del plásmido original extraído de *E. coli* DH5- α o de *C. rodentium* $\Delta lacZ::Cm/\Delta hns/pRSecpA$. La cepa *C. rodentium* $\Delta lacZ::Cm/\Delta hns$ sin el plásmido de la fusión fue incluida como control del perfil de plásmidos de *C. rodentium* (**Figura 24**). Se observó que el patrón plasmídico de las cepas candidatas 11^a, 12B, 28B y 30B, fue similar al de la cepa $\Delta lacZ::Cm/\Delta hns/pRSecpA$; sin embargo, el patrón de la muestra proveniente de la cepa 11B, la cual es la menos activa de las mutantes (**Figura 23**), fue distinto quizá reflejando la pérdida de la fusión transcripcional, una menor cantidad del mismo plásmido o a una alteración de su tamaño provocado por una inserción (**Figura 24**), por lo cual este último fue descartado.

Para determinar la identidad de los genes interrumpidos por el transposón en las mutantes seleccionadas, cada sitio de inserción se secuenció directamente de DNA genómico purificado de las cepas 11^a, 12B, 28B y 30B.

El análisis de las secuencias obtenidas reveló que el transposón se insertó en:

- ROD_31831 (**ver anexo 2^a**), anotado como un pseudogen de 633 pb, se encuentra dentro de la isla genómica 9 (IG9) de *C. rodentium* (Petty *et al.*, 2009) entre los genes *espN2-1* (corriente arriba) y *lifA2* (corriente abajo). *espN2-1* es un pseudogen que pudiera codificar para una proteína sustrato del SST3 y *lifA2* para una proteína parecida a LifA (*lymphocyte inhibitory factor A*), que es un regulador de la colonización bacteriana, proliferación

celular de las criptas intestinales y regeneración celular no solo en *C. rodentium*, sino también en otros patógenos A/E (Klapproth *et al.*, 2005).

- ROD_42451 (**ver anexo 2B**), anotado como codificante de una lipoproteína putativa de 100 aminoácidos que se encuentra entre genes que codifican para una acil-transferasa y una glicina-tRNA sintetasa.
- ROD_00801 (**ver anexo 2C**), corresponde al gen *leuC*, uno de los genes del operón de la síntesis de leucina.
- ROD_20811 (**ver anexo 2D**), codifica potencialmente para un autotransportador que puede ser una proteína de virulencia expuesta sobre la superficie bacteriana y se encuentra entre genes que codifican para proteínas hipotéticas.

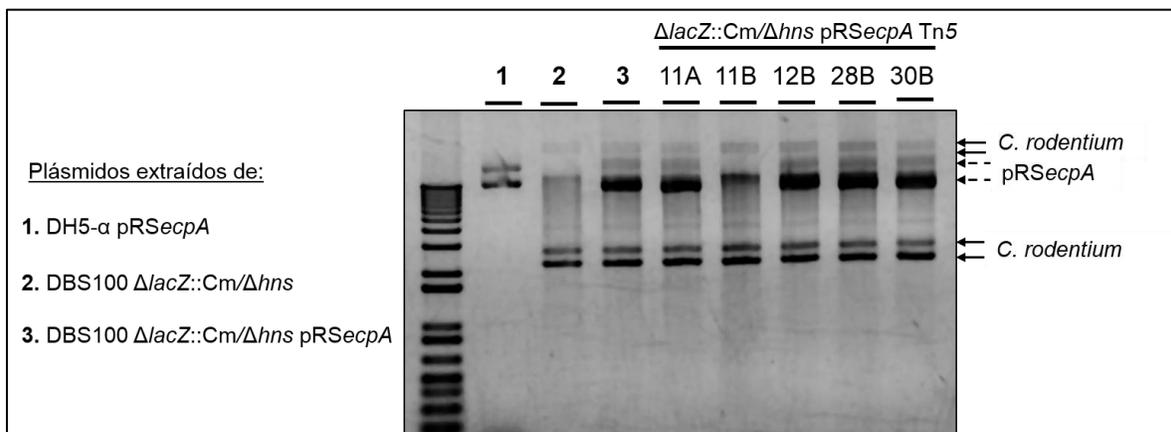


Figura 24 | Perfil de plásmidos de las cepas candidatas resultantes de la mutagénesis al azar con mini Tn5. Los plásmidos fueron extraídos por mini-prep por la técnica de lisis alcalina y se resolvieron en un gel de agarosa al 1% y se observaron por tinción con bromuro de etidio. La imagen es un resultado representativo.

El siguiente paso es la generación de las mutantes en cada uno de estos genes para verificar si están implicados o no en la regulación del operón fimbrial *ecp*. Así como también continuar con la mutagénesis al azar para alcanzar una cobertura del genoma de por lo menos 5 veces o hasta que se empiecen a obtener mutantes en genes esperados como *creR* o *himA*.

7.6 ECP y CreR no están implicados en la formación de biopelícula por *C. rodentium*

Muchas bacterias usan di-GMP-c como segundo mensajero, el cual a través de proteínas efectoras o incluso RNAs, regula procesos como la movilidad, la adhesión, la formación de biopelícula o incluso la expresión de genes de virulencia (Johnson y Clegg, 2010, Spurbeck *et al.*, 2012). Se sabe que a concentraciones bajas de di-GMP-c se promueve la movilidad porque son condiciones permisivas para la expresión del flagelo, mientras que a concentraciones altas se promueve la adhesión, principalmente al permitir la expresión de fimbrias y exopolisacáridos.

ECP se ha implicado en la formación de biopelícula por bacterias como UPEC y EHEC (Lehti *et al.*, 2010; Saldaña *et al.*, 2014); mientras que CreR, al ser potencialmente una fosfodiesterasa, podría verse implicada en estos eventos. A su vez, se ha observado que *C. rodentium* forma biopelícula a 25°C y 37°C (Coulthurst *et al.*, 2007, Bhullar *et al.*, 2015).

Para determinar si el operón *ecp* o la FDE CreR participan en la generación de este fenotipo, se realizaron ensayos en diferentes medios de cultivo para definir la mejor condición en la que *C. rodentium* forma biopelícula *in vitro*. Los medios probados fueron LB, LB/Agua 1:1, DMEM y LB sin NaCl (LB-NS) (Ver **Materiales y métodos**). En estos ensayos se observó que en los medios LB y LB/Agua 1:1 *C. rodentium* no forma biopelícula a los 5 días; sin embargo, en DMEM y LB-NS la biopelícula sí pudo cuantificarse, siendo más robusta en LB-NS.

Utilizando estos dos últimos medios de cultivo y en las mismas condiciones ensayadas (Ver **Materiales y métodos**) se realizó una cinética de formación de biopelícula con la cepa WT durante cinco días a 30°C (**Figura 25**). En DMEM se registró un nivel de formación de biopelícula basal que se mantuvo constante durante los cinco días del ensayo, mientras que en LB-NS se registró un aumento

significativo después de tres días, por lo cual decidimos seguir trabajando con LB-NS.

