



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Análisis de las condiciones de expresión del
operón fimbrial *crf2* en *Citrobacter rodentium*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

PRESENTA:

Karla Fernanda Ramírez González

TUTOR

Zeus Saldaña Ahuactzi



Ciudad Universitaria, CD. MX., 2021



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.

Índice general

1. Introducción	8
1.1. <i>Citrobacter rodentium</i>	8
1.2. Patógenos A/E y las lesiones que ocasionan	9
1.3. Fimbrias	11
1.3.1. Fimbrias Chaperona-Usher (C/U)	12
1.4. Crp y la represión catabólica	14
1.5. RpoS, el factor sigma de la fase estacionaria	16
1.6. Lrp y la respuesta a leucina	20
2. Antecedentes	24
2. 1. Identificación del operón <i>cfc</i> por STM en <i>C. rodentium</i>	24
2.2. Descubrimiento de RegA como factor de virulencia y desrepressor transcripcional del operón <i>Kfc</i> en <i>C. rodentium</i>	24
2.3. Secuenciación del genoma completo de <i>C. rodentium</i> e identificación de 19 operones fimbriales putativos	26
2.4. Reconocimiento de la fimbria C/U, Gcf, como un factor esencial de virulencia en <i>C. rodentium</i>	27
2.5. Identificación de la importancia de Crf2 para la adherencia a células y la colonización a ratón	28
3. Justificación	30
4. Hipótesis	31
5. Objetivos	31
5.1. General	31
5.2. Particulares	31
6. Materiales y métodos	32
6.1. Cepas, plásmidos y medios de cultivo usados	32
6.2. Extracción de plásmidos con fusiones transcripcionales y transformación de cepas mutantes	34
6.3. Reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) y los oligonucleótidos usados para ellas	34
6.4. Ensayos de actividad transcripcional CAT	35
6.5. Cinética de crecimiento y de actividad transcripcional CAT	36

6.6. Predicción de sitios de unión de reguladores transcripcionales a la región promotora del operón <i>crf2</i>	36
6.8. Ensayo de cambio en la corrida electroforética (EMSA).....	36
7. Resultados	38
7.1 Los operones <i>pkkc2</i> y <i>crf2</i> se expresan poco en medio precondicionado	38
7.2. El operón <i>crf2</i> alcanza su máxima expresión en medio mínimo con glicerol.....	40
7.3. El operón <i>crf2</i> se expresa diferencialmente dependiendo del pH, la fuente de carbono y la temperatura	42
7.4. La proteína sensible a leucina, Lrp, se une con especificidad a la región reguladora del operón <i>crf2</i>	44
8. Discusión	46
9. Conclusiones	52
10. Perspectivas	53
11. Referencias	54

Índice de figuras

Figura 1. Micrografías electrónicas de <i>C. rodentium</i> , EPEC y EHEC.....	8
Figura 2. Lesiones A/E formadas por EPEC.....	9
Figura 3. Formación de lesiones A/E.....	11
Figura 4. <i>E. coli</i> uropatógena con fimbrias.....	12
Figura 5. Ruta de biosíntesis de fimbrias C/U.....	13
Figura 6. Mecanismo de represión catabólica por carbono en <i>E. coli</i>	15
Figura 7. Efecto de la mutación de <i>crp</i> sobre la virulencia de <i>K. pneumoniae</i>	16
Figura 8. Curva general de crecimiento bacteriano.....	17
Figura 9. RNA polimerasa bacteriana.....	18
Figura 10. Efecto de la mutación de <i>rpoS</i> sobre la supervivencia a la inanición de carbono en <i>Burkholderia pseudomallei</i>	19
Figura 11. Estructura cristalográfica del octámero de Lrp en <i>E. coli</i>	22
Figura 12. Modos de regulación transcripcional por Lrp en respuesta a leucina exógena.....	23
Figura 13. Organización genética de operones homólogos de enteropatógenos con función en la colonización.....	24
Figura 14. Efectos de la mutación de <i>kfc</i> en la colonización de ratón por <i>C. rodentium</i>	25
Figura 15. Filogenia de <i>C. rodentium</i>	26
Figura 16. Operones de biosíntesis fimbrial identificados en <i>C. rodentium</i>	27
Figura 17. Gcf es necesario para la colonización de ratón por <i>C. rodentium</i>	28
Figura 18. Ensayos de colonización a ratón y adherencia a células mediadas por Crf2 de <i>C. rodentium</i>	29
Figura 19. Composición y estructura de los operones fimbriales <i>crf2</i> , <i>pkkc2</i> y <i>crf4</i>	38
Figura 20. Actividad específica CAT de cepas de <i>C. rodentium</i> con fusión transcripcional del operón <i>crf2</i> , crecidas en M.M.-N.....	40
Figura 21. Predicción de unión de RpoS y Crp a la región reguladora de <i>crf2</i>	41
Figura 22. Cinética de crecimiento y de expresión de CAT del operón <i>crf2</i> en la cepa WT de <i>C. rodentium</i> en M.M.-N.....	41
Figura 23. Actividad específica CAT de <i>C. rodentium</i> con fusión transcripcional del operón <i>crf2</i> , en M.M.-N. con distintas fuentes de carbono.....	42
Figura 24. Actividad específica CAT de <i>C. rodentium</i> con fusión transcripcional del operón <i>crf2</i> , en distintas temperaturas en M.M.-N.....	43
Figura 25. Actividad específica CAT de <i>C. rodentium</i> con fusión transcripcional del operón <i>crf2</i> , en M.M.-N. con distintos valores de pH.....	43

Figura 26. Sitios de unión de Lrp predichos *in silico* a la región reguladora de *crf2* 44

Figura 27. Lrp se une a la región reguladora del operón *crf2* 45

Índice de tablas

Tabla 1. Medios de cultivo usados en el estudio..... 32

Tabla 2. Cepas empleadas 33

Tabla 3. Plásmidos usados. Todos los vectores enlistados confieren resistencia a ampicilina 33

Tabla 4. Oligonucleotidos usados para PCRs realizadas en este trabajo. Los sitios de restricción se muestran en minúsculas 35

Tabla 5. Valores CAT de las de *C. rodentium* DBS100 con las fusiones transcripcionales *crf2* y *pkkc2* 39

Dedicatoria

A mi familia, a todos, porque sin ustedes nunca podría llegar tan lejos:

A mi mamá, a mi papá, por todo el amor, por ser una fuente de inspiración constante, por impulsarme, motivarme, aconsejarme, instruirme, por darme la mano y guiarme en los momentos difíciles y por proporcionarme todas las herramientas para poder salir adelante en la vida.

A Caro y Max, por acompañarme cada día y por darme cariño, a su manera, por aguantarme en mis días ocupados, estresados y malhumorados, y por disfrutar y reír mucho conmigo en los días relajados, por ayudarme cada día a ser una mejor hermana y persona.

A Jime, por enseñarme algo nuevo todo el tiempo, por apoyarme, escucharme y ser incondicional. Por inspirarme a ser la mejor versión de mí y a renovarme constantemente. Por demostrarme que los cambios pueden ser buenos y que hay cosas que valen la pena, aunque cuesten mucho trabajo. Y simplemente, por estar, siendo paciente en los ratos malos y haciendo los buenos mucho mejores.

A mis tíos, primos y abuelos, por hacer mis días mejores, por ser amigos, consejeros, por cuidarme, procurarme y preocuparse por mí, por todo el amor y cariño, por querer lo mejor para mí, por los abrazos, las risas y el llanto compartido también. Porque sé que pase lo que pase van a estar ahí incondicionalmente.

Agradecimientos

Al Dr. José Luis Puente, mis agradecimientos infinitos por darme la oportunidad de entrar a la familia creada dentro de su laboratorio, por darme la oportunidad de aprender y crecer como nunca lo había hecho. Por su apoyo académico y también personal, por estar constantemente al pendiente. Por su bondad, trato y paciencia. Por inspirarme a crecer como científica y como ser humano.

Al Dr. Zeus Saldaña, por ser mi mentor y enseñarme tanto, cada procedimiento desde el inicio hasta el final y por estar al pendiente durante todo el proceso, por ser paciente conmigo y por el trato siempre amable y bondadoso. Por compartir el día a día en el laboratorio, aunque eso significara tener que trabajar en un espacio reducido muchas de las veces. Por todo el tiempo y el esfuerzo dedicado hacia mí como alumna, pero también como persona. Por verme siempre como una igual, por escuchar y validar mis ideas y nunca hacerlas menos. Por convertirse en amigo.

Al Dr. Ismael Hernández Lucas, por creer en mí, por apoyarme, tanto académica como personalmente. Por escucharme, por estar al pendiente, por ser amigo y también maestro, por instruirme y aconsejarme. Por los retos impuestos, por los cuestionamientos generados, por todas las pláticas, por todas las risas. Por hacerme sentir parte, por preocuparse. Por el apoyo moral cuando más lo necesitaba. Por recordarme las cosas realmente importantes de la vida.

A la Dr. Alejandra Vázquez y a la Dra. Liliana Medina por ser pacientes y trabajar conmigo, enseñándome técnicas de laboratorio y compartiéndome sus tips.

Álvaro, Rebe, Lili, Carmen, Steph, Jess, Lucy, Faby, Ross, Isela, Inés, Jordan, Panchito, Ale, Marcos, Dino, Sara, Esteban, por convertirse en amigos, por abrirme las puertas y hacerme parte de su familia, por ayudarme en el laboratorio, por responder mis dudas, por instruirme, por enseñarme, por compartirme sus experiencias y su conocimiento, por hacer mis días de trabajo más alegres.

Investigación realizada con el apoyo del Programa UNAM-PAPIIT IN213516 y al CONACyT FC-950

1. Introducción

1.1. *Citrobacter rodentium*

Citrobacter rodentium (*C. rodentium*) (Fig. 1, A) es una bacteria entérica Gram-negativa cuyo hospedero natural es el ratón (Bouladoux *et al.*, 2017), en el cual la infección causa colitis, hiperplasia de colon transmisible y es responsable de una alta mortalidad en las crías. Es un miembro de la familia de enteropatógenos bacterianos causantes de la lesión de adherencia y esfacelamiento de los enterocitos (A/E) (Petty *et al.*, 2010).

Dentro de esta familia bacteriana también se encuentran *Escherichia coli* (*E. coli*) enteropatógena (EPEC) (Fig. 1, B) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) (Fig. 1, C), los cuales son patógenos humanos clínicamente relevantes que causan deshidratación letal e hipovolemia, particularmente en niños. EPEC causa principalmente diarrea infantil en países en desarrollo y EHEC es responsable de fallas renales, siendo altamente prevalente en países desarrollados (Borenshtein *et al.*, 2008; Bouladoux *et al.*, 2017).

El problema para estudiar los mecanismos de infección *in vivo* de estos enteropatógenos humanos es que son poco patogénicos en ratones de laboratorio y aunque existen modelos animales no murinos para su investigación, el poder de los ratones genéticamente modificados y la disponibilidad de reactivos inmunológicos para ellos hacen a *C. rodentium* un modelo particularmente atractivo (Wiles *et al.*, 2004; Borenshtein *et al.*, 2008) pues es el único patógeno A/E conocido que infecta ratones de forma natural (Bouladoux *et al.*, 2017), además de estar genéticamente emparentado a *E. coli* (Petty *et al.*, 2010; Wiles *et al.*, 2004).

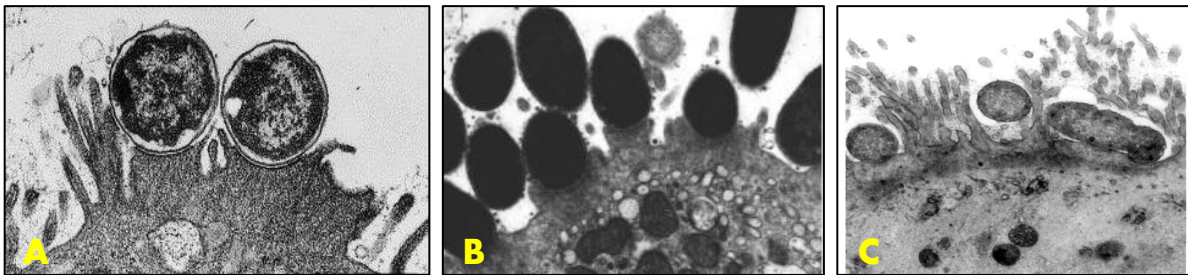


Figura 1. Micrografías electrónicas de *C. rodentium*, EPEC y EHEC causando lesiones A/E en las células de sus hospederos. A) *C. rodentium* infectando enterocitos de ratón. B) EPEC infectando el epitelio intestinal de lechones. C) EHEC infectando epitelio asociado a folículos en ratón. (Modificado de Luperchio & Schauer, 2001, Hwang *et al.*, 2014 y Hartland *et al.*, 2000).

C. rodentium ha sido aceptado como un sistema de infección representativo para estudiar de forma integral la patogenicidad celular y molecular de las infecciones A/E (Wiles *et al.*, 2004; Barba *et al.*, 2015; Caballero *et al.*, 2015), brindando un excelente modelo para hacer investigación robusta con respecto a los diferentes

aspectos de interacción patógeno-hospedero incluyendo la respuesta inflamatoria intestinal durante la colitis inducida por bacterias, la reparación de la mucosa epitelial, inducción de la respuesta inmune de la mucosa y el papel de la microbiota intestinal para mediar la resistencia a la colonización intestinal por enteropatógenos, bajo condiciones fisiológicas normales del ambiente intestinal y con la ventaja de poder manipular al patógeno y al hospedero (Wiles *et al.*, 2004; Bouladoux *et al.*, 2017).

1.2. Patógenos A/E y las lesiones que ocasionan

EPEC, EHEC y *C. rodentium* pertenecen a una familia de enteropatógenos bacterianos que inducen un fenotipo histológicamente distintivo en las células epiteliales intestinales de sus huéspedes (humano y ratón, respectivamente), llamado lesiones A/E. (Petty *et al.*, 2010; Wiles *et al.*, 2004; Barba *et al.*, 2015).

Esta histopatología se caracteriza por una pérdida localizada de microvellosidades epiteliales y un rearrreglo importante del citoesqueleto de las células epiteliales, también conocidas como enterocitos, formando estructuras tipo pedestal ricas en actina (lesiones A/E), que se forman en la membrana de la célula hospedera y se proyectan hacia afuera, justo debajo de la bacteria que se adhiere, lo cual conlleva a una estrecha e íntima unión bacteria-célula hospedera y a una remodelación del epitelio intestinal, que culmina en la colonización del tracto intestinal (Fig. 2) (Mundy *et al.*, 2003; Petty *et al.*, 2010; Mundy *et al.*, 2005; Caballero *et al.*, 2015; Bouladoux *et al.*, 2017).