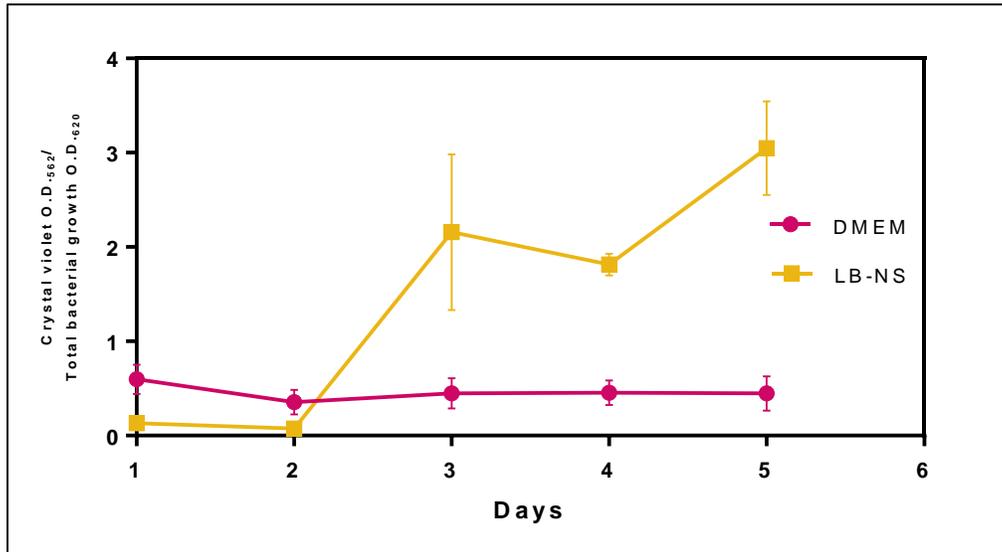


Figura 25 | Cinética de formación de biopelícula por *C. rodentium*. Se siguió formación de biopelícula durante cinco días en DMEM y LB-NS a partir de cultivos estáticos en placas de 96 pozos a 30°C. Las barras de error representan las desviaciones estándar de la biopelícula formada en tres ensayos independientes.

Una vez determinadas las condiciones permisivas para la formación de biopelícula por *C. rodentium*, evaluamos el papel del operón fimbrial *ecp* y de la FDE CreR en la generación de este fenotipo analizando el comportamiento de las cepas *C. rodentium* WT, $\Delta ecpA$, $\Delta ecpD$, $\Delta creR$, $\Delta creR$ pT3 (control) $\Delta creR$ pT3-*creR*-FLAG y WT pT3-*creR*-FLAG (**Figura 26**).

No se observó una diferencia significativa entre las mutantes y la cepa silvestre; sin embargo, cuando las cepas WT o $\Delta creR$ expresan CreR a partir del plásmido pT3-*creR*-FLAG, los niveles de formación de biopelícula disminuyeron considerablemente en ambos casos.

Si bien CreR no es un regulador clave en la formación de biopelícula, dado que no hay cambios significativos entre la cepa WT y $\Delta creR$, el fenotipo causado por su sobre expresión concuerda con el papel esperado para una fosfodiesterasa, la

cual al disminuir las concentraciones de di-GMP-c afectan, entre otros fenotipos, la formación de biopelícula favoreciendo el estado planctónico (Johnson *et al.*, 2010).

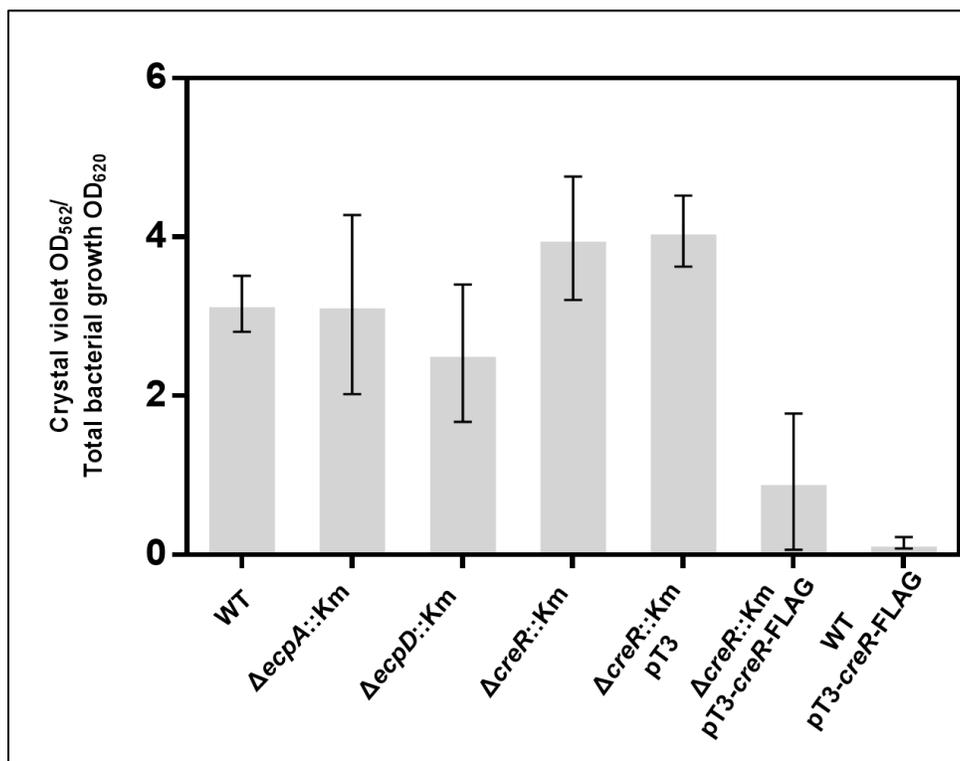


Figura 26 | ECP no participa en la formación de biopelícula y aunque CreR no es un regulador clave en su formación, su sobreexpresión la inhibe. La formación de biopelícula se determinó usando el medio LB-NS (sin NaCl), a 30°C y en condiciones estáticas, y fue analizada después de 5 días. Las barras de error representan las desviaciones estándar de la biopelícula formada en tres experimentos independientes.

El crecimiento en LB conteniendo NaCl reprime la expresión de *ecp*, pero su actividad no había sido analizada en LB sin sal (LB-NS), condiciones que favorecen la formación de biopelícula por *C. rodentium*, por lo que cuantificamos la actividad específica CAT a partir de muestras de cultivos en este medio de las cepas WT, $\Delta creR$ y $\Delta creR/pT3-creR-FLAG$ conteniendo la fusión *pecpA-1* (**Figura 27**). Interesantemente, el crecimiento en LB-NS ejerce un fuerte efecto represor sobre la expresión del *ecpAp* aun en presencia del pT3-creR-FLAG, situación que podría estar enmascarando una posible participación de ECP en la formación de biopelícula. En contraste, el crecimiento en DMEM a 30°C induce pobremente la formación de biopelícula a pesar de ser condiciones que favorecen la expresión de ECP (ver antecedentes); sin embargo, queda por verse si bajo estas condiciones

de baja producción de biopelícula ECP pudiera estar involucrada o si se pueden definir condiciones que favorezcan tanto la expresión de ECP como la formación de biopelícula.

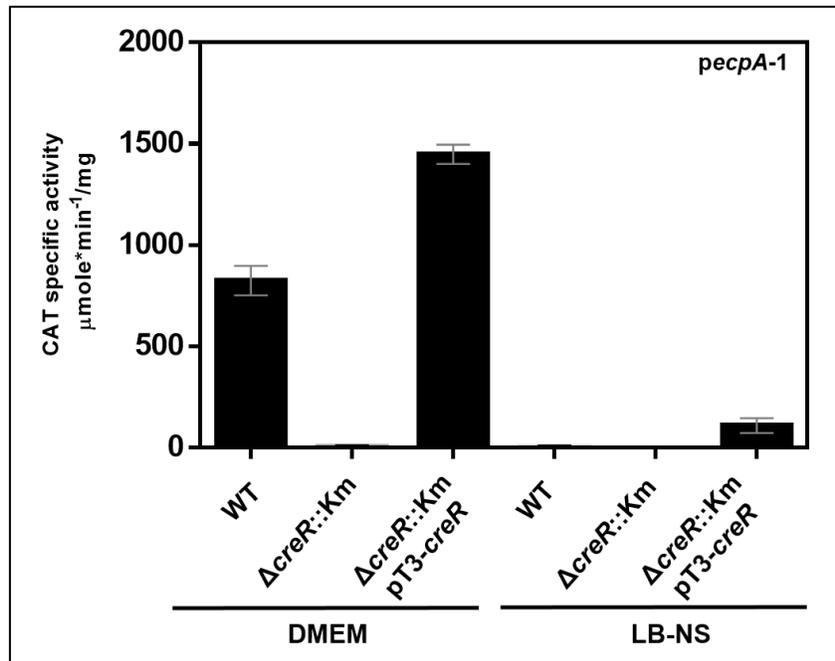


Figura 27 | ECP no se expresa en las condiciones donde *C. rodentium* forma biopelícula. Actividad específica de CAT a partir de muestras de cultivos en DMEM y LB sin NaCl (LB-NS) de las cepas indicadas de *C. rodentium* conteniendo la fusión transcripcional *pecpA-1*. Se utilizaron 5 ml de medio LB-NS y DMEM, a 30°C en condiciones de crecimiento estático por 14 horas. Las barras de error representan las desviaciones estándar de la actividad de dos experimentos independientes donde cada muestra se incluyó por duplicado.