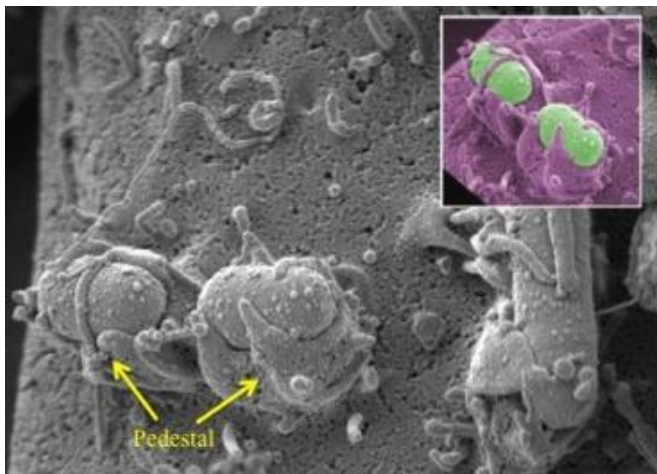


Figura 2. Lesiones A/E formadas por EPEC. Imagen de microscopía electrónica de barrido de EPEC infectado células de mamíferos. Las flechas indican los pedestales. (Tomado de Bhatt *et al.*, 2011)

Las lesiones A/E ocurren en tres etapas: 1) adherencia inicial, 2) transducción de señales y 3) adherencia íntima. En la primera etapa la bacteria se adhiere a la célula hospedera a través de fimbrias como el Pilus tipo IV, llamado Pili formador de Mechones (BFP, por sus siglas en inglés) en EPEC, Pilus de *E. coli*

hemorrágica (HCP, por sus siglas en inglés) en EHEC y el Factor de Colonización de *Citrobacter* (CFC, por sus siglas en inglés). Se ha propuesto que estas fimbrias están involucradas en la adherencia celular y colonización, aunque también han sido asociadas con la adherencia inicial otras adhesinas fimbriales y no fimbriales, como intimina, flagelos, el Pilus Común de las *E. coli* (ECP, por sus siglas en inglés), entre otros (Saldaña *et al.*, 2009; Gaytan *et al.*, 2016).

En la segunda etapa (Fig. 3, A) la bacteria interfiere con una variedad de rutas de transducción de señales en la célula hospedera, translocando distintas proteínas de virulencia, llamadas efectoras, por medio de un aparato de secreción altamente especializado, el sistema de secreción tipo 3 (T3SS, por sus siglas en inglés). El número de efectores translocados varía, siendo aproximadamente 22 en EPEC, 29 en *C. rodentium* y hasta 39 en algunas cepas de EHEC. Los cambios inducidos por estos efectores incluyen modificaciones al citoesqueleto de actina de la célula hospedera, fallas en las funciones de los microtúbulos, inhibición en el transporte celular y alteración de las funciones de la barrera epitelial (Gaytán *et al.*, 2016). Esta translocación de efectores por medio del T3SS es un proceso complejo que involucra la acción coordinada de varios factores de virulencia, incluyendo también a las fimbrias (Caballero *et al.*, 2015).

En la tercera etapa (Fig. 3, B), la bacteria se une íntimamente a la célula hospedera a través de una proteína de membrana externa llamada intimina, la cual funciona como ligando para la proteína receptora translocada Tir, que se encuentra insertada en la membrana de la célula hospedera. La actina de las microvellosidades que rodean a la bacteria unida es reabsorbida y la estructura tipo pedestal está completa (Fig. 3, C), formando las lesiones A/E, lo cual conlleva a la infección (Gaytán *et al.*, 2016).

La formación de lesiones A/E es necesaria para la patogenicidad en estas bacterias, las cuales comparten algunos genes de virulencia involucrados en la colonización del tracto gastrointestinal y la inducción de la patogénesis de la mucosa intestinal. En particular, estos tres patógenos presentan el locus de esfacelamiento enterocítico (LEE), que es una isla de patogenicidad altamente conservada y que les brinda su capacidad para producir las lesiones A/E (Bouladoux *et al.*, 2017). LEE está organizado en operones, con genes que codifican para proteínas de translocación, de unión íntima, efectoras, chaperonas, reguladores transcripcionales y componentes estructurales del sistema de secreción tipo III (Mundy *et al.*, 2003, Wiles *et al.*, 2004; Barba *et al.*, 2005; Caballero *et al.*, 2015).

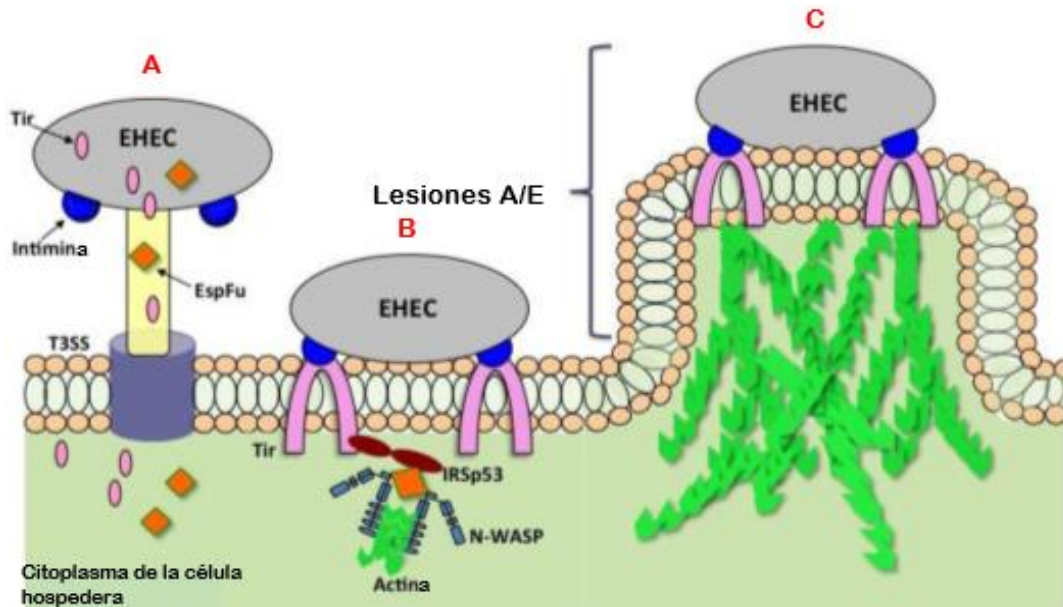


Figura 3. Formación de lesiones A/E. El patógeno A/E (En este caso EHEC) inyecta proteínas efectoras a través del T3SS, entre ellas Tir (A). Tir se inserta en la membrana de la célula hospedera y a ella se une la intimina que se encuentra en la membrana externa de la bacteria, lo cual genera una unión íntima entre ambas células. Tir con otras proteínas efectoras reclutan factores del hospedero para la remodelación del citoesqueleto y polimerización de la actina (B). La morfología de la célula hospedera cambia, formando un pedestal y se completa la lesión A/E. (C) (Modificado de Sperandio & Nguyenbusch, 2012).

1.3. Fimbrias

La infección y colonización son procesos complejos que involucran la acción coordinada de distintos factores de virulencia, los cuales también se pueden encontrar fuera de las islas de patogenicidad (Remaut *et al.*, 2008; Saldaña *et al.*, 2009; Caballero *et al.*, 2015). Un paso esencial en la patogénesis de un organismo es el reconocimiento y la unión a su célula hospedera, y las bacterias patógenas Gram-negativas ensamblan organelos adhesivos que sirven para este propósito: las fimbrias o pili, los cuales son factores de virulencia muy importantes (Thanassi *et al.*, 1998).

Las fimbrias son apéndices proteicos que se extienden en la superficie externa de muchas bacterias (Fig. 4). Estas estructuras extracelulares median diversas funciones, incluyendo formación de biopelículas, agregación y motilidad celular, transporte de proteínas y DNA a través de membrana (Waksman & Hultgren, 2009; Caballero *et al.*, 2015).

En bacterias patógenas las fimbrias son, además, responsables del reconocimiento y unión específicos al huésped, estando involucradas principalmente en adhesión, el cual es un paso crucial para la colonización y, por ende, para la invasión de las células hospederas y la infección (Remaut *et al.*, 2008; Saldaña *et al.*, 2009; Dufresne *et al.*, 2018). Esto se debe a que las fimbrias

presentan adhesinas que se encuentran usualmente en su punta y que se unen a receptores específicos en la célula hospedera, permitiendo a la bacteria presentar tropismo tisular y distinguir superficies específicas (Thanassi *et al.*, 1998; Wurpel *et al.*, 2013). También se ha demostrado la contribución de las fimbrias en interacciones con macrófagos, persistencia intestinal, evasión del sistema inmune y agregación bacteriana (Dufresne *et al.*, 2018).



Figura 4. *E. coli* uropatogénica con fimbrias. Micrografía electrónica de barrido (Modificado de Waksman & Hultgren, 2009).

Estos apéndices no flagelares de las bacterias Gram-negativas pueden ser categorizados en tres clases de acuerdo al sistema de translocación de las proteínas, es decir, por su mecanismo de ensamblaje: la ruta de nucleación y precipitación extracelular o Curli, la ruta de fimbrias tipo IV y la ruta de las chaperonas-usher (C/U). Esta última clase es la que cuenta con el mayor número de representantes, por lo que es la más abundante y la más diversa. (Nuccio & Bäümler, 2007; Wurpel *et al.*, 2013; Dufresne *et al.*, 2018)

1.3.1. Fimbrias Chaperona-Usher (C/U)

La vía de síntesis C/U es un sistema de secreción para el ensamble de fimbrias, altamente conservado en bacterias (Wurpel *et al.*, 2013) y los genes involucrados en esta biosíntesis están casi invariablemente organizados en operones (Nuccio & Bäümler, 2007) que codifican al menos para una subunidad fimbrial estructural mayor, una chaperona periplásmica y una plataforma de ensamble en la membrana externa llamada usher o acomodador (Nuccio & Bäümler, 2007; Wurpel *et al.*, 2013), siendo las dos últimas necesarias para la secreción y el ensamble de las subunidades fimbriales en la membrana externa (Busch & Waksman, 2012).

Las chaperonas periplásmicas se unen a las subunidades fimbriales mientras van entrando al periplasma a través de la vía general de secreción Sec, cubriendo sus superficies interactivas. Median y facilitan el plegamiento de esas subunidades, previenen su polimerización en el periplasma, liberan a las proteínas ancladas a la membrana interna y dirigen el paso de las subunidades al usher (Thanassi *et al.*, 1998; Wurpel *et al.*, 2013). Las bacterias sin chaperona no ensamblan fimbrias (Thanassi *et al.*, 1998).

Posterior al plegamiento de las subunidades fimbriales y su liberación de la membrana citoplasmática, los complejos chaperona-subunidad fimbrial son dirigidos a los sitios de ensamble usher en la membrana externa, donde forman un complejo ternario estable que causa un cambio conformacional en el usher, posiblemente convirtiéndolo a una forma competente para el ensamble. Las proteínas usher son necesarias para la translocación de las subunidades fimbriales a través de la membrana externa, lo cual logran al hacer poros en ella (Thanassi *et al.*, 1998). Estas proteínas forman un andamio que recluta a los complejos chaperonas-subunidades fimbriales del periplasma, coordinando el ensamblaje de las subunidades para formar las fimbrias, así como su secreción a través del poro que formaron (Waksman & Hultgren, 2009; Wurpel *et al.*, 2013). La interacción del usher con el siguiente complejo chaperona-subunidad lleva al intercambio del complejo anterior por el siguiente y los eventos de unión subsecuentes llevan al crecimiento de la estructura fimbrial, lo cual es concomitante a su translocación a través del canal usher. Las cepas que no tienen usher acumulan en el periplasma complejos de chaperonas-subunidad que no pueden ensamblar para formar pili en su superficie (Fig. 5) (Thanassi *et al.*, 1998).

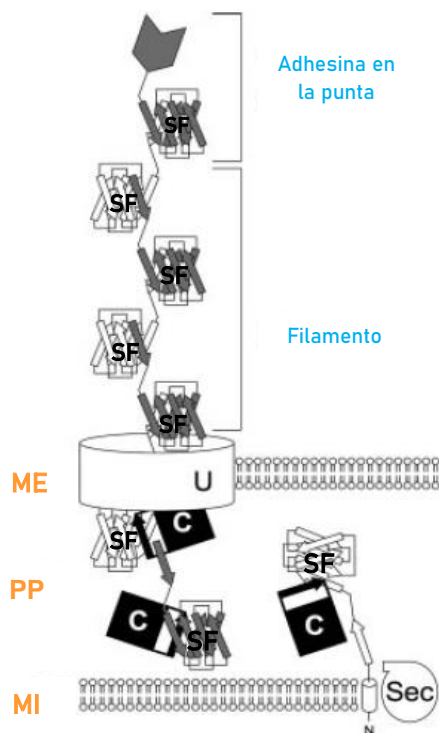


Figura 5. Ruta de biosíntesis de fimbrias C/U. Las subunidades fimbriales (SF) son secretadas fuera del citoplasma a través de la vía general de secreción (Sec) y su extremo amino permanece anclado a la membrana interna (MI). En el periplasma (PP) las chaperonas (C) se unen a las SF, previniendo su polimerización y ayudando a su correcto plegamiento y liberándolas de la MI. La interacción del complejo C/SF, con el acomodador (U) al que es dirigido en la membrana externa (ME), facilita la unión de una SF con la siguiente, y por ende, se forma un filamento que es secretado a través de la ME por un poro formado por U. En algunas ocasiones los filamentos fimbriales cargan una adhesina en su punta que media su unión a superficies (Modificado de Nuccio & Bäumlér, 2007).

Los genes que codifican para las fimbrias C/U se encuentran en casi todos los miembros de la familia *Enterobacteriaceae* (p. e.j. *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp.) así como en bacterias de otros géneros incluyendo *Pseudomonas*, *Haemophilus*, *Bordetella*, *Burkholderia* y *Acinetobacter* (Wurpel *et al.*, 2013).

1.4. Crp y la represión catabólica

El término represión catabólica por carbono (CCR, por sus siglas en inglés) es usado para describir un fenómeno general en microorganismos donde la presencia de una fuente de carbono predilecta en el medio puede reprimir la expresión de ciertos genes u operones, cuyos productos génicos están usualmente ligados a la utilización de fuentes de carbono alternas. En la vasta mayoría de los casos reportados, la fuente preferida es glucosa (Brükner & Titgemeyer, 2002; Kalivoda *et al.*, 2008).

La represión catabólica en bacterias es generalmente reconocida como un mecanismo de regulación para asegurar la utilización secuencial y selectiva de fuentes de carbono (Brükner & Titgemeyer, 2002; Görke & Stülke, 2008), pues inhibe la actividad de los sistemas catabólicos involucrados en el uso de carbohidratos menos eficientemente metabolizados cuando hay disponibles otros más favorables (Stella *et al.*, 2008).

Este es uno de los fenómenos regulatorios más importantes en bacterias, estando sujetos a él del 5 al 10% de genes bacterianos (Görke & Stülke, 2008), por lo que se lleva a cabo de distintas formas: manera directa, regulando a genes y operones que codifican para enzimas de metabolismo de carbono, activando o reprimiendo su transcripción, o de manera indirecta, regulando la activación de proteínas ribosomales o de genes codificantes de tRNAs (Gosset *et al.*, 2004). Con estos mecanismos las bacterias son capaces de establecer una jerarquía de utilización de azúcares (Brükner & Titgemeyer, 2002).

Este mecanismo de regulación se ha estudiado a fondo en *E. coli*, donde de los participantes más importantes son: el metabolito de señalización o segundo mensajero 3',5'-adenosin monofosfato cíclico (cAMP), la proteína de regulación global y receptora de cAMP, Crp (también llamada proteína activadora de genes catabólicos, Cap), la adenilato ciclasa (AC) y la enzima IIA del sistema de fosfotransferasa (PTS, por sus siglas en inglés) específico de glucosa (EIIAGlc) (Görke & Stülke, 2008).

La regulación de CCR en *E. coli* se lleva a cabo a través de la modulación del estado de fosforilación de EIIAGlc que depende de la presencia de glucosa en el medio: En presencia de glucosa, el fosfato de EIIAGlc es drenado hacia los azúcares, siendo desfosforilada. Cuando hay limitación de glucosa, la enzima IIA es fosforilada (Görke & Stülke, 2008; Kalivoda *et al.*, 2008).

Solo la forma fosforilada de EIIA_{Glc} puede ejercer su rol regulatorio activando a una enzima anclada a la membrana, la AC, la cual se encarga de producir cAMP. El cAMP generado se une a Crp, la cual es su proteína receptora, que actúa como regulador global de la transcripción. El complejo que forma la proteína con la molécula de señalización activa a los promotores de muchos genes y operones catabólicos. Estos promotores son usualmente débiles y deben ser activados para permitir la unión de la RNA polimerasa o la formación del complejo de transcripción abierto (Fig. 6) (Görke & Stülke, 2008; Kalivoda *et al.*, 2008; Stella *et al.*, 2008).

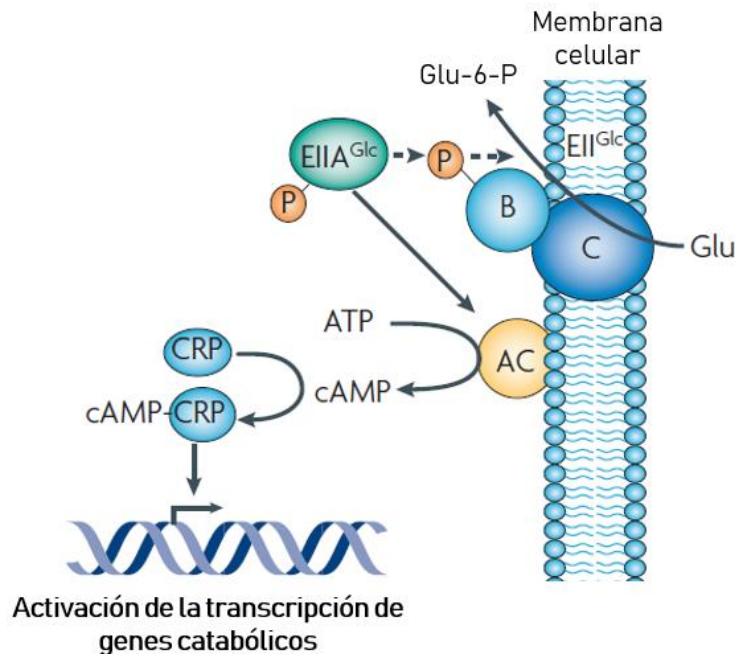


Figura 6. Mecanismo de represión catabólica por carbono en *E. coli*. En presencia de glucosa (Glu), el fosfato del dominio EIIA del transportador de glucosa (EIIA_{Glc}), es drenado hacia los azúcares, siendo desfosforilado y produciendo glucosa-6-fosfato (Glu-6-P). Pero cuando hay limitación de glucosa, la enzima IIA se mantiene fosforilada. Esta enzima fosforilada se une y activa a la enzima adenilato ciclasa (AC), la cual sintetiza cAMP a partir de ATP. Altas concentraciones de cAMP ocasionan la formación de complejos con Crp (cAMP-Crp), los cuales activan la transcripción de genes relacionados con el catabolismo (Modificado de Görke & Stülke, 2008).

La proteína receptora de cAMP (Crp) fue originalmente descrita como un regulador global de genes involucrados principalmente en CCR. La afinidad de unión al DNA del homodímero de Crp aumenta una vez que se une cAMP. El complejo cAMP-CRP activa algunos genes mientras reprime otros (regulador positivo y negativo) y está predicho que en *E. coli* K-12 regula alrededor de 378 promotores distintos (Molina-Quiroz *et al.*, 2018). El alcance de la CCR va más allá de la regulación y almacenamiento de las fuentes de carbono, pues tiene un papel crucial en la expresión de factores de virulencia en muchas bacterias patógenas (Fig. 7)

incluyendo *E. coli* y *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*), donde se ha demostrado su importancia en virulencia y patogenicidad, movilidad, división celular y respuesta SOS (Görke & Stülke, 2008; Kalivoda *et al.*, 2008; Stella *et al.*, 2008; Molina-Quiroz *et al.*, 2018).

En *Klebsiella pneumoniae* Crp es necesaria para crecimiento *in vitro*, producción de fimbrias, formación de biopelículas y letalidad en ratones (Ou *et al.*, 2017). En *Vibrio cholerae* y *Yersinia enterocolitica* también se ha observado un rol esencial para cAMP y Crp y en *Yersinia pestis*, la expresión del gen activador del plasminógeno requiere la activación por el complejo cAMP–CRP (Görke & Stülke, 2008). También se ha demostrado la regulación positiva de la síntesis de fimbrias por Crp en *E. coli*, *S. typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* y *K. pneumoniae* serotipo K1 (Ou *et al.*, 2017).

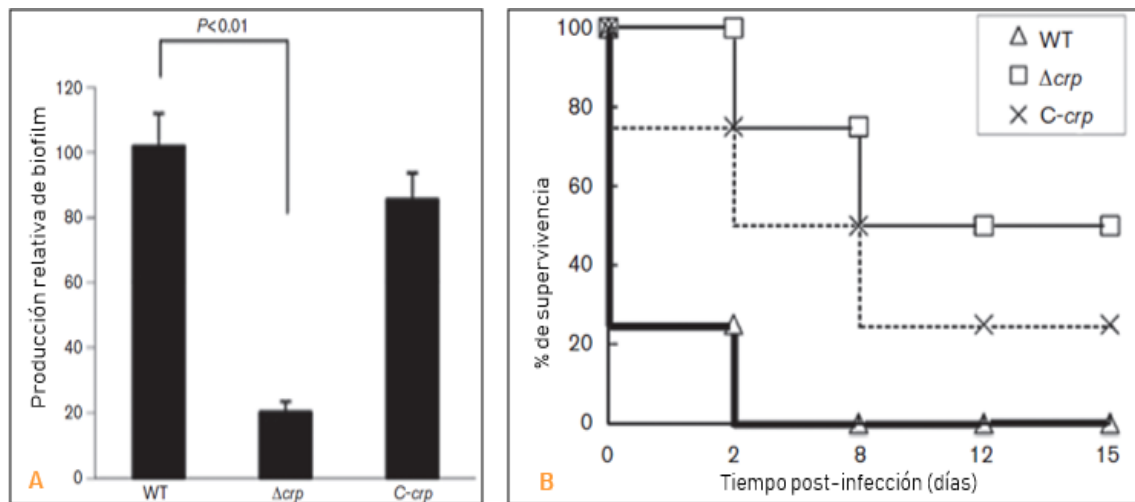


Figura 7. Efecto de la mutación de *crp* sobre la virulencia de *K. pneumoniae*. A) Formación de biopelículas en la cepa silvestre (WT), en la mutante de *crp* (Δcrp) y la mutante complementada con *crp* (C-*crp*). Se observa una disminución muy importante en la producción de biopelículas en la cepa Δcrp y su recuperación al ser complementada, confirmando su importancia en este proceso. B) Tasa de supervivencia murina después de una infección intraperitoneal con *K. pneumoniae*. Se observa la importancia de Crp en la virulencia de la bacteria pues en su ausencia la tasa de supervivencia se mantiene cerca del 60%, mientras que en la WT la tasa de supervivencia de los ratones es del 0% a partir del día 2 (Modificado de Ou *et al.*, 2017).

1.5. RpoS, el factor sigma de la fase estacionaria

En su ambiente natural, los microorganismos están continuamente percibiendo y respondiendo a estímulos ambientales como la inanición, desecación, estrés osmótico, estrés oxidativo y cambios de temperatura. En muchas situaciones una respuesta apropiada a ellos es esencial para su supervivencia y requiere cambios en los niveles específicos de los productos génicos (Suh *et al.*, 1999). Particularmente, las bacterias patógenas experimentan distintos tipos de estrés

durante la transmisión e infección al huésped, por lo que la habilidad para adaptarse rápidamente a ambientes cambiantes es crítica para que los patógenos bacterianos puedan ser exitosos (Dong & Schellhorn, 2010).

En *E. coli* la limitación de nutrientes debajo de cierto nivel induce una respuesta específica: si hay recursos presentes en el medio las células continúan creciendo y dividiéndose, pero si en el medio está agotado un nutriente esencial las células entran en fase estacionaria, lo cual implica que las células crecen y se dividen lentamente o no lo hacen en absoluto (Fig. 8). Esta respuesta involucra cambios drásticos en la fisiología celular y morfología, cambios estructurales en la envoltura celular, alteración de la composición de la membrana, diferencias en la compactación del DNA. La limitación de nutrientes no siempre resulta en una transición a la fase estacionaria pero usualmente activa una respuesta general a estrés (Hengge-Aronis, 1993), aunque la falta de nutrientes es solo una de las señales que inducen esta respuesta (Hengge-Aronis, 2002).

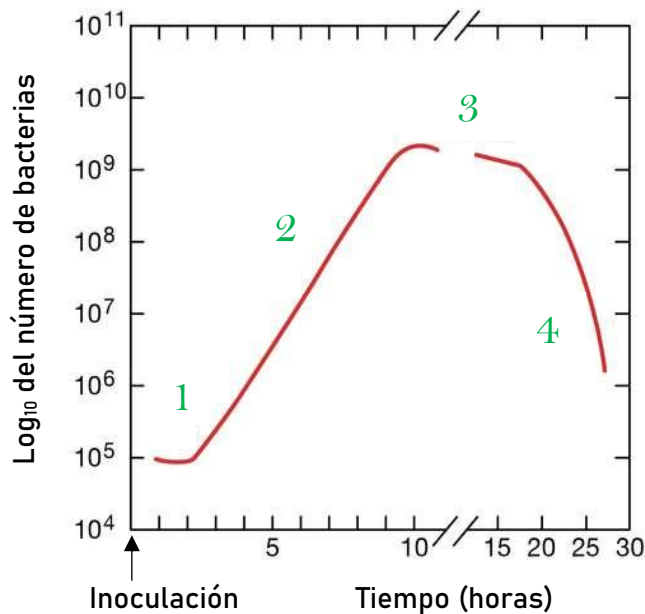


Figura 8. Curva general de crecimiento bacteriano. Inmediatamente después de la inoculación de la bacteria en el medio esta no se reproduce y el tamaño poblacional permanece constante, en su lugar las células, que son metabólicamente activas, aumentan de tamaño y sintetizan proteínas necesarias para la división celular, esta es la fase de adaptación o lag (1). Posteriormente la población entra a la fase logarítmica o exponencial (2), en la cual el número de células incrementa exponencialmente. Esta fase continúa hasta que los nutrientes comienzan a agotarse o se acumulan productos tóxicos en el medio. Entonces la división celular se detiene, por lo que la tasa de crecimiento se mantiene, esto significa que las células han entrado a fase

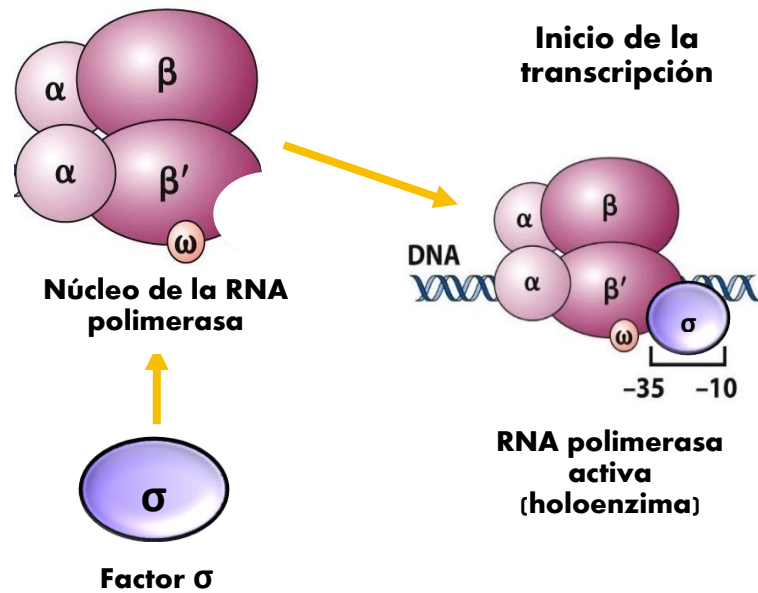
estacionaria (3). Finalmente, cuando los nutrientes en el medio se han agotado y los productos tóxicos acumulados son demasiados las células entran a la fase de muerte celular o decaimiento (4). Mientras más cerca están las células de la fase 4 son menos viables. (Modificado de <https://www.britannica.com/science/bacteria/Growth-of-bacterial-populations>)

La respuesta general al estrés es controlada por la subunidad sigma alternativa (σ) de la RNA polimerasa, σ S (RpoS) (Hengge-Aronis, 2002). Los factores sigma son subunidades del núcleo de la RNA polimerasa que le permiten reconocer las secuencias promotoras del DNA para iniciar la transcripción. Además de los factores sigma constitutivos que controlan la transcripción de genes esenciales,

las bacterias también poseen factores sigma alternativos que reconocen promotores de un grupo específico de genes (Dong & Schellhorn, 2010).