7.7 El sistema ECP-CreR no está involucrado en el proceso de colonización en ratón

Previamente se había determinado que ECP de *C. rodentium* no participa en la colonización intestinal de ratón (Martínez-Santos, datos no publicados). En este experimento se comparó la cinética de colonización de las mutantes en los genes *ecpA*, *ecpD*, y como control *ler*, comparadas con la cepa WT de *C. rodentium*. Se observó que la cinética de colonización de $\Delta ecpA$ y $\Delta ecpD$ fue similar a la de la cepa WT, contrario a la cinética característica de la mutante en *ler*, en la que la colonización se encuentra abatida (Martínez-Santos, datos no publicados). Si bien,

ECP no juega un papel relevante en la colonización, no se ha descartado su participación en eventos del ciclo infeccioso como la transmisión.

Con base en las características predichas *in silico* para CreR, donde se muestra un dominio EAL, se analizó si ésta presunta FDE participa en colonización mediante un ensayo de infección en ratón con las cepas WT, $\Delta creR::Km$, $\Delta creR::Km/pT3-creR-FLAG$ y $\Delta ler::Km$, la cual fue incluida como control de una cepa atenuada.

La cinética de colonización se llevó a cabo determinando, cada dos días, las UFCs por gramo de heces de ratones infectados durante 21 días (**Figura 28**). La cepa WT siguió una cinética típica en donde el pico máximo de colonización y proliferación se estableció entre los días 6-10 post-inoculación. Por su parte, la cepa mutante en *creR* tuvo una cinética de colonización semejante a la mostrada por la cepa WT, mientras que la cepa complementada que sobreexpresa CreR a partir de un vector multicopia, se retrasó ligeramente en los primeros días post-inoculación, pero alcanzó los mismos niveles de colonización que la cepa WT después de 6 días siguiendo entonces una cinética muy similar. Dicho retraso se debe probablemente a la carga metabólica que implica replicar el plásmido y producir la proteína, o al efecto que la sobre expresión de la FDE pudiera tener sobre la expresión de elementos importantes para el proceso de colonización. En apoyo a estas posibilidades, la recuperación mostrada por esta cepa después de 6 días coincide con que las bacterias aparentemente pierden el plásmido, ya que bacterias recuperadas de las heces ya no crecen en Tc, además de que éste ya no es detectable por PCR.

En su conjunto estos resultados indican que CreR no participa en el proceso de colonización en ratones machos de la línea C57BL/6, aunque sería relevante evaluarlo en otras líneas de ratón también susceptibles a la infección por *C. rodentium* o en ratones neonatos que son más susceptibles.

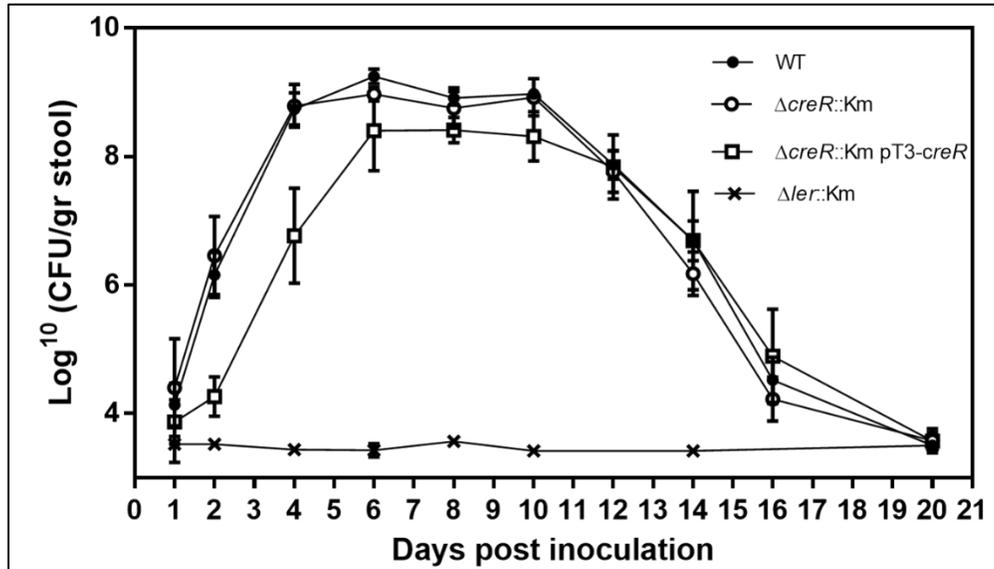


Figura 28. CreR no está involucrada en el proceso de colonización en ratón. Grupos de ratones machos de la línea C57BL/6 de 4 a 5 semanas de edad se inocularon con $\sim 5 \times 10^7$ UFC's de la cepa WT, $\Delta creR::Km$, $\Delta creR::Km/pT3-creR-FLAG$ y $\Delta ler::Km$. En la gráfica se muestran los promedios y errores estándar (indicados con barras de error) de las UFC's por gramo de heces de cada grupo de ratones en los días indicados posteriores a la inoculación.

8. DISCUSIÓN

El operón *ecp* que codifica para la fimbria ECP está presente en cepas patógenas y no patógenas de *E. coli*, así como en otras bacterias entéricas (Rendón *et al.*, 2007), tiene características muy particulares en cuanto a su expresión y aparente participación como factor de colonización en diferentes nichos o ambientes, por lo cual ha sido de interés estudiar el mecanismo molecular que modula su expresión, así como su papel durante la infección en el hospedero. Ortólogos del operón *ecp* con diferentes porcentajes de identidad están presentes en otras enterobacterias de interés médico (**Figura 7**), sin embargo, destaca la ausencia del gen que codifica para la proteína reguladora EcpR al inicio del operón, así como de algunos otros genes como el que codifica para la proteína acomodadora. En particular, aunque con un significativo grado de divergencia, el operón *ecp* está conservado en *C. rodentium*, un patógeno de ratón de laboratorio que ha sido ampliamente utilizado como modelo de estudio para investigar los mecanismos de virulencia de las bacterias pertenecientes a la familia A/E como EPEC y EHEC. Dado el interés de nuestro grupo en estos patógenos y en el estudio de las fimbrias como factores importantes para la adhesión, en este trabajo abordamos diferentes aspectos de la regulación y función de ECP en *C. rodentium*.

A pesar de que esta bacteria comparte el 67% de su genoma con los patógenos A/E EPEC y EHEC (Petty *et al.*, 2009), incluyendo la IP LEE que codifica para los genes responsables de la lesión A/E, los genomas exhiben importantes diferencias que podrían relacionarse, entre otras cosas, con la especificidad del hospedero o características propias del ciclo de vida de la bacteria.

En *C. rodentium*, los genes ROD_29201-29241 comparten la misma organización que los genes del operón *ecpABCDE* de *E. coli*, y sus productos una identidad que va del 35% al 48%, lo cual refleja el grado de divergencia que el operón ha adquirido entre estas dos bacterias. Más aún, el ortólogo del gen *ecpR*, que codifica para el activador transcripcional, no se encuentra al principio del operón

como en *E. coli*, sino al final de éste, en sentido opuesto y separado por el gen ROD_29251, el cual hemos nombrado *creR* por el rol esencial que juega en la activación de *ecp* de *C. rodentium*. Por su parte, el gen ortólogo de *ecpR* no está implicado en la regulación de la expresión del operón e incluso no se expresa en las condiciones permisivas para la expresión del operón *ecp* en esta bacteria (Martínez-Santos, datos no publicados, Escalera-Maurer, 2012).