En las células en fase estacionaria o estresadas, el núcleo de la RNA polimerasa es modificado: la enzima núcleo de la RNA polimerasa que contiene al factor sigma vegetativo σ_{70} ($E\sigma_{70}$ o RpoD) es reemplazado parcialmente por σ_S ($E\sigma_S$ o RpoS), el cual reconoce a promotores específicos de genes de respuesta a estrés (Fig. 9). Entonces, la expresión de un grupo de genes de fase estacionaria es inducida. Es por esto que RpoS es un regulador de importancia central para la expresión génica durante la transición a fase estacionaria y en condiciones de estrés (Hengge-Aronis, 2002).

Figura 9. RNA polimerasa bacteriana. El núcleo de la RNA polimerasa en bacterias está constituido por dos subunidades idénticas α , las cuales se encargan del ensamble de la proteína y ayudan al reconocimiento de promotores, una subunidad β y una β' , que son los centros catalíticos y de unión a DNA, y una subunidad ω , la cual se encarga de brindarle estabilidad a la proteína y permite que la transcripción sea eficiente. En conjunto, las subunidades antes mencionadas constituyen una



enzima no activa (apoenzima), para ser una enzima funcional o activa (holoenzima) necesita la unión de una subunidad extra, la subunidad σ , la cual puede ser una subunidad constitutiva como la σ_{70} o una subunidad alternativa como σ_S (RpoS). (Modificado de <https://www.quora.com/Whats-the-process-of-synthesizing-a-protein-from-instructions-in-DNA-in-prokaryotic-organism-relating-to-mRNA-tRNA-amino-acid-ribosome-and-polypeptide>).

La acumulación de RpoS en el citosol reduce la expresión de genes relacionados con el crecimiento debido a la competencia con el factor vegetativo σ_{70} por una limitada cantidad de unidades núcleo de RNA polimerasa (Mata *et al.*, 2017). Aunque $E\sigma_S$ y $E\sigma_{70}$ usan básicamente la misma secuencia promotora núcleo en las regiones -35 y -10 , se puede alcanzar clara selectividad con las secuencias que flanquea a las regiones núcleo. Además, este sistema puede actuar modularmente, es decir, distintas combinaciones de características pueden ser usadas para generar selectividad en distintos promotores. Además, se cree que $E\sigma_S$ puede compensar el reconocimiento no óptimo de promotores con la

formación de un complejo abierto estable de una forma distinta a Eσ70 (Hengge-Aronis, 1993; Hengge-Aronis, 2002).

En *E. coli*, uno de los factores de adaptación más importantes es precisamente RpoS, cuyo regulón incluye el 10% de los genes de esta bacteria, pues juega un papel crítico en la supervivencia a distintos tipos de estrés, incluyendo

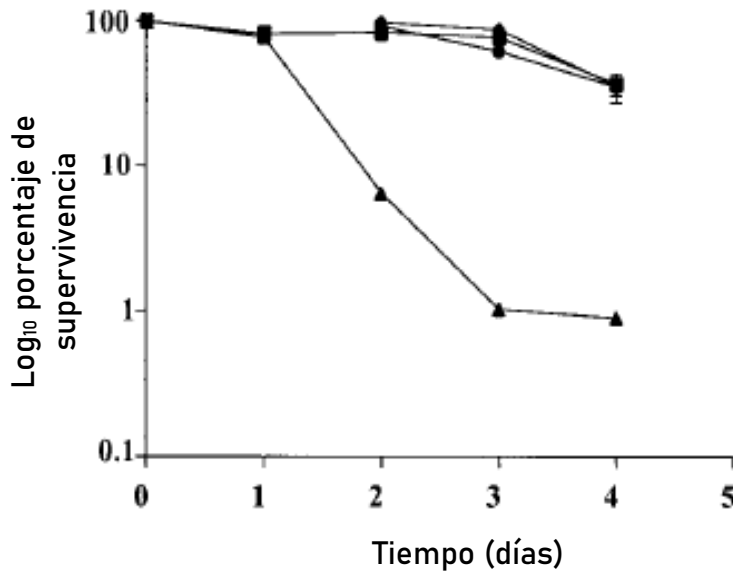


Figura 10. Efecto de la mutación de *rpoS* sobre la supervivencia a la inanición de carbono en *Burkholderia pseudomallei*. Cepa parental de *B. pseudomallei* (■). Mutante *rpoS* (▲). Cepa parental de *B. pseudomallei* complementada con un plásmido (pBBS1) que codifica para el gen completo *rpoS* (◆). Mutante *rpoS* complementada con plásmido pBBS1 (●). Se observa una disminución muy importante en la tasa de supervivencia de la cepa mutante en *rpoS* en comparación con las cepas que sí presentan RpoS, resaltando la importancia de este regulador transcripcional para la supervivencia en condiciones de estrés (Modificado de Subsin *et al.*, 2003).

hiperosmolaridad, pH ácido, temperaturas altas o bajas no óptimas (choque térmico), estrés oxidativo, falta de nutrientes (inanición) y exposición cercana a luz ultravioleta (UV) (Hengge-Aronis, 2002; Dong & Schellhorn, 2010).

Los genes activados por RpoS confieren también resistencia a etanol, provocan cambios en la envoltura celular y en

general sobre la morfología de la célula. Además, el metabolismo se ve afectado pues las células cambian de un metabolismo de máximo crecimiento a un metabolismo de mantenimiento. Controla también genes que

median la apoptosis en fase estacionaria, sacrificando algunas células de la población para poder mantener a otras con los nutrientes restantes. Por todo lo anterior, RpoS es un regulador maestro que conecta redes de señalización muy complejas, las cuales controlan genes de respuesta general a estrés y aunque no es considerado un gen esencial, su presencia aumenta de manera importante la supervivencia bacteriana en ambientes con niveles altos de estrés (Fig. 10) (Hengge-Aronis, 2002; Mata *et al.*, 2017).

En *E. coli* los niveles de RpoS son bajos en la fase exponencial de crecimiento, debido a una reducción en su transcripción y atenuada traducción, pero, sobre todo, por su proteólisis rápida mediada por la proteína RssB. La degradación de RpoS es suprimida en fase estacionaria, resultando en un aumento en los niveles

de la proteína (Dong & Schellhorn, 2010; Franchini *et al.*, 2015). Este regulador es objeto de diversas y múltiples formas de control, siendo regulado a nivel transcripcional, traduccional, post-transcripcional, y postraduccional (Mata *et al.*, 2017). La expresión de RpoS es sensible a los cambios ambientales mencionados con anterioridad y está bajo el control de muchos factores de regulación como acetato, ppGpp (guanosa penta-fosfato) y cAMP (Dong & Schellhorn, 2010; Franchini *et al.*, 2015) y su concentración aumenta bajo distintas circunstancias y situaciones, pero siempre se ha asociado a la reducción de la tasa de crecimiento (Mata *et al.*, 2017).

RpoS se ha encontrado en cerca de 30 géneros de bacterias, principalmente en miembros de la clase Gamma-proteobacteria, afectando la virulencia en distintos patógenos humanos incluyendo *Salmonella* sp., *V. cholerae*, *P. aeruginosa* y *Y. enterocolitica*. Aunque RpoS tiene distintos papeles en la patogénesis de estos organismos y sus efectos sobre la virulencia pueden ser altamente variables entre especies, puede jugar un papel positivo en la protección de la bacteria contra estrés, regulando directamente la expresión de factores de virulencia en algunos patógenos, aumentando la supervivencia contra el sistema de defensa del huésped y en ambientes hostiles como el tracto gastrointestinal u otras condiciones con alto nivel de estrés (Dong *et al.*, 2008; Mata *et al.*, 2017); mientras que en otros puede ser dispensable o incluso inhibitorio de la virulencia (Dong & Schellhorn, 2010).

Particularmente, en miembros de las familias Enterobacteriaceae y Pseudomonadaceae, RpoS controla la expresión de factores de virulencia extracelulares y es importante para su patogenicidad (Subsin *et al.*, 2003). En *C. rodentium* el nivel transcripcional de todos los operones LEE aumenta con la expresión de RpoS (Mata *et al.*, 2017). En *E. coli*, *S. typhimurium* y *Shigella flexneri* también activa genes necesarios para la virulencia (Suh *et al.*, 1999). Además, en *Legionella pneumophila* la entrada a fase estacionaria y la limitación de nutrientes están correlacionados con la expresión de factores de virulencia (Subsin *et al.*, 2003).

1.6. Lrp y la respuesta a leucina

Los sistemas de regulación transcripcional usualmente modulan la concentración y las tasas de síntesis de algunas moléculas pequeñas por medio de la regulación de enzimas metabólicas y de transporte. En muchos casos esta modulación está conectada por un solo factor de transcripción que percibe la concentración de la molécula pequeña (Cho *et al.*, 2008). Uno de estos reguladores transcripcionales es la proteína sensible a leucina (Lrp, por sus siglas en inglés), la cual es una proteína asociada a nucleóide involucrada en la regulación transcripcional de un amplio rango de bacterias y arqueas, entre ellas *E. coli*, de la cual regula aproximadamente el 10% de los genes (~400 genes). Dentro de estos 400

genes, el 70% es inducido durante la transición de fase exponencial a estacionaria. Debido a esto, se considera que juega un papel esencial en la regulación transcripcional cuando las células cambian de un ambiente rico a uno con pocos nutrientes, es decir, bajo condiciones de crecimiento estacionario (Chen *et al.*, 2001).

En general, Lrp regula positivamente genes anabólicos y negativamente genes catabólicos (Chen *et al.*, 2001). Este patrón sugiere que su papel fisiológico es monitorear el estado nutricional de la célula para ajustar su metabolismo dependiendo de las condiciones nutricionales, cooperando en otras redes regulatorias como la de RpoS para adaptarse y coordinar estos cambios derivados de variaciones en el ambiente nutricional (Landgraf *et al.*, 1996; Cho *et al.*, 2008), lo cual hace a Lrp muy importante en la organización metabólica (Newman & Lin, 1995).

Debido a su capacidad de regulación tan amplia se le considera como un regulador transcripcional global y puede reprimir algunos operones y activar otros (Cho *et al.*, 2008; Peterson & Reich, 2010). El regulón de Lrp incluye genes y operones involucrados en supervivencia y tolerancia a pH, temperaturas bajas, alta salinidad, ambientes ácidos, así como transporte de moléculas pequeñas, oligopéptidos y nutrientes, síntesis de pili, biosíntesis, degradación y utilización de aminoácidos, asimilación de nitrógeno y como regulador importante de factores como citotoxicidad, quimiotaxis, adquisición de hierro (van der Woude *et al.*, 1995; Cho *et al.*, 2008; Ho *et al.*, 2017). También se ha demostrado un papel esencial en patógenos como *S. typhimurium*, *Xenorhabdus nematophila*, *V. cholerae*, *E. coli* o *C. rodentium*, siendo regulador de muchos genes de virulencia (Ho *et al.*, 2017).

En *S. typhimurium*, se requiere para la producción de fimbrias tipo 1, actuando como regulador positivo o negativo dependiendo de sus concentraciones intracelulares, que se relacionan cercanamente al ambiente nutricional (Baek *et al.*, 2011). Mientras que en *E. coli* es un determinante muy importante de síntesis fimbrial, ayudando a modular las variaciones de fase por las cuales estos genes son regulados y a determinar sus niveles de expresión, estando involucrada en la transcripción de una variedad de operones fimbriales entre los cuales se encuentran *pap*, *daa*, *sfa*, *fan*, *fae* y *fim*, que codifican para las fimbrias Pap, F1845, S, K99, K88 y tipo 1, respectivamente (Newman & Lin, 1995; van der Woude *et al.*, 1995). Lrp regula directamente la transcripción de muchos de estos genes uniéndose a secuencias dentro o cerca de los promotores (Peterson & Reich, 2010). Debido a lo anterior, este regulador tiene un gran efecto sobre la patogenicidad celular, ya que de las fimbrias depende la exitosa colonización del huésped (Newman & Lin, 1995).

En particular Lrp está altamente conservada dentro de las bacterias entéricas (Peterson & Reich, 2010). Este alto grado de conservación predice que tiene un importante papel en esa familia bacteriana, pues puede actuar como regulador

transcripcional y también como organizador de la estructura cromosomal bacteriana debido a sus propiedades bioquímicas y estructurales (Newman & Lin, 1995; Peterson & Reich, 2010). Es una proteína con un gran número de moléculas en la célula (~3000 moléculas/célula), que puede doblar el DNA uniéndose a sitios específicos en los promotores o cerca de ellos (Müller *et al.*, 2009). Además, se han observado cambios conformacionales en el DNA cuando homólogos de Lrp se unen a él y se han revelado estructuras multiméricas de Lrp con DNA enrollado alrededor, similar al DNA eucarionte enrollado alrededor de histonas. Debido a estas características y además de su papel como regulador transcripcional, se le considera como una proteína organizadora de DNA (Newman & Lin, 1995; Chen *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2008).

Lrp tiene una masa molecular monomérica de 18.8 kDa (164 residuos de aminoácidos) y en *E. coli* existe en solución como un dímero, octámero o hexadecámero. Su estructura cristalográfica (Fig. 11) revela un dominio N-terminal con unión a DNA en la superficie y un dominio C-terminal interno, que permite la interacción entre cada monómero. En miembros del regulón Lrp que han sido estudiados extensivamente hay múltiples sitios de unión de la proteína cerca de sus respectivos promotores e *in vitro* se une cooperativamente a estos sitios con afinidades en el rango nanomolar, lo que lleva a la formación de grandes complejos nucleoproteicos (Landgraf *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2001).



Figura 11. Estructura cristalográfica del octámero de Lrp en *E. coli*. Los monómeros se muestran de distintos colores (Tomado de Peterson & Reich, 2010)

La forma multimérica predominante depende de la concentración de Lrp y del ambiente y condiciones celulares, con dímeros predominando en concentraciones nanomolares, y octámeros y hexámeros en concentraciones micromolares, siendo estas últimas condiciones las que más prevalecen en la célula *in vivo* (Landgraf *et al.*, 1996). Algunos promotores requieren que Lrp adopte un estado de oligomerización particular para unirse aunque para otros cualquier estado de oligomerización es suficiente (Chen *et al.*, 2001; Peterson & Reich, 2010).

La concentración de Lrp varía inversamente con la tasa de crecimiento, es decir mucho Lrp libre es asociado con crecimiento lento y poco Lrp libre se asocia a crecimiento rápido, entonces, las concentraciones de Lrp *in vivo* son más altas cuando se encuentra en fase exponencial tardía o estacionaria (Landgraf *et al.*, 1996; Peterson & Reich, 2010).

Como su nombre sugiere, la acción reguladora de Lrp en genes blanco usualmente es modulada con la unión de una molécula efectora pequeña, la leucina, que puede ser un indicador de las condiciones nutricionales. Este aminoácido le permite a Lrp afectar la regulación transcripcional en todas las formas posibles (Fig.12), es decir, con la adición de leucina exógena al medio la actividad de Lrp puede ser aumentada (modo concertado), revertida (modo recíproco) o no afectada (modo independiente) (Cho *et al.*, 2008).

Se han reconocido seis distintos patrones de afectación en la expresión de los miembros del regulón Lrp, dependiendo de si la leucina actúa negativa o positivamente y la forma en la que afecta la expresión (Fig. 12): para aquellos casos en los que Lrp actúa positivamente, la leucina puede 1) no tener ningún efecto en la activación mediada por Lrp, también puede 2) potenciar su efecto o puede 3) contrarrestar el efecto de Lrp, causando una expresión reducida. Similarmente, en los casos donde Lrp actúa negativamente hay ejemplos en los que la leucina 4) no tiene ningún efecto en la represión mediada, 5) contrarresta el efecto ó 6) es requerida para el efecto (Chen *et al.*, 2001).

La proporción de Lrp libre disminuye con suplementación de leucina y esto controla el equilibrio entre hexadecámero y octámero unido a leucina. En condiciones de crecimiento lento se favorece el hexadecámero y en crecimiento rápido el octámero unido a leucina. Además, la leucina puede regular la distribución de Lrp entre el citoplasma y el nucleóide a través de sus efectos en la oligomerización de la proteína (Chen *et al.*, 2001).

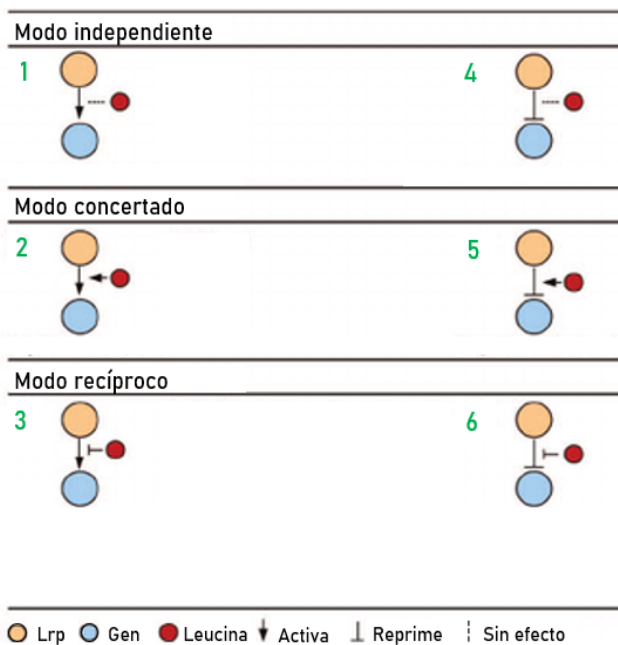


Figura 12. Modos de regulación transcripcional por Lrp en respuesta a leucina exógena

2. Antecedentes

2.1. Identificación del operón *cfc* por STM en *C. rodentium*

En 2003, Mundy *et al.*, buscando ampliar el conocimiento con respecto a los mecanismos sobre la patogénesis de las bacterias A/E y, en particular, para la identificación de genes de virulencia en *C. rodentium*, usaron la mutagénesis marcada con firma (STM, por sus siglas en inglés), la cual permite hacer la búsqueda de un gran número de mutantes empleando un número pequeño de animales. Aquellas mutantes con inserciones en genes necesarios para la colonización fallan al intentar establecer una infección sostenida en el huésped y se identifican por selección negativa. Esta técnica llevó a la identificación de un nuevo operón, denominado *cfc* (Factor de Colonización de *Citrobacter*), el cual tiene 12 genes, con homología en otros patógenos (Fig. 13), que codifican para fimbrias tipo IV, y lo reconocieron como un factor esencial para la colonización del huésped.

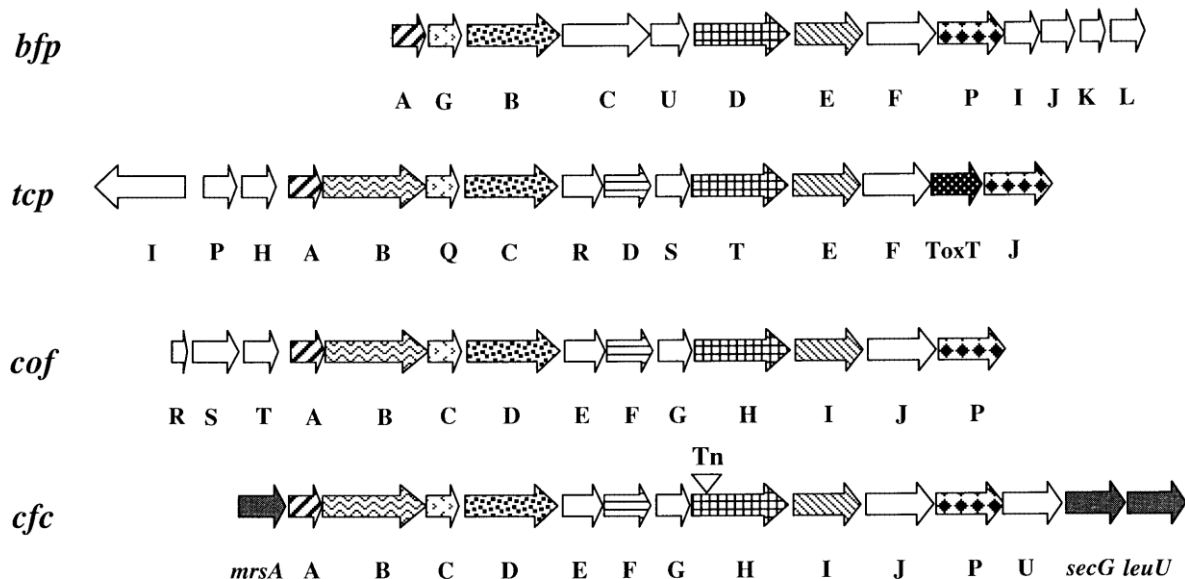


Figura 13. Organización genética de operones homologos de enteropatógenos con función en la colonización. *cfc* (en *C. rodentium*), *cof* (en *E. coli* enterotoxigénica, ETEC), *tcp* (en *V. cholerae*), y *bfp* (en EPEC). Los genes homologos se indican con el mismo patrón (Modificado de Mundy *et al.*, 2003).

2.2. Descubrimiento de RegA como factor de virulencia y desrepressor transcripcional del operón *Kfc* en *C. rodentium*

Hart *et al.* (2008) determinaron por STM que RegA, un regulador transcripcional de *C. rodentium*, se requiere para la colonización en el intestino murino. Además, se descubrió, por un análisis de microarreglos, que RegA regula algunos ORF's codificantes de proteínas con homología a factores de colonización conocidos en

otros patógenos, entre los que se encuentra un operón homólogo al que codifica para la fimbria K99 en ETEC, por lo que lo denominaron Kfc (K99-like factor involved in *Citrobacter* colonization). Observaron que la mutante de *kfc* en *C. rodentium* fue erradicada por el hospedero más fácilmente que la cepa silvestre y que el número de unidades formadoras de colonia (UFC) recuperadas en las heces de los ratones infectados con la mutante de *kfc* fue menor que las recuperadas de aquellos huéspedes infectados con la cepa silvestre entre el día 15 y 20 después de la inoculación (Fig. 14), indicando un aparente rol de Kfc en la virulencia de la bacteria durante la etapa tardía de infección.

Adicionalmente se observó que la transcripción de los genes regulados por RegA depende de la presencia de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), el cual es abundante en el tracto intestinal y funciona como una señal de activación, facilitando y estabilizando la unión de RegA al operador. La interacción de RegA con su DNA blanco resulta en la formación de una estructura nucleosomal que desplaza proteínas tipo histonas como H-NS de las regiones promotoras de los genes que regula, propiciando una desrepresión transcripcional.

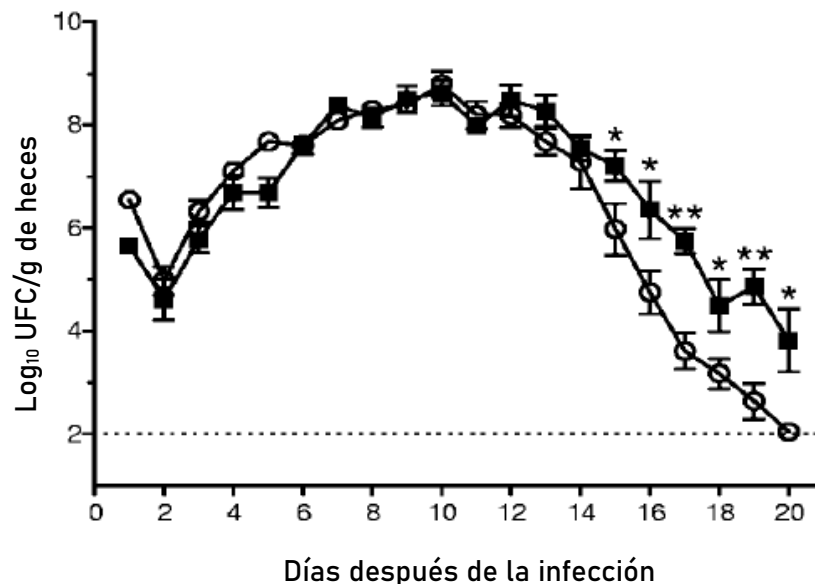


Figura 14. Efectos de la mutación de *kfc* en la colonización de ratón por *C. rodentium*. Se observan menos unidades formadoras de colonia (UFCs) en las heces de ratones infectados con la cepa mutante en *kfc* (○), durante los últimos días de infección, comparado con la cepa silvestre ICC169 (■), además, se observa que para el día 20 la cepa mutante fue casi completamente eliminada del sistema del ratón, mientras que en la cepa silvestre se mantiene (Modificado de Hart *et al.*, 2008).

2.3 Secuenciación del genoma completo de *C. rodentium* e identificación de 19 operones fimbriales putativos

En el año 2010 Petty *et al.* reportaron el genoma completamente anotado del cromosoma de 5.3-Mb y los cuatro plásmidos de la cepa ICC168 de *C. rodentium*. La secuenciación del genoma reveló información clave sobre su filogenia, demostrando su cercana relación con EPEC y EHEC (Fig. 15), y se reconoció un número significativo de genes presentes en EPEC, EHEC y *C. rodentium* que están ausentes de la cepa de *E. coli* no patogénica, K-12, la mayoría de los cuales están localizados en elementos genéticos móviles y han sido reconocidos como determinantes clave de virulencia, incluyendo a LEE y muchas proteínas efectoras, siendo muy probable que la adquisición de estos factores haya sido responsable de la convergencia en la evolución de sus estrategias de virulencia. Además, identificaron 1585 secuencias codificantes específicas de *C. rodentium* sin ortólogos en EPEC o EHEC. Y se descubrió un total de 19 operones de biogénesis fimbrial en el patógeno murino (Fig. 16), siendo 12 de ellos parte de la familia C/U.

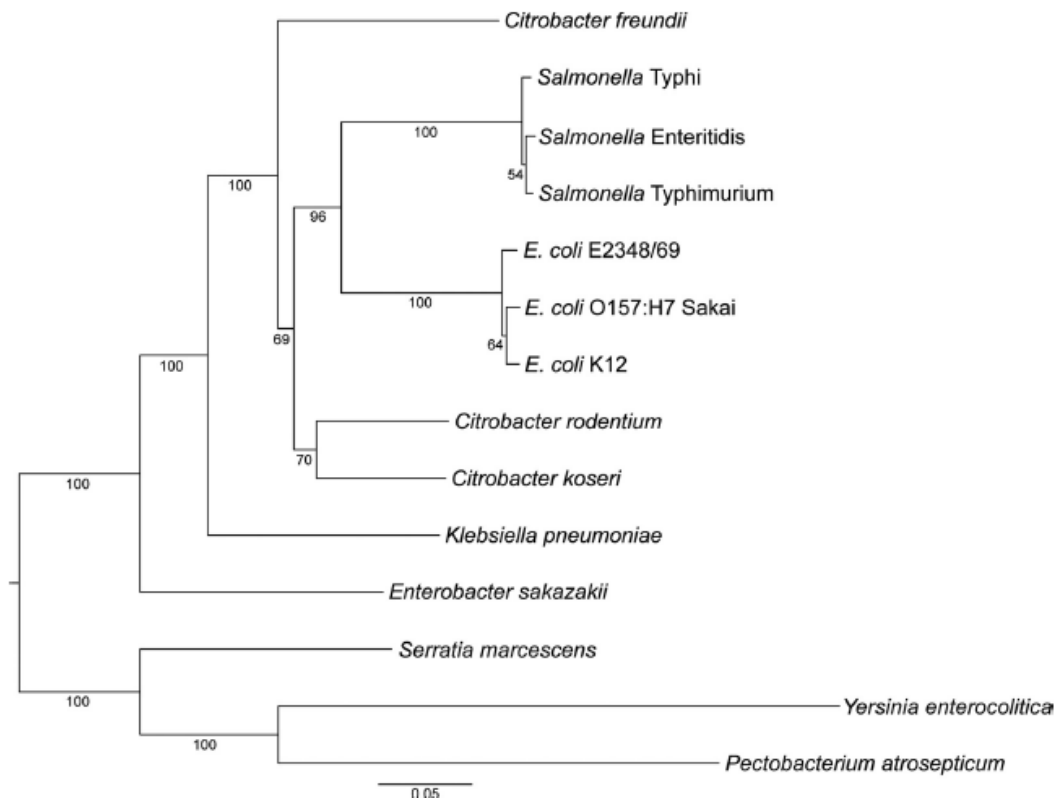


Figura 15. Filogenia de *C. rodentium*. Se muestra la relación filogenética de *C. rodentium* con otras bacterias entéricas, basada en las secuencias nucleotídicas de siete genes constitutivos (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, and *recA*). Como grupo externo se usó a *Yersinia enterocolitica*, *Serratia marcescens*, y *Pectobacterium atrosepticum*. La barra de escala representa el número de sustituciones por sitio (Obtenido de Petty *et al.*, 2010).