Por su parte, el gen *creR* no tiene ortólogos cercanos en *E. coli*; sin embargo, la predicción *in silico* de dominios funcionales para la posible proteína codificada por este gen, revela la presencia de un dominio EAL conservado, representado por los residuos EIL, sin la existencia de dominios adicionales conocidos, tales como CSS, BLUF o HTH que se han encontrado en otras fosfodiesterasas y que están relacionados con la función del dominio N-terminal y/o el reconocimiento de señales.

La activación del *ecpAp* mediada en forma específica por CreR, depende de un elemento de alrededor de 20 pb localizado entre las posiciones -378 a -358, con respecto al inicio de la transcripción, donde las posiciones -373 a -364 son esenciales para que pueda llevarse a cabo la expresión (**Figuras 15 y 16**). Dicho elemento denominado DRE es un sitio distal que proponemos como una secuencia específica para el pegado de un regulador transcripcional que actúa como efector para la actividad de CreR. Resulta interesante que para el caso de *E. coli*, EcpR actúa uniéndose a un elemento distal caracterizado por una secuencia repetida directa en la región reguladora de *ecp* (Martínez-Santos *et al.*, 2012); sin embargo, en el caso del DRE de *C. rodentium* a pesar de coincidir en ser un elemento distal requerido para la activación, no presenta secuencias palindrómicas o repetidas directas. Las diferencias encontradas entre los mecanismos que regulan estos operones no es ninguna sorpresa, ya que las regiones reguladoras son altamente variables y los porcentajes de identidad/similitud de las proteínas van del 35% al 48% (**Figura 12**).

La presencia y características del DRE nos orientan hacia la existencia de una proteína capaz de unirse a distancia y regular la expresión del operón de manera positiva. Como CreR parece no tener dominios de unión a DNA, creemos que existe otra molécula que es capaz de unirse al DRE y de responder a los cambios en las concentraciones de di-GMP-c dependientes de CreR. En este modelo, a través de inducir un doblamiento en el DNA, IHF media el acercamiento de esta proteína hipotética hacia la región promotora de *ecp* en donde, además de contrarrestar la represión mediada por H-NS, tiene un papel esencial en la activación del promotor (**Figura 29**).

El hecho de que CreR tenga un dominio de FDE, vincula a ECP con la regulación por di-GMP-c. Esta molécula es un segundo mensajero clave en la regulación de procesos como movilidad, adherencia, formación de biopelícula, producción de curli y síntesis de celulosa, por lo que los niveles intracelulares de di-GMP-c determinan la transición entre el estado planctónico y sésil de una bacteria (Spurbeck *et al.*, 2012). Está bien documentado que cuando las concentraciones de di-GMP-c son altas, la bacterias tienden a formar biopelícula, así como a sintetizar componentes tales como fimbrias y exopolisacáridos que favorecen la adhesión (Jhonson y Clegg, 2010).

Tal como es esperado para una FDE, la sobreexpresión de CreR disminuye los niveles de biopelícula (**Figura 26**), lo cual sugiere que su dominio EAL sea funcional, es decir, que sea capaz de hidrolizar di-GMP-c para convertirlo en pGpG; sin embargo, los ensayos de formación de biopelícula y colonización en ratón nos indican que, al menos en las condiciones probadas en este estudio, CreR al parecer no participa en estos procesos (**Figura 28**). En su conjunto, estos resultados apuntan a la existencia de un sistema de regulación muy específico en el que se encuentra CreR, una DGC hipotética, el DRE y, por lo menos, una proteína con un dominio de unión a DNA capaz de detectar cambios en las concentraciones locales de di-GMP-c y en consecuencia de activar el operón.

El mecanismo molecular de la acción del di-GMP-c dentro de una célula y el repertorio completo de elementos blancos y efectores, aún se encuentra escasamente entendido. Las proteínas efectoras más estudiadas son BcsA y YcgR, una subunidad de la celulosa sintasa y una proteína que interactúa con las proteínas flagelares FliG y FliM, respectivamente (Paul *et al.*, 2010). Ambas proteínas contienen un dominio PilZ C-terminal de aproximadamente 100 aminoácidos que está involucrado en la unión altamente específica de di-GMP-c (Ryjenkov *et al.*, 2006). Múltiples proteínas con dominio PilZ se encuentran en algunas bacterias; sin embargo, muchas enterobacterias, incluida *C. rodentium*, contienen solo estas dos proteínas BcsA y YcgR (**Figura 9**), pero ninguna de las dos está involucrada en la cascada de regulación del operón fimbrial *ecp* (Martínez-Santos, datos no publicados).

Poco se sabe de otras moléculas capaces de unir y responder al di-GMP-c, pero se han descrito factores transcripcionales, DGC's o FDE's con dominios enzimáticamente inactivos pero que conservan la capacidad de unión de di-GMP-c (Spurbeck *et al.*, 2012) y *riboswitches* (Ryan *et al.*, 2012). *C. rodentium* no tiene *riboswitches* que respondan a di-GMP-c (Amikan y Galperin, 2006) como los que han sido reportados en otras bacterias (Bordeleau *et al.*, 2015); sin embargo, tiene un repertorio de doce proteínas catalogadas como FDEs (entre las que se encuentra CreR), ocho DGCs y siete que parecen tener acción dual (**Figura 9**) (Amikan y Galperin, 2006), aunque no se sabe si todas éstas son enzimáticamente activas.

Adicionalmente, se han descrito nuevos efectores de la señalización por di-GMP-c, como receptores que tienen un sitio-I como el de las DGCs pero carecen del motivo GGDEF, y sin embargo llevan a cabo una función reguladora como PeID de *P. aeruginosa* (Lee *et al.*, 2007). Incluso se han descrito FDEs con dominios degenerados (LapD de *P. fluorescens*) que conservan la capacidad de unir di-GMP-c y participan en una cascada de regulación que involucra otras proteínas, especialmente proteínas de membrana (Newell *et al.*, 2009). También se ha

descrito un nuevo dominio de unión a di-GMP-c llamado GIL en la proteína BcsE de *E. coli* (que también está presente en el ortólogo de *C. rodentium* (Amikan y Galperin, 2006)) con un motivo RxGD, donde los residuos adyacentes tienen la misma estructura secundaria predicha para un dominio GGDEF e, incluso, alinea con el motivo conocido para el sitio-I de las DGCs. Es sumamente interesante el ejemplo anterior, ya que estos dominios pueden tener un origen común o ser producto de la evolución convergente (Fang *et al.*, 2014).

Más aún, una proteína efectora de estos sistemas puede tener un sitio de unión para di-GMP-c combinado con motivos variados de señalización que producen diversas respuestas celulares en respuesta a este segundo mensajero. Hemos planteado que la proteína reguladora que buscamos por mutagénesis debería tener características de un regulador transcripcional, a la vez de ser capaz de responder a las concentraciones cambiantes de di-GMP-c. En este sentido, hay ejemplos de proteínas con estas características e incluso FDEs que son enzimáticamente activas y funcionan, además, como reguladores transcripcionales. Tal es el caso de PdeL una FDE con un dominio de unión a DNA tipo LuxR que puede unirse a DNA, y PdeR que tiene un dominio PAS y la capacidad de unirse a factores de transcripción (Hengge, 2016). Por lo anterior, no se descarta que CreR sea parte de una cascada que involucra un conjunto de proteínas con diversas características.

Con respecto a la búsqueda del regulador hipotético, a la fecha se han analizado 3000 mutantes entre las que se identificaron cuatro genes candidatos: *ROD_31831* anotado como un “pseudogen”, *ROD_42451* que codifica para una “lipoproteína putativa”, *ROD_00801* que es “*leuC*” y *ROD_20811* que codifica para un “autotransportador putativo de membrana externa”, los cuales tienen que ser evaluados en detalle ya que codifican para proteínas de funciones diversas no coincidentes con lo esperado.

La regulación a distancia es un tema común en células animales, donde secuencias conocidas como *enhancers* facilitan el reclutamiento o ensamble de la maquinaria de transcripción basal alrededor del promotor, aumentando su tasa de transcripción independientemente de su posición y orientación con respecto a los genes blanco (Kim y Shiekhattar, 2015). En bacterias la expresión de algunos genes depende de una secuencia tipo *enhancer*, localizada en promedio de 100 a 150 pb del inicio de transcripción, que a su vez se asocia a promotores que son reconocidos por el factor sigma 54 de la RNA polimerasa. Este complejo transcripcional cerrado sólo se activa tras la interacción directa entre la EBP ("*enhancer binding protein*") y el factor sigma 54 y la hidrólisis de ATP, lo que se facilita mediante la curvatura de DNA inducida por IHF (Xu y Hoover, 2001, Bulger y Groudine, 2011). A pesar de las similitudes que presenta el mecanismo de regulación del operón *ecp* de *C. rodentium* con el de promotores activados por sigma 54, tales como el requerimiento de IHF y de un elemento de regulación distal, éste posee características distintivas como la poco común lejanía del DRE (alrededor de 350 pb con respecto al inicio de la transcripción) y el requerimiento de una proteína con potencial actividad de FDE. Lo anterior, lo establece como un modelo de estudio novedoso que ofrece la oportunidad de aportar conocimiento original en el campo de la regulación genética en bacterias y del di-GMP-c como molécula de señalización (**figura 29**).

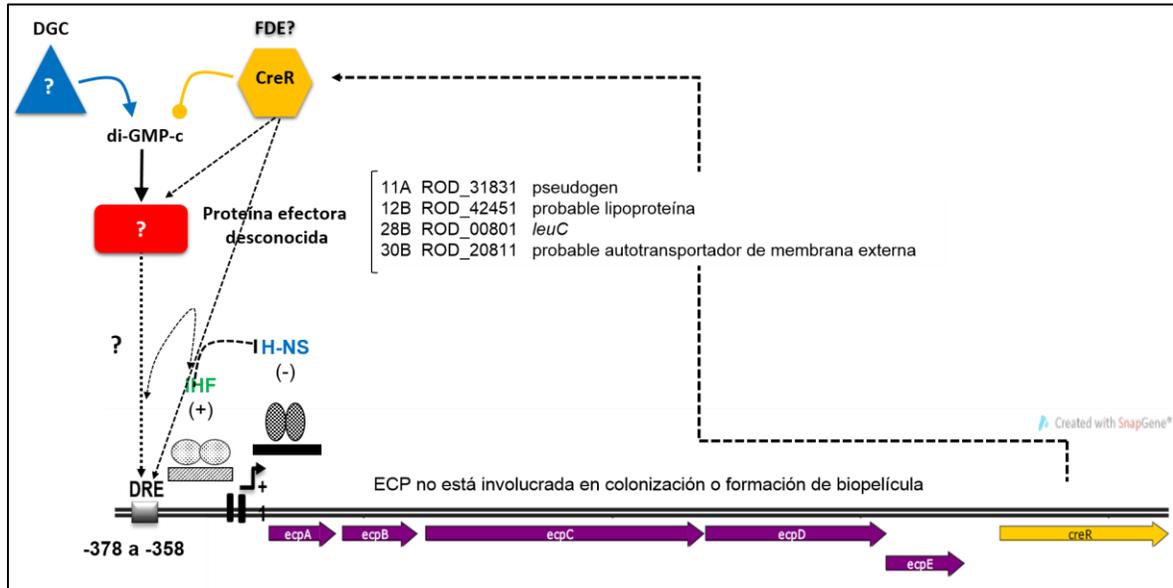


Figura 29 | Modelo de la regulación del operón fimbrial *ecp* de *C. rodenium*. El operón fimbrial *ecp* de *C. rodenium* conserva la organización de los genes *ecpA-ecpE* como en *E. coli* pero es regulado positivamente por CreR, cuyo gen se encuentra corriente abajo del mismo operón y del cual no se ha encontrado un ortólogo cercano en *E. coli*. En la región reguladora de *ecp* se encuentra una secuencia a la que hemos llamado DRE, que es esencial para la activación de la transcripción de *ecp* y que, proponemos, es el sitio de unión de una proteína reguladora positiva de este sistema. Los reguladores globales IHF y H-NS regulan la expresión de *ecp* de manera positiva y negativa, respectivamente. Probablemente, IHF induce un doblamiento del DNA lo que permite acercarse a la proteína que se une al DRE al promotor, contrarrestando la acción represora de H-NS y, además, favoreciendo el inicio de la transcripción. Nosotros proponemos que CreR es una FDE activa que tiene una DGC, aún no identificada, como contraparte, y que ambas son capaces de regular los niveles de di-GMP-c que son detectados por una proteína efectora con capacidad de unión al DNA, específicamente al DRE, para activar la transcripción del operón *ecp*. Para la elaboración de la imagen se utilizó el software SnapGene (GSL Biotech; disponible en snapgene.com).

9. CONCLUSIONES

1. La expresión del operón *ecp* de *C. rodentium* se favorece durante la fase exponencial tardía/estacionaria temprana de crecimiento, aunque en ausencia de H-NS comienza a expresarse desde fases tempranas.
2. La activación del *ecpAp* es dependiente de un elemento de regulación distal (DRE) localizado a -378 pb del inicio de transcripción, así como de una posible FDE denominada CreR.
3. CreR es esencial aun en ausencia de H-NS, y actúa en forma cooperativa con IHF.
4. El operón *ecp* se expresa en *E. coli* K-12 sólo en presencia de CreR y con el DRE intacto, por lo que CreR es funcional en este fondo genético donde no se ha encontrado un ortólogo cercano.
5. La sobre-expresión de CreR afecta negativamente a la formación de biopelícula, tal como se esperaría para una fosfodiesterasa.

10. PERSPECTIVAS

Continuar el análisis de mutantes obtenidas con el Tn5 para identificar otras proteínas involucradas en la regulación de *ecp* y confirmar las mutantes ya obtenidas.

Purificar CreR y analizar la actividad de FDE mediante métodos bioquímicos para analizar si puede hidrolizar di-GMP-c.

Identificar por mutagénesis dirigida dominios o residuos funcionales en CreR involucrados en la actividad de FDE y en la activación de *ecpAp* que nos den información acerca de su actividad.

Evaluar la posible interacción de CreR con el promotor *ecpAp* para determinar si podría ser de manera directa la activación de *ecpAp* mediada por CreR.

Identificar posibles interacciones entre CreR y otras proteínas mediante experimentos tipo *pull down* y proteómica para encontrar elementos de la vía de regulación de *ecpAp* cuyo efecto sea a través de la interacción proteína-proteína con CreR.

Identificar otros genes regulados por CreR mediante transcriptómica y/o proteómica que estén implicados en la regulación de *ecp* o en otras vías.

Analizar el papel de la fimbria ECP en el proceso de transmisión de la infección en el ratón.