Operones	CDS ID	Genes	Descripción
1	ROD_01101-01121	<i>hofCB-ppdD</i>	Fimbria tipo IV
2	ROD_03631-03691	<i>gcfFGABCDE</i>	Gcf (fimbria de colonización intestinal, por sus siglas en inglés)
3	ROD_03351,10951-11021	<i>crl csgGFEDBAC</i>	Fimbria tipo curli
4	ROD_11771-11781		Fimbria tipo chaperona-usher
5	ROD_18141-18181	<i>lpfEDCBA</i>	Fimbria polar larga (tipo chaperona usher)
6	ROD_19341-19381		Fimbria tipo chaperona-usher
7	ROD_22311-22341		Fimbria tipo chaperona-usher
8	ROD_27771-27801	<i>fimBEAICDFGHK</i>	Fimbria tipo chaperona-usher
9	ROD_29101-29191		Fimbria tipo chaperona-usher
10	ROD_29201-29241		Fimbria tipo chaperona-usher alternativa
11	ROD_29351-29391		Fimbria tipo chaperona-usher
12	ROD_34961-35021		Fimbria tipo chaperona-usher
13	ROD_41241-41291	<i>kfcHGFEDC</i>	Kfc (factor de colonización tipo K99 de <i>Citrobacter</i> , por sus siglas en inglés)
14	ROD_41241-41291	<i>flp1 rcpCA tadZABCD tadVEFG</i>	Locus de estrecha adherencia (<i>tad</i>) (Fimbria tipo IV)
15	ROD_44281-44321	<i>hofMNOPQ</i>	Fimbria tipo IV
16	ROD_46461-46571	<i>cfcABCDEFGHJJPV</i>	CFC (factor de colonización de <i>Citrobacter</i> , por sus siglas en inglés)
17	ROD_50611-50651		Fimbria tipo chaperona-usher
18	ROD_p1161-p1201		Fimbria tipo chaperona-usher
19	ROD_p1291-p1301		Fimbria tipo chaperona-usher

Figura 16. Operones de biosíntesis fimbrial identificados en *C. rodentium* (Modificado de Petty *et al.*, 2010)

2.4. Reconocimiento de la fimbria C/U, Gcf, como un factor esencial de virulencia en *C. rodentium*

En 2015, Caballero *et al.*, identificaron un factor de virulencia nuevo en *C. rodentium*, llamado fimbria de colonización intestinal (Gcf, por sus siglas en inglés), el cual es codificado por un operón fimbrial de la familia C/U. Al estudiar este operón observaron que la mutante en *gcfA* mostraba defectos severos en la colonización durante los primeros 10 días de infección (Fig. 17), entonces, basados en la atenuación de la colonización del intestino del ratón, realizaron pruebas para estudiar su regulación. El promotor de *gcf* no es activo en *C. rodentium* bajo diversas condiciones de crecimiento *in vitro* que sostienen la expresión de otros operones fimbriales, pero se obtuvo expresión en una mutante de un ortólogo muy cercano a la proteína estructuradora de nucleoide de *E. coli*, H-NS, demostrando que es altamente reprimido por esta proteína en las condiciones probadas. Además, se comprobó unión de H-NS a la región reguladora de *gcf* apoyando su papel como regulador negativo directo de la transcripción del operón. También se observó que este operón es diferencialmente

regulado por el medio de cultivo, pues Medio Mínimo-N (MM-N) permitió un aumento muy importante en su expresión, comparado con su crecimiento en LB y DMEM.

Debido a lo anterior, se reconoció que Gcf es un factor necesario para la colonización del hospedero, particularmente para el establecimiento temprano de una infección exitosa en el tracto gastrointestinal murino por *C. rodentium*, aunque se exprese poco en condiciones *in vitro*. Demostrando también que está regulado negativamente por la proteína H-NS, y diferencialmente expresado dependiendo del medio de cultivo.

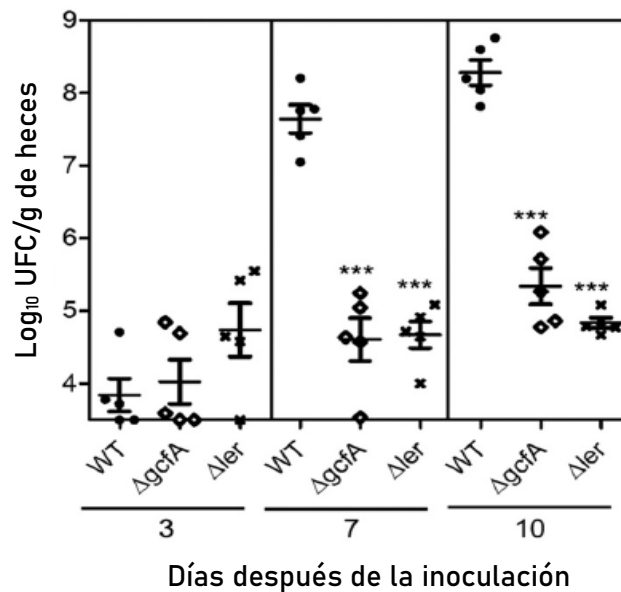


Figura 17. Gcf es necesario para la colonización de ratón por *C. rodentium*. Concentración de bacterias en las heces de ratones infectados con tres cepas de *C. rodentium*, silvestre, $\Delta gcfA$ y Δler (control). Se observa que a partir del día 7 hay diferencias muy significativas en la concentración de bacterias encontradas en las heces de los animales infectados, disminuyendo en la mutante de *gcfA* (Modificado de Caballero et al., 2015).

2.5. Identificación de la importancia de Crf2 para la adherencia a células y la colonización a ratón

Para estudiar el papel de la fimbria Crf2 de *C. rodentium* en la adherencia a células intestinales y colonización de ratón, Saldaña *et al.*, (publicación en proceso) generaron dos mutantes de la fimbria, una sin la región promotora (DBS100 $\Delta Pcrf2$) y otra carente del gen que codifica a la subunidad mayor de la fimbria (pilina) (DBS100 $\Delta crf2A$). Como control se usó la cepa DBS100 $\Delta crf2$ complementada *en trans* con el vector pBAD *crf2A*. Con estas cepas y la silvestre DBS100 se llevaron a cabo ensayos de adherencia a células intestinales Caco-2 y de colonización a ratón. En ambas mutantes de la fimbria se observó un claro

retraso durante la colonización temprana (Fig. 18 A y B). Además, la cepa mutante del gen *crf2A* mostró una disminución significativa en la adherencia (88% menos que la cepa silvestre) (Fig. 18 C). Lo anterior permitió reconocer la importancia de Crf2 para la colonización del huésped y para la adherencia celular.

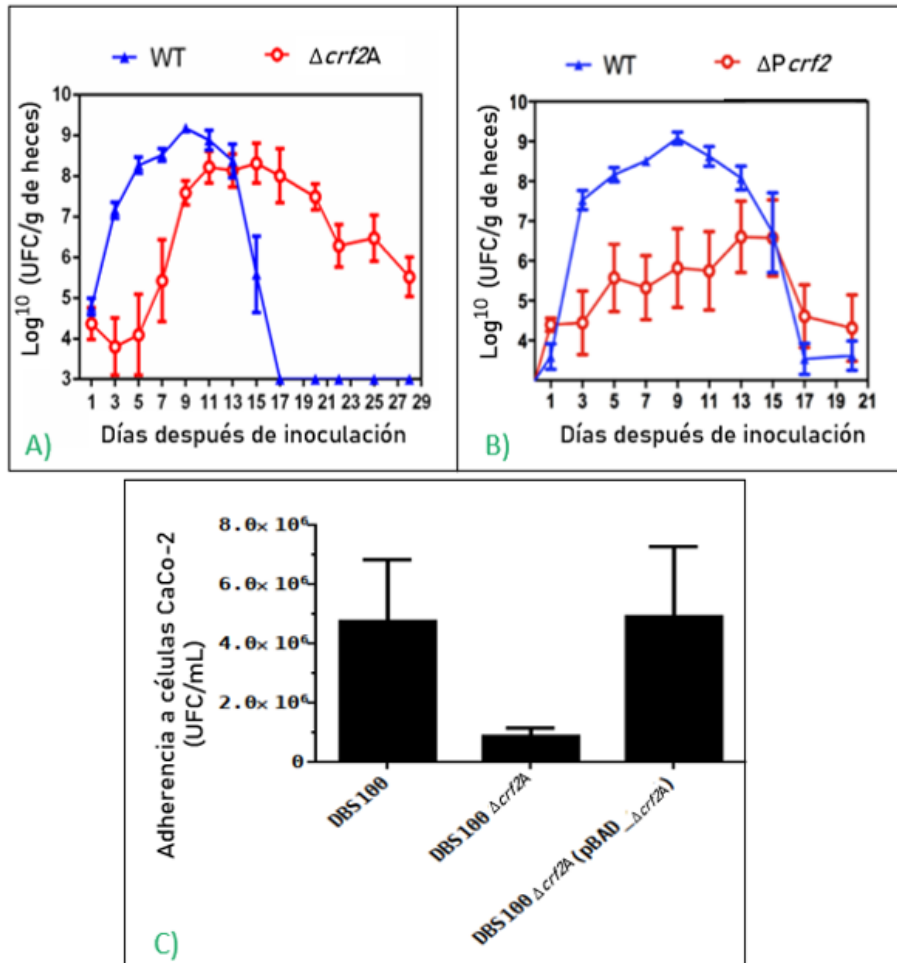


Figura 18. Ensayos de colonización a ratón y adherencia a células mediadas por Crf2 de *C. rodentium*. A) Mutante del gen *crf2A* ($\Delta crf2A$) y B) mutante del promotor de *crf2* ($\Delta P crf2$). Ambas mutantes mostraron un claro retraso de la colonización temprana al intestino de los ratones examinados en comparación con la cepa silvestre DBS100 (WT). C) Adherencia a células intestinales CaCo-2 disminuida en la mutante del gen *crf2A* ($\Delta crf2A$) con respecto a la silvestre DBS100 y recuperada en la cepa DBS100 $\Delta crf2A$ complementada *en trans* con el vector pBAD_{crf2A} (Modificado de Saldaña *et al.*, en proceso).

3. Justificación

EHEC y EPEC son importantes causantes de gastroenteritis aguda en humanos (Wiles *et al.*, 2004), lo cual puede llevar a deshidratación mortal o hipovolemia, sobre todo en infantes. A pesar de su relevancia médica, su patogenicidad en roedores es baja, por lo que es difícil estudiarlos en modelos *in vivo*. Pero *C. rodentium* es un patógeno murino que, al igual que EPEC y EHEC, usa lesiones A/E para lograr la colonización de su huésped y se ha usado como modelo subrogado para estudiar las bases celulares y moleculares de ese tipo de lesiones, ya que la infección que ocasiona en ratones aporta información robusta sobre el proceso de enteropatogénesis y la interacción entre el patógeno y su hospedero natural bajo condiciones fisiológicas, lo cual es relevante para ayudar a entender los procesos patogénicos de *E. coli* en humanos (Wiles *et al.*, 2004; Barba *et al.*, 2005; Borenshtein *et al.*, 2008).

Además, las fimbrias son un factor de virulencia importante (Saldaña *et al.*, 2009) y las bacterias patógenas tienen genes para muchos tipos de fimbrias, pero su función y regulación no se han estudiado a detalle (Caballero *et al.*, 2015). *C. rodentium* tiene un repertorio de 19 operones fimbriales putativos (Petty *et al.*, 2010) por lo que el estudio de su regulación puede brindarnos un panorama más amplio sobre el proceso de colonización. Todo lo anterior es relevante porque al entender los mecanismos de patogénesis de las bacterias, desde cómo se transmiten, se propagan y finalmente, cómo colonizan a su huésped, se pueden encontrar soluciones para controlar y tratar enfermedades infecciosas.

4. Hipótesis

Si se estudia la transcripción de algunos operones fimbriales de la familia C/U de *C. rodentium* bajo diferentes condiciones de crecimiento *in vitro* es posible encontrar condiciones que induzcan su expresión y factores que la regulen.

5. Objetivos

5.1. General

Analizar la expresión y regulación de operones fimbriales pertenecientes a la familia C/U en *C. rodentium*

5.2. Particulares

- Analizar la expresión de los operones *pkkc2*, *crf2* y *crf4* en *C. rodentium* bajo distintas condiciones de crecimiento.
- Determinar el papel de los reguladores H-NS, PehH, CicR, StpA, Ler, Crp, RpoS y Lrp en la expresión de los operones fimbriales.
- Explorar la interacción proteína-DNA entre reguladores transcripcionales y regiones reguladoras de los operones.

6. Materiales y métodos

6.1. Cepas, plásmidos y medios de cultivo usados

Los medios de cultivo, cepas y plásmidos usados en este trabajo se enlistan en las tablas 1, 2 y 3, respectivamente. Para los precultivos de toda la noche (O.N.) se usaron medios de cultivo con los antibióticos correspondientes, dependiendo de la resistencia de las cepas mutantes (kanamicina) o de la que confiere el plásmido pKK232-8 (ampicilina).

Para obtener el medio precondicionado se crecieron células HeLa en medio DMEM adicionado con 10% de suero fetal bovino y piridoxal fosfato, por 48-72 horas a 37°C en botella de cultivo celular de 76 cm², pasado el tiempo, el medio se recuperó y se filtró para eliminar las células de él y se le adicionó el volumen requerido de medio LB.

Tabla 1. Medios de cultivo usados en el estudio

Nombre del medio	Composición (Por litro)	Uso	Antibióticos
S.O.C	Triptona 2%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl ₂ 10 mM, MgSO ₄ 10 mM, glucosa 20 mM	Recuperación de células transformadas	Ninguno
Caldo Luria-Bertani (LB)	10 g/L de triptona de caseína, 5 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de NaCl, pH 7.5	Precultivos O.N. y ensayos de actividad transcripcional CAT	Precultivos O.N.: -Ampicilina (Amp) 200 µg/mL -Kanamicina (Km) 30 µg/mL
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium de Gibco™ (alta glucosa, piruvato, sin glutamina). Usado directo del	Ensayos de actividad transcripcional CAT	Ninguno
Medio mínimo-N (M.M.-N)	Con glucosa: KCl 5 mM, (NH ₄) ₂ SO ₄ 7.5 mM, K ₂ SO ₄ 0.5 mM, KH ₂ PO ₄ 1 M, MgCl ₂ 200 µM 1 mM, casaminoácidos 0.1%, 100 mM Tris HCl, glucosa 0.5%, pH 7.5 Con glicerol: KCl 5 mM, (NH ₄) ₂ SO ₄ 7.5 mM, K ₂ SO ₄ 0.5 mM, KH ₂ PO ₄ 1 M, MgCl ₂ 200 µM 1 mM, casaminoácidos 0.1%, 100 mM Tris HCl, glicerol 0.5%, pH 7.5		

Tabla 2. Cepas empleadas

Nombre de la cepa	Genotipo	Referencia
DBS100	<i>C. rodentium</i> silvestre sin resistencia a antibióticos	Schauer & Falkow, 1993
JPCR1	DBS100 $\Delta hnsI::Km$	Caballero <i>et al.</i> , 2015
JPCR2	DBS100 $\Delta cicR::Km$	
JPCR3	DBS100 $\Delta pehH::Km$	
JPCR4	DBS100 $\Delta stpA::Km$	
JPCR5	DBS100 $\Delta ler::Km$	
DBS100 $\Delta crp::Km$	DBS100 $\Delta crp::Km$	Saldaña <i>et al.</i> , 2020 (En proceso)
DBS100 $\Delta rpoS::Km$	DBS100 $\Delta rpoS::Km$	
DBS100 Δcrp	DBS100 Δcrp	
DH5a	<i>E. coli</i> K-12 sin resistencia a antibióticos	Grant <i>et al.</i> , 1990

Tabla 3. Plásmidos usados. Todos los vectores enlistados confieren resistencia a ampicilina.

Nombre del plásmido	Descripción	Referencia
pKK232-8	Derivado del plásmido pBR322, contiene el gen reportero de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT) sin promotor	Pharmacia Biotech
pKK-C2	Fusión <i>c2-cat</i> de -465 a +34*	Caballero-Flores, (datos sin publicar)
pKK-CRF2-2	Fusión <i>crf2-cat</i> de -461 a +37*	
pKK-CRF4	Fusión <i>crf4-cat</i> de -587 a +102*	Ortíz-Jiménez, (datos sin publicar)
pKK-CRF2-1	Fusión <i>crf2-cat</i> de -237 a +18*	
pKK-CRF2-3	Fusión <i>crf2-cat</i> de -693 a +37*	Saldaña <i>et al.</i> , 2020 (en proceso)

*Posición de la fusión con respecto al ATG de cada gen fimbrial.

6.2. Extracción de plásmidos con fusiones transcripcionales y transformación de cepas mutantes

Se inocularon en 8 mL de caldo LB las cepas de *E. coli* DH5 α que portan los vectores reporteros con las fusiones transcripcionales de las regiones reguladoras de los operones *crf2*, *pkkc2* y *crf4*, así como con el vector vacío pKK232-8, creciéndolas O.N. (~16 horas) a 37°C en agitación. Pasado el tiempo de cultivo, se centrifugó el cultivo a 8000 rpm por 15 minutos, se descartó el sobrenadante, se resuspendió la pastilla en 600 μ L de agua estéril y se extrajeron los plásmidos siguiendo el protocolo del kit Zyppy™ Plasmid Miniprep.

Posteriormente se transformaron por electroporación células electrocompetentes de las cepas mutantes y la silvestre de *C. rodentium*, con los vectores purificados (se transformó cada cepa con cada uno de los plásmidos por separado), depositando 60 μ L de células electrocompetentes con 5 μ L del vector en la celda de electroporación. Se recuperaron en 800 μ L de medio enriquecido SOC por 2 horas y se sembraron 100 μ L de cada cultivo en cajas de medio sólido LB con ampicilina. Se dejaron creciendo a 37°C O.N con agitación. Al día siguiente se picaron colonias individuales de las cajas sembradas el día anterior y se resembraron en otra caja con medio sólido LB, se dejaron creciendo a 37°C O.N. y al día siguiente se confirmó por PCR la presencia del plásmido en tres clones diferentes de cada cepa.

6.3. Reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) y los oligonucleótidos usados para ellas

Todos los oligonucleótidos usados en este trabajo (Tabla 4) fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis de ADN del Instituto de Biotecnología-UNAM (IBt). Las reacciones se realizaron usando Buffer 1X, MgCl₂ 2 mM, Oligos 0.3 μ M, dNTPs 0.2 mM, 1 μ L de Taq Polimerasa (Thermo Fisher) o 2 μ L de la enzima purificada en el IBt, ~100 ng de DNA templado y agua esterilizada para obtener 100 μ L de mezcla de reacción. El programa de amplificación se llevó a cabo por el equipo "PCR system 9700" de Applied Biosystems y fue el siguiente: 1 ciclo de 95°C por 5 min, 30 ciclos de 95°C por 1 min, 50-57°C por 30 seg, 72°C por 1 min y finalmente 1 ciclo de 72°C por 10 min. Las temperaturas de alineación variaron (entre 50 y 57 °C) dependiendo de los oligos empleados para la reacción. Para amplificar el fragmento del gen estructural *crf2A* se utilizó una T_m de 55°C, para los fragmentos de la región reguladora de *crf2* de 511, 237 y 733 pb, la T_m fue de 56, 50 y 57°C, respectivamente.

Tabla 4. Oligonucleotidos usados para PCRs realizadas en este trabajo.

Nombre del oligo	Secuencia 5'-3'	Uso
SEQ2FwpKK232-8	GAGGCCCTTTCGTCTTCAAG	Confirmación de presencia de la fusión transcripcional
SEQ1RvpKK232-8	CAACGGTGGTATATCCAG	
ROD_19381-CAT-F	ACAATGggatccAGCATGAAAATCACGATAAG	Amplificación del segmento de <i>crf2</i> de 501 pb
ROD_19381-CAT-R	GCGGAAaagcttAAATGCCAGCCATACCCAG	
pKK_crf2_F237	ACTggatccCATAAGAATGAATATATC	Amplificación del segmento de <i>crf2</i> de 237 pb
pKK_crf2_R237	AGGaagcttGAAATTGTTTTATTACC	
F_crf2_733	GGAtccGCTGACAAACCAGATCATCGCTTTG	Amplificación del segmento de <i>crf2</i> de 733 pb *Como oligo reverse se utilizó ROD_19381-CAT-R
FC_crf2A	GGGccatggAAACAATTTCTCGGTTC	Amplificación del fragmento del gen <i>crf2A</i>
RC_crf2A	AAAaagcttATCAGTAAATAACGCTGACG	

*Sitios de restricción en minúsculas

6.4. Ensayos de actividad transcripcional CAT

Los ensayos a continuación descritos se hicieron basados en la metodología propuesta por Puente *et al.*, 1996: Se crecieron las cepas transformadas con las fusiones transcripcionales en tubos con 5 mL de medio (M.M-N, LB o DMEM), en proporción 1:100 (se inocularon 50 µL del precultivo O.N.). Al alcanzar una densidad óptica de 1 se colectó y se centrifugó (13,000 rpm por 5 minutos) en tubos eppendorf de 1.5 mL, 1 mL del cultivo. En el caso de las cepas crecidas en M.M-N con glicerol los cultivos no alcanzaron esta densidad óptica, por lo que se concentró un mayor volumen del cultivo hasta alcanzar la O.D. necesaria para la recolección. Se descartó el sobrenadante y se procesó con TDTT (Tris-HCl 50 mM, pH 7.6, ditiotretol, DTT 3µM), se resuspendió en 800 µL de la solución, se centrifugó a 8000 rpm por 5 minutos, descartando el sobrenadante y se resuspendió finalmente en 300 µL de TDTT. Estas muestras procesadas fueron sonicadas posteriormente en un equipo "Soniprep 150", con una amplitud de 35%, pulsos activos de 10 segundos y descansos de 5 segundos, en un tiempo de 3

minutos. Las muestras sonicadas se centrifugaron a 13,000 por 5 minutos y el sobrenadante se recolectó en tubos nuevos Eppendorf de 600 µL.

Para determinar la concentración de proteínas totales se colocaron en microplacas de 96 pozos, 10 µL de la muestra sonicada, añadiendo inmediatamente 200 µL de la mezcla de reacción del “BCA protein assay kit”, de Pierce (25 mL de reactivo A y 500 µL de reactivo B). La placa se incubó por 30 minutos a 37°C y pasado el tiempo se leyó en el equipo CERES 900C de BioTek con el programa KC3 y el método predeterminado “Protodos”.

Para determinar la actividad de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT), se cargaron 5 µL las muestras sonicadas y 200 µL de la mezcla de reacción (5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoic acid, DNTB 1mM diluido en Tris-HCL pH 7.8 0.1 M, más acetil-coA 0.1 mM y cloranfenicol 0.1 mM que fueron añadidos justo antes de cargar la mezcla en la placa). Se leyó inmediatamente en el equipo antes mencionado, en el mismo programa, con el método preestablecido “Catodos”.

6.5. Cinética de crecimiento y de actividad transcripcional CAT

La cepa silvestre DBS100 transformada con el vector pKK-CRF2-2 se creció en caldo LB O.N. a 37°C y en agitación. Al día siguiente se inoculó en proporción 1:100 en tubos de ensaye con 5 mL de M.M-N con glicerol y se creció a 37°C en agitación. Cada dos horas se sacó un tubo (3 y 2 tubos, respectivamente, para las horas 2 y 4) por 24 horas, midiendo la densidad óptica y concentrando los cultivos por centrifugación hasta alcanzar una O.D._{600 nm} de 1. Posteriormente se procesaron con TDTT, se sonicaron de la forma antes mencionada y se cargaron en microplacas de 96 pozos para medir proteína total y actividad CAT.

6.6. Predicción de sitios de unión de reguladores transcripcionales a la región promotora del operón *crf2*

Se realizaron análisis bioinformáticos de las regiones reguladoras de los operones con los que se estuvo trabajando, para ello se usaron los programas en línea B PROM de SoftBerry (<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb>) y Virtual Footprint de Prodoric (http://www.prodoric.de/vfp/vfp_promoter.php), los cuales ayudaron a encontrar regiones posibles de unión de reguladores globales de la transcripción que no habían sido considerados.

6.8. Ensayo de cambio en la corrida electroforética (EMSA)

Para estos ensayos se utilizaron los fragmentos de distintos tamaños de la región promotora del operón *crf2* (237, 501 y 733 pb), usando como control un fragmento

de la región codificante (gen *crf2A*). Estos fragmentos fueron amplificados por PCR y purificados con el kit de extracción de producto de PCR de Biomiga.

Los fragmentos se hicieron interactuar con concentraciones crecientes de la proteína Lrp-His en un buffer de LRP 10X (100 mM Tris, pH 8.0, 2 mM EDTA, 250 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 62.5% [vol/vol] glicerol, 500 mg/ml BSA, y 0.5 mM DTT). La mezcla se incubó por 15 minutos a temperatura ambiente y se separó por electroforesis en geles de acrilamida al 6 ó 5.5 % en un buffer 0.5X de TBE (Tris-borato-EDTA). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador ChemiDoc XRS+ de BioRad.

7. Resultados

7.1 Los operones *pkkc2* y *crf2* se expresan poco en medio precondicionado

Inicialmente se trabajó con tres fusiones transcripcionales de tres distintos operones fimbriales: *crf2* (Número de acceso: ROD_19341-19381), *crf4* (Número de acceso: ROD_34961-35021) y *pkkc2* (Número de acceso: ROD_22311-22341) (Fig. 19). El gen reportero que codifica para cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) se encuentra dentro del plásmido pKK232-8 en fusión transcripcional con las regiones reguladoras (predichas *in silico*) de los operones antes mencionados, de 501 pares de bases (pb) para el operón *crf2*, con 461 pb antes del codón de inicio de la traducción y 37 pb después; de 458 pb para el operón *pkkc2*, con 465 pb antes del codón de inicio de la traducción y 34 pb después; y 660 pb para el operón *crf4*, con 587 pb antes del codón de inicio de la traducción y 102 pb después.

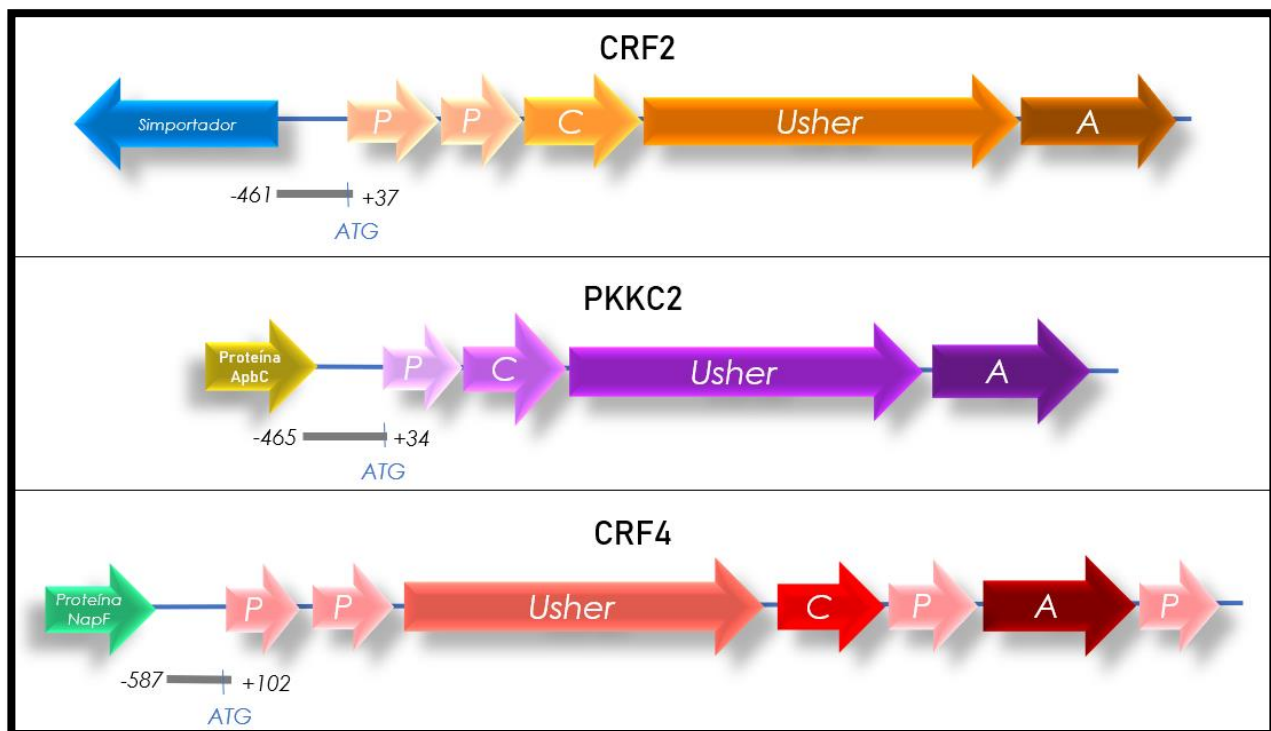


Figura 19. Composición y estructura de los operones fimbriales *crf2*, *pkkc2* y *crf4*. El operón *crf2* está compuesto por cinco genes, dos codificantes para pilinas o subunidades fimbriales (P), uno para chaperona (C), uno para usher y uno para adhesina (A). *pkkc2* está compuesto por cuatro genes, codificantes para pilina, chaperona, usher y adhesina. El operón *crf4*, siendo el más grande de los tres, consta de siete genes, cuatro de los cuales codifican para pilinas, uno para usher, chaperona y adhesina. Las regiones reguladoras usadas para las fusiones transcripcionales se señalan en gris en cada operón.