11. ANEXOS

1. Medios de cultivo y soluciones

Medio LB

Triptona 1% w/v (10 g por litro)

Extracto de levadura 0.5% w/v (5 g por litro)

NaCl 1% w/v (10 g por litro)

Ajustar el pH 7.4

Agar LB

Medio líquido LB más Bacto Agar 1.5% w/v (15 g de por litro)

Medio mínimo + Glucosa

KCl 4.82 mM (0.36 g por litro)

(NH₄)₂SO₄ 7.41 mM (0.98 g por litro)

K₂SO₄ 4.93 mM (0.86 g por litro)

KH₂PO₄ 1 mM (0.136 g por litro)

Casaminoácidos 1 g por litro

Tris-HCl 0.1 M (Tris-HCl 2M pH 7.5 50 ml por litro)

MgCl₂ 0.2 mM (MgCl₂ 1M 200 µl por litro)

Glucosa 0.48% w/v (Glucosa 20% 24 ml por litro)

Ajustar el pH 7.5

Medio SOB

Bacto triptona 2% w/v (20 g por litro)

Extracto de levadura 0.5% w/v (5 g por litro)

NaCl 0.05% w/v (0.5 g por litro)

KCl 2.5 mM (KCl 1M 2.5 ml por litro)

Medio SOC

Medio SOB más

MgCl₂ 10 mM (MgCl₂ 1M 10 ml por litro)

MgSO₄ 10 mM (MgSO₄ 1M 10 ml por litro)

Glucosa 20 mM (3.6 g por litro)

Agar MacConkey

Agar MacConkey 5% w/v (50 g por litro)

Buffer DTT

Tris-HCl 50 mM (Tris-HCl 1 M 50 ml pH 7.8 por litro)

Ditiotereitol 30 μM (DTT 1 M 30 μl por litro)

Mezcla de reacción para CAT

Acetil-CoA 0.1 mM

Cloranfenicol 0.1 mM

5,5'-ditio-bis 2-ácido nitrobenzoico (DNTB sigma) 1 mM

Disolver en Tris HCl 0.1 M pH 7.8

Sample buffer

Glicerol 50% v/v (25 ml para un volumen final de 50 ml)

SDS 4% w/v (SDS 20% 10 ml para un volumen final de 50 ml)

Tris HCl 200 mM pH 6.8 (Tris-HCl 1 M pH 6.8 10 ml para un volumen final de 50 ml)

β-mercaptoetanol 10% v/v (5 ml para un volumen final de 50 ml)

Azul de bromofenol 0.04% w/v

Buffer de transferencia

Tris-HCl 37 mM (2.91 gr para 0.5 litros)

Glicina 39 mM (1.465 g para 0.5 litros)

SDS 0.037% w/v (SDS 20% 0.937 ml para 0.5 litros)

Metanol 20% v/v (100 ml para 0.5 litros)

PBS-Tween (PBS-T)

PBS 10X 10% v/v (PBS 10x 100 ml por litro)

NaCl 0.5 M w/v (NaCl 5 M 100 ml por litro)

Tween-20 0.1% v/v (1 ml por litro)

TBS-Tween (PBS-T)

Tris-HCl 48 mM (7.56 g por litro)

NaCl 150 mM (8.76 g por litro)

Tween-20 0.1% v/v (1 ml por litro)

Ajustar el pH a 7.5

Amortiguador Z

K₂HPO₄ 0.461 M (40.21 g para 0.5 litros)

KH₂PO₄ 0.202 M (13.8 g para 0.5 litros)

NaCl 0.065 M (1.9 g para 0.5 litros)

MgSO₄ 10 mM (0.61 g para 0.5 litros)

Ajustar el pH 7

Solución A para la determinación de la actividad β-galactosidasa

Amortiguador Z 32.67% v/v (32.67 ml para 100 ml)

β-mercaptoetanol 0.00114% (114 μl para 100 ml)

Tritón 0.22% v/v (Tritón 10% 2.2 ml para 100 ml)

Lisozima 0.264 mg/ml (Lisozima 12 mg/ml 2.2 ml para 100 ml)

Solución B

O-nitrofenil beta D-galactopiranosido (ONPG) 3.3 mM (0.099 g para un volumen de 100 ml de agua)

Soluciones para cuantificar proteínas

Solución A

CuSO₄ 5H₂O 67 μM (0.845 g para 50 ml)

Solución B

Tartrato de sodio y potasio 120 μM (1.69 g para 50 ml)

Solución C

Na₂CO₃ 0.29 mM (30.8 g)

NaOH 0.154 mM (6.16 g)

Disolver en agua y aforar a 1 litro

Solución D

Solución A 1% v/v

Solución B 1% v/v

Solución C 98% v/v

Solución E

Folin ciocalteu's phenol reagent (sigma) 11.83 ml

Agua 70 ml

2. Inserciones del transposón mTn5 en el genoma de *C. rodentium*

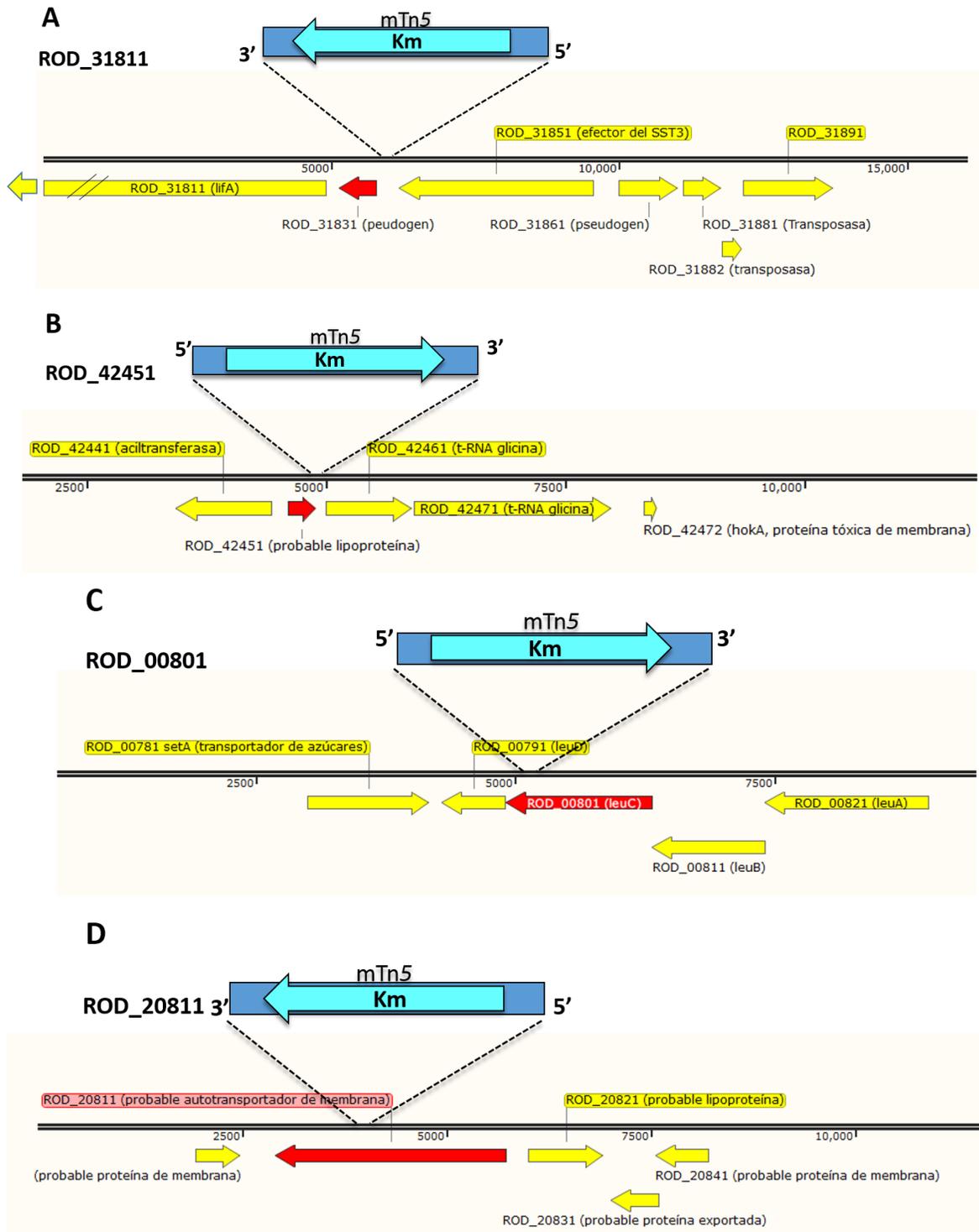


Figura 30 | Sitios de inserción de mTn5 en el genoma de *C. rodentium*. En una primera etapa de la mutagénesis al azar, se encontraron cuatro genes diferentes interrumpidos por el transposón mTn5 que posiblemente podrían estar involucrados en la regulación del operón *ecp*. Para la elaboración de la imagen B se utilizó el software SnapGene (GSL Biotech; disponible en snapgene.com).

12. Referencias

1. Alcántar-Curiel MD, Blackburn D, Saldaña Z, Gayosso-Vázquez C, Lovine NM, De la Cruz MA, Girón JA. (2013). Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation, *Virulence*, 4:129-138.
2. Alexeyev MF, Shokolenko IN, Croughan TP. (1995). New mini-Tn5 derivatives for insertion mutagenesis and genetic engineering in Gram-negative bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 41:1053-1055.
3. Amikan D, Galperin M. (2006). PilZ domain is part of the bacterial c-di-GMP binding protein. *Bioinformatics*, 22:3-6.
4. Bhullar K, Zarepour M, Yu Hongbing, Yang Hong, Croxen M, Stahl M, Finlay BB, Turvey S, Vallance BA. (2015). The serine protease autotransporter Pic modulates *Citrobacter rodentium* pathogenesis and its innate recognition by the host. *Infection and Immunity*, 83:2636-2650.
5. Black R, Cusens S, Jhonson H, Lawn J, Rudan I, Bassani D, Jha P, Cambell H, Walker CF, Cibulskis R, Eisele T, Liu L, Mathers C. (2010). Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. *Lancet*, 375:1969–87.
6. Borenshtein D, McBee M, Schauer D. (2008). Utility of the *Citrobacter rodentium* infection model in laboratory mice. *Current Opinion in Gastroenterology*, 24:32–37.

Bordeleau E, Purcell E, Lafontaine D, Fortier LC, Tamayo R, Burrus V. (2015). Cyclic di-GMP riboswitch-regulated type IV pili contribute to aggregation of *Clostridium difficile*. *Journal of Bacteriology*, 197:819-832.
7. Brosius J. (1984). Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene*, 27:151-160.
8. Bulger M, Groudine M. (2011). Functional and mechanistic diversity of distal transcription enhancers. *Cell*. 144:327-339.
9. Busch A, Waksman G. (2012). Chaperone–usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Philosophical Transactions of the Royal Society Biological Sciences*, 367:1112–1122.
10. 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. *Molecular Microbiology*, 39:664-678.
11. 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). *Journal of Bacteriology*, 197:1478-1491.
12. Caballero-Flores G. (2016). Análisis de la función y regulación del operón fimbrial *gcfFGABCDE* de *Citrobacter rodentium*. Tesis de Doctorado. Cuernavaca, Morelos, Instituto de Biotecnología-UNAM.
13. Casadaban MJ. 1976. Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage lambda and Mu. *Journal of Molecular Biology*, 104:541-555.

-
14. Clegg S, Wilson J, Johnson J. (2011). More than one way to control hair growth: regulatory mechanism in enterobacteria that affect fimbriae assembled by the chaperone/usher pathway. *Journal of Bacteriology*, 193:2081-2088.
 15. Collins J, Keeney K, Crepin V, Rathinam V, Fitzgerald K, Finlay B, Frankel G. (2014). *Citrobacter rodentium*: infection, inflammation and the microbiota. *Nature Reviews Microbiology*, 12:612–623.
 16. Coulthurst S, Clare S, Evans T, Foulds I, Roberts K, Welch M, Dougan G, Salmond G. (2007). Quorum sensing has an unexpected role in virulence in the model pathogen *Citrobacter rodentium*. *EMBO reports*, 8:698-703.
 17. Crepin VF, Collins JW, Habibzay M, Frankel G. (2016). *Citrobacter rodentium* mouse model of bacterial infection. *Nature Protocols*, 11: 1851-1876.
 18. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 26:822-880.
 19. Datsenko K, Wanner B. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 97:6640–6645.
 20. Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, Vázquez 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. . *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 101:3597-3602.
 21. Deng W, Vallance B, Finlay BB. (2001). Locus of Enterocyte Effacement from *Citrobacter rodentium*: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among Attaching and Effacing pathogens. *Infection and Immunity*, 69:6323-6335.
 22. DeVinney R, Knoechel DG, Finlay BB. (1999). Enteropathogenic *Escherichia coli*: celular harassment. *Current Opinion in Microbiology*, 2:83-88.
 23. Dillon SC y Dorman CJ. (2010). Bacterial nucleoid-associated proteins, nucleoid structure and gene expression. *Nature Reviews Microbiology*, 8:185-195.
 24. Donnenberg MS, Kaper JB. (1992). Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 60:3953-3961.
 25. Escalera A. (2012). Análisis de la regulación transcripcional del operón *ecp* de *C. rodentium*. Tesis de licenciatura. Cuernavaca, Morelos, Instituto de Biotecnología, UNAM.
 26. Fang X, Ahmad I, Blanka A, Schottkowski M, Cimmins A, Galperin M, Romling U, Gomelsky M. (2014). GIL, a new c-di-GMP- binding protein domain involved in regulation of cellulose synthesis in enterobacteria. *Molecular Microbiology*, 93:439-452.
 27. Fernández M, Puente JL, Calva E. (2004). OmpR and LeuO positively regulate the *Salmonella enterica* serovar typhi *ompS2* porin gene. *Journal of Bacteriology*, 186:2909–2920.
 28. Flores M, Puente JL, Calva E. (2003). Negative osmoregulation of the *Salmonella ompS1* porin gene independently of OmpR in an *hns* Background. *Journal of Bacteriology*, 185:6497–6506.

-
29. Gaytán M, Martínex-Santos V, Soto E, González-Pedrajo B. (2016). Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6:129.
 30. Garnett J, Martínez-Santos V, Saldaña Z, Pape T, Hawthorne W, Chan J, Simpson P, Cota E, Puente JL, Girón J, Matthews S. (2012). Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 109:3950–3955.
 31. 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*. *Infection and Immunity*, 76:5247–5256.
 32. Hengge R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature Review Microbiology*, 7:263-273.
 33. Hengge R. (2016). Trigger phosphodiesterases as a novel class of c-di-GMP effector proteins. *Philosophical Transactions Royal Society B*, 371 (1707). pii: 20150498.
 34. Hernández C, Aguilera MG, Catro E. (2011). Situación de las enfermedades gastrointestinales en México. *Enfermedades infecciosas y microbiología*, 31:137-155.
 35. Hospenthal MK, Costa TRD, Waksman G. (2017). A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nature Review Microbiology*, 12;15:365-379.
 36. Johnson J, Clegg, S. (2010). Role of MrkJ, a phosphodiesterase, in type 3 fimbrial expression and biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 192:3944–3950.
 37. Kamada N, Sakamoto K, Seo S-U, Zeng MY, Cascalho M, Vallance BA, Puente JL, Nunez G. (2015). Humoral immunity in the gut selectively targets phenotypically virulent attaching-and-effacing bacteria for intraluminal elimination. *Cell Host & Microbe*, 17:617–627
 38. Kaper J, Nataro J, Mobley H. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2:123-140.
 39. Kim TK, Shiekhhattar R. (2015). Architectural and Functional Commonalities between Enhancers and Promoters. *Cell*, 27;162:948-959.
 40. Klapproth JM, Sasaki M, Sherman M, Babbin B, Donnenberg M, Fernandes P, Scaletsky I, Kalman D, Nusrat A, Williams I. (2005). *Citrobacter rodentium* *lifA/efa1* is essential for colonic colonization and crypt cell hyperplasia in vivo. *Infection and Immunity*, 73:1441-1451.
 41. Kotloff KL, Nataro JP, Blackwelder W, Nasrin D, Farag T. (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicentre Study, GEMS): a prospective, case-control study. *Lancet*, 382;9888:209–222.
 42. Lai Y, Rosenshine I, Leong JM, Frankel G (2013). Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*, 15:1796–1808.
 43. Lehti TA, Bauchart P, Heikkinen, J., Hacker, J., Korhonen, T.K., Dobrindt, U., Westerlund-Wikström, B. (2010). Mat fimbriae promote biofilm formation by meningitis-associated *Escherichia coli*. *Microbiology*, 156:2408–2417.

-
44. Lehti TA, Heikkinen J, Korhonen TK, Westernlund-Wistrom B. (2012a). The response regulator RcsB activates expression of Mat fimbriae in meningitic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 194:3475-3485.
 45. Lehti TA, Bauchart P, Dobrindt U, Korhonen TK, Westerlund-Wikström B. (2012b) The fimbriae activator MatA switches off motility in *Escherichia coli* by repression of the flagellar master operon *flhDC*. *Microbiology*, 158:1444–1455.
 46. Lehti TA, Bauchart P, Kukkonen M, Dobrindt U, Korhonen TK, Westerlund-Wikstrom B. (2013). Phylogenetic group associated differences in regulation of the common colonization Mat fimbriae in *Escherichia coli*, *Molecular Microbiology*, 87:1200-1222.
 47. Lee V, Matewish J, Kessler J, Hyodo M, Hayakawa Y, Lory S. (2007). A cyclic-di-GMP receptor required for bacterial exopolysaccharide production. *Molecular Microbiology*, 65:1474-1484.
 48. Martínez-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*. *Molecular Microbiology*, 33:153-166.
 49. Martínez-Santos VI, Medrano-López A, Saldaña Z, Girón JA, Puente JL. (2012). Transcriptional regulation of the *ecp* operon by EcpR, IHF, and H-NS in attaching and effacing *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 194:5020-5035.
 50. Mayer M. (1995). A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScrip. *Gene*, 163:41-46.
 51. McDaniel T, Kaper J. (1997). A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Molecular Microbiology*, 23:399-407.
 52. 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*. *Molecular Microbiology*, 48:795–809.
 53. Mundy R, MacDonald T, Dougan G, Frankel G, Wiles S. (2005). *Citrobacter rodentium* of mice and man. *Cellular Microbiology*, 7:1697–1706.
 54. Newell P, Monds R, O'Toole G. (2009). LapD is a bis-(3',5')-cyclic dimeric GMP-binding protein that regulates surface attachment by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 106:3461-3466.
 55. Ochoa TJ, Contreras CA. (2011). Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. 2011. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24:478–483.
 56. Pakharukova N, Garnett JA, Tuittila M, Paavilainen S, Diallo M, Xu Y, et al. (2015) Structural insight into archaic and alternative chaperone-usher pathways reveals a novel mechanism of pilus biogenesis. *PLoS Pathogens*, 11:e1005269.
 57. Pannen D, Fabisch M, Gausling L, Schnetz K. (2016) Interaction of the RcsB Response Regulator with Auxiliary Transcription Regulators in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 291:2357-2370.

-
58. Paul K, Nieto V, Carlquist WC, Blair D, Harshey RM. (2010). The c-di-GMP binding protein YcgR controls flagellar motor direction and speed to affect chemotaxis by a “backstop brake” mechanism. *Molecular Cell*, 38:128-139.
 59. Pearson JS, Giogha C, Wong Fok Lung T, Hartland EL. (2016). The Genetics of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence. *Annual Reviews in Genetics*, 50:493–513.
 60. Perdigón G, Fernández S. (2008). La mortalidad por enfermedades diarreicas en México 1950-2005. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 68:325-326.
 61. Petty N, Buigin R, Crepin V, Cerdeño A, Schroeder G, Quail M, Lennard N, Corton C, Barron A, Clark L, Toribio A, Parkhill J, Dougan G, Frankel G, Thompson N. (2009). The *Citrobacter rodentium* genome sequence reveals convergent evolution with human pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 192:525-538.
 62. Pouttu R, Westerlund Wikstrom B, Lang H, Alsti K, Virkola R, Saarela U, Siitonen A, Kalkkinen N, Korhonen TK. (2001). *matB*, a common fibrillin gene of *Escherichia coli*, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. *Journal of Bacteriology*, 183:4727-4736.
 63. Povolotsky T, Hengge R. (2015). Genome-based comparison of c-di-GMP signaling in pathogenic and commensal *Escherichia coli* strains. *Journal of Bacteriology*, 198:111-126.
 64. Proft T, Baker E. (2009). Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria—structure, assembly and their role in disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66:613-635.
 65. Rendón MA, Saldaña Z, Erdem AL, Monteiro V, Vázquez A, Kaper J, Puente JL, Girón JA. (2007). Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proceedings of The National Academy of Sciences*, 104:10637–10642.
 66. Rossez Y, Holmes A, Lodberg-Pedersen H, Birse L, Marshall J, Willats WG, Toth IK, Holden NJ. (2014). *Escherichia coli* common pilus (ECP) targets arabinosyl residues in plant cell walls to mediate adhesion to fresh produce plants. *Journal of Biological Chemistry*. 289:34349–34365
 67. Ryan R, Nielsen T, Dow M. (2012). When the PilZ don't work: effectors for cyclic di-GMP action in bacteria. *Trends in Microbiology*, 20:235-242.
 68. Ryjenkov D, Simm R, Romling U, Gomelsky M. (2006). The PilZ domain protein YcgR controls motility in enterobacteria. *The Journal of Biological Chemistry*, 281:30310-30314.
 69. Saldaña Z, De la Cruz MA, Carrillo-Casas EM, Durán L, Zhan Y, Hernández-Castro R, Puente JL, Daaka Y, Girón JA. (2014). Production of the *Escherichia coli* common pilus by uropathogenic *E. coli* is associated with adherence to HeLa and HTB-4 cells and invasion of mouse bladder urothelium. *PLoS ONE*, 9:e101200.
 70. Saldaña Z, Sánchez E, Xicohtencatl J, Puente JL, Girón JA. (2011). Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by Shiga-toxigenic *Escherichia coli* O157:H7. *Frontiers in Microbiology*, 2:(119).
 71. Schauer D, Falkow S. (1993). Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hiperplasia. *Infection and Immunity*, 61:2486-2492.
 72. Schmidt MA. (2010). LEEways: tales of EPEC, ATEC and EHEC. *Cellular Microbiology*. 12:1544–1552.

-
73. Simmons RW, Houman F, Kleckner N. (1987). Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene*, 53:85-96.
 74. Smyth C, Marron M, Twohig J, Smith S. (1996). Fimbrial adhesins: similarities and variations in structure. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 16:127-139.
 75. SnapGene software (GSL Biotech; disponible en snapgene.com).
 76. Spurbeck R, Tarrien R, Mobley H. (2012). Enzymatically active and inactive phosphodiesterases and diguanylate cyclases are involved in regulation of motility or sessility in *Escherichia coli* CFT07. *mBio* 3:e00307-12.
 77. Stoebel D, Free, Dorman CJ. (2015). Anti-silencing: overcoming H-NS mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria. *Microbiology*, 154:2533-2545.
 78. Wales A, Woodward M, Pearson G. (2005). Attaching-effacing bacteria in animals. *Journal of Comparative Pathology*, 132:1-26.
 79. Wilksch j, Yang J, Clements A, Gabbe J, Short K, Cao H, Cavaliere R, James C, Whitchurch C, Schembri M, Chuah M, Liang Z, Wijburg O, Jenney A, Lithgow T, Strugnell R. (2011). MrkH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. *PLoS pathogens*, 7:e1002204.
 80. Xu H, Hoover TR. (2001). Transcriptional regulation at a distance in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, 4:138-144.
 81. Yang J, Tauschek M, Hart E, Hartland EL, Robins-Browne RM. (2010). Virulence regulation in *Citrobacter rodentium*: the art of timing. *Microbial Biotechnology*, 3:259-268.