La proteína asociada a nucleóide, H-NS, participa en la regulación de la expresión de varios operones fimbriales de la familia C/U en EPEC, EHEC y *C. rodentium*, así como en otras bacterias patógenas y no patógenas (McLeod & Johnson, 2001). *C. rodentium* tiene, además, 4 parálogos de H-NS (CicR, PehH, StpA y Ler) los cuales también podrían estar regulando la expresión de algunos de sus operones fimbriales. Para evaluar si alguno de ellos participa en la regulación de los operones fimbriales *crf2*, *crf4* y *pkkc2* se transformó la cepa silvestre DBS100 y las mutantes Δhns , $\Delta cicR$, $\Delta pehH$, $\Delta stpA$, Δler con los vectores que portan las fusiones transcripcionales con las regiones reguladoras de los operones fimbriales de interés.

Las cepas transformadas se crecieron a 37°C en distintos medios de cultivo incluyendo DMEM precondicionado con células HeLa y enriquecido con medio LB y DMEM/LB con distintas concentraciones de medio LB (10, 30 y 50%), en agitación con aireación o estático con 5% de CO₂. Las muestras se procesaron para ensayos de actividad transcripcional CAT, de acuerdo con el protocolo establecido por Puente *et al.*, 1996. Bajo ninguna de las condiciones antes mencionadas se observó expresión transcripcional del operón *crf4*. Y sólo en medio precondicionado se registró actividad transcripcional de *crf2* y *pkkc2*, siendo muy baja (Tabla 5).

Tabla 5. Valores CAT de las cepas de *C. rodentium* DBS100 con las fusiones transcripcionales *crf2* y *pkkc2*

Medio precondicionado		Fusión transcripcional	
Condición	Cepa	<i>crf2</i> ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)	<i>pkkc2</i> ($\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína)
Agitación	DBS100	63.304	~0
	Δhns	18.095	~0
	$\Delta pehH$	~0	~0
	$\Delta cicR$	10.548	~0
	$\Delta stpA$	10.633	~0
	Δler	11.936	18.980
Estático con CO ₂	DBS100	~0	~0
	Δhns	~0	~0
	$\Delta pehH$	~0	16.998
	$\Delta cicR$	10.955	~0
	$\Delta stpA$	10.686	~0
	Δler	17.746	~0

*Los valores presentados son resultados de una sola repetición

En el grupo del Dr. Puente ya se habían llevado a cabo ensayos CAT para medir la actividad transcripcional de *crf2*, *crf4* y *pkkc2* en los medios de cultivo LB, DMEM y M.M-N con glucosa tanto a 37°C como a 26°C, por la M. en C. Stephanie Ortiz y el Dr. Gustavo Caballero. Sin embargo, no se observó actividad

transcripcional en ninguna de esas condiciones, por lo que se excluyeron de los experimentos realizados en este trabajo

7.2. El operón *crf2* alcanza su máxima expresión en medio mínimo con glicerol

La expresión observada en medio precondicionado sugería que probablemente alguna señal de las células o del suero fetal bovino podría estar favoreciendo la expresión de los operones fimbriales ya que el mismo medio de cultivo DMEM se había probado antes y no se observó expresión de los operones. Sin embargo, cuando se hicieron pruebas con medio DMEM (no precondicionado) más 10% de suero fetal bovino, tampoco se observó expresión de los operones fimbriales. Cabe mencionar que el medio precondicionado es lo que queda después de crecer las células eucariotas en él y por lo tanto muchos de los nutrientes que había en él se agotan. Pensando que el estrés por falta de nutrientes fuera la señal para que los operones fimbriales se expresaran se decidió probar el MM-N con glicerol en lugar de glucosa.

Entonces se probó la actividad transcripcional de las cepas antes mencionadas en M.M-N con glicerol en condiciones de agitación con aireación a 37°C. Con las muestras obtenidas se realizaron ensayos de actividad transcripcional CAT. Para el operón *crf4*, de nuevo no hubo registro de actividad transcripcional y para *pkkc2* la actividad volvió a ser baja (máximo 80 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína). Pero para el operón *crf2* se observó un aumento importante en la actividad transcripcional comparado con las cepas crecidas en los medios ricos antes mencionados, registrando un máximo de 250 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína (promedio de tres repeticiones). Y para estas últimas condiciones probadas, se agregaron al experimento las cepas Δcrp y ΔrpoS (Fig. 20), considerando que se obtuvieron que predicciones bioinformáticas de unión de estas proteínas a la región reguladora de *crf2* (Fig.21).

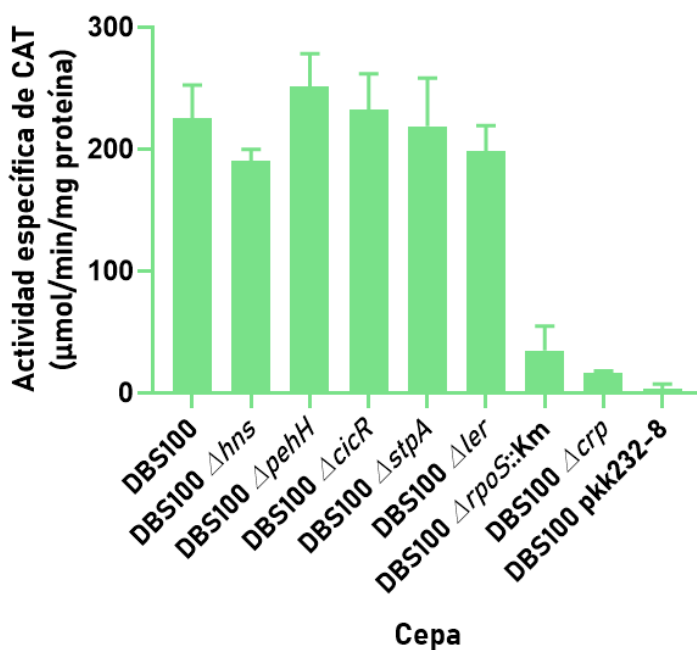


Figura 20. Actividad específica CAT de cepas de *C. rodentium* con fusión transcripcional del operón *crf2*, crecidas en M.M-N. Las cepas mutantes de *C. rodentium* Δhns , ΔstpA , Δler , ΔpehH , ΔcicR , Δcrp , ΔrpoS y la WT DBS100, así como el control silvestre DBS100 con el vector vacío pkk232-8, se cultivaron en medio mínimo con glicerol y se incubaron a 37°C con aireación y en agitación por 24 horas. Las muestras se procesaron y se realizaron ensayos de actividad CAT con ellas. La expresión transcripcional aumentó, en comparación con las muestras

crecidas en medios ricos, pero no se encontraron diferencias significativas entre la cepa WT y las mutantes Δhns , $\Delta stpA$, Δler , $\Delta pehH$ y $\Delta cicR$ ($p=0.8627$). En cambio, se encontró una atenuación en la expresión transcripcional en las cepas mutantes Δcrp ($25 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) ($p=0.0061$) y $\Delta rpoS$ ($17 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) ($p=0.004$) comparadas con la WT ($250 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$). Los resultados representan el promedio y desviación estándar de tres experimentos diferentes realizados por duplicado.

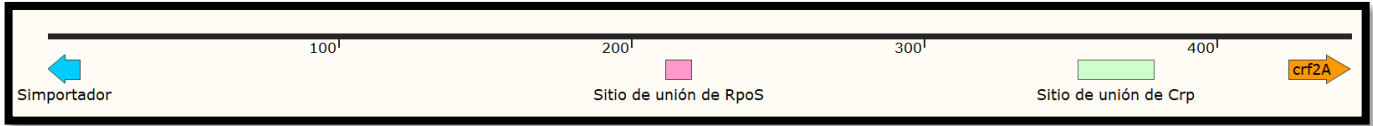


Figura 21. Sitios predichos de unión de Rpos y Crp. Por medio de predicciones bioinformáticas se encontraron posibles sitios de unión de los reguladores Rpos y Crp a la región reguladora del operón *crf2*

Con el fin de determinar el tiempo óptimo para la expresión de *crf2* en MM-N con glicerol se realizó una cinética de crecimiento y de actividad transcripcional CAT en la cepa silvestre *C. rodentium* DBS100 transformada con la fusión pKK-CRF2-2 (Fig. 22).

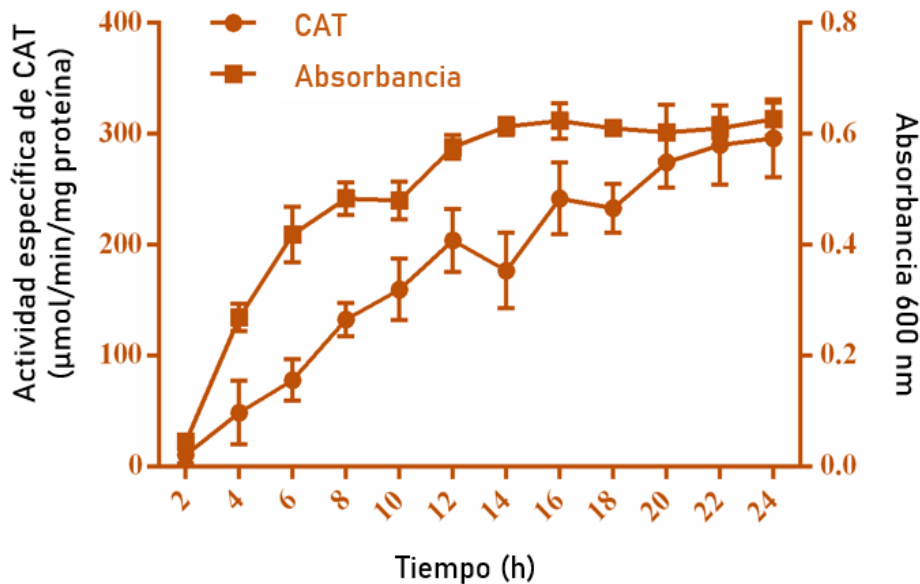


Figura 22. Cinética de crecimiento y de expresión de CAT del operón *crf2* en la cepa WT de *C. rodentium* en M.M.-N. Se fue registrando la actividad específica CAT de la fusión transcripcional al operón *crf2* (●) y la densidad óptica, O.D. (■) a lo largo de 24 horas de crecimiento. Actividad específica de CAT a la izquierda, absorbancia a 600 nm a la derecha. Se identificó la mayor actividad CAT durante la fase estacionaria del crecimiento bacteriano, entre 18 y las 24 h, sin diferencias significativas entre ellos ($p=0.6595$). Además, se reconoce que la actividad transcripcional en este operón aumenta proporcionalmente con el tiempo de cultivo y por ende con el crecimiento bacteriano. Los resultados representan el promedio y desviación estándar de tres experimentos diferentes realizados por duplicado.

7.3. El operón *crf2* se expresa diferencialmente dependiendo del pH, la fuente de carbono y la temperatura

Para intentar encontrar las condiciones de mayor expresión transcripcional del operón *crf2* se procedió a cambiar las condiciones de crecimiento de *C. rodentium* en M.M.-N, variando fuente de carbono (glucosa, glicerol, manosa y arabinosa) (Fig. 23), temperatura de incubación (25, 30, 37 y 42°C) en agitación o estático (Fig. 24) y pH (6, 6.5, 7, 7.5, 8 y 8.5) (Fig. 25). El tiempo de incubación de todos los experimentos fue de 24 horas.

Con respecto a la fuente carbono presente en el M.M.-N., no se encontró diferencia significativa en la expresión ($p=0.1478$) de la fusión transcripcional del operón *crf2* en M.M.-N. con glicerol, manosa o arabinosa al 0.5%. Sin embargo, en M.M.-N con glucosa si se observó una disminución significativa ($p=0.0093$) en la expresión transcripcional del operón *crf2* (67 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína), comparada con las otras fuentes de carbono (Fig. 23).

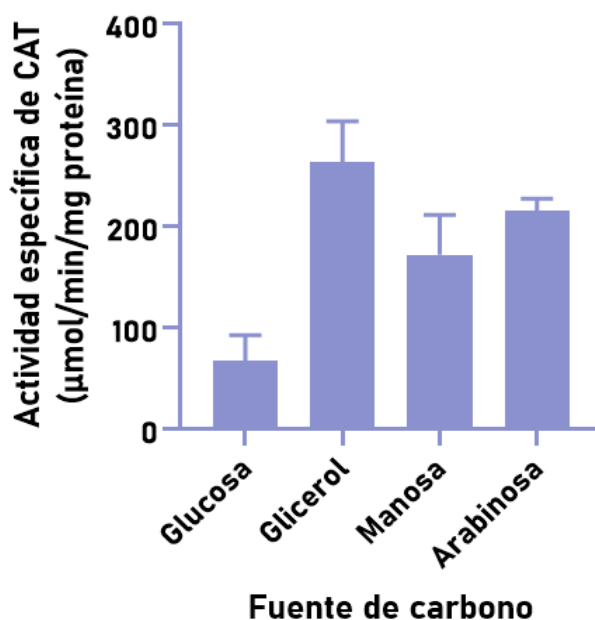


Figura 23. Actividad específica CAT de *C. rodentium* con fusión transcripcional del operón *crf2*, en M.M.-N. con distintas fuentes de carbono. La cepa silvestre de *C. rodentium* que porta la fusión transcripcional del operón *crf2* se creció en M.M.-N con glucosa, glicerol, manosa o arabinosa al 0.5% por 24 h. Los resultados representan el promedio y desviación estándar de tres experimentos diferentes realizados por duplicado.

Además, no se encontraron diferencias significativas ($p=0.091$) en la expresión de la fusión transcripcional del operón *crf2* en las condiciones de agitación (aeración) probadas (30 y 37°C), pero esta expresión (~260 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) fue

significativamente mayor que en condiciones estáticas (~75 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína) ($p=0.0125$). Encontrando que tampoco había diferencias significativas en la expresión transcripcional de *crf2* entre las distintas temperaturas estáticas (25, 30, 37 y 42°C) ($p=0.2069$) (Fig. 24).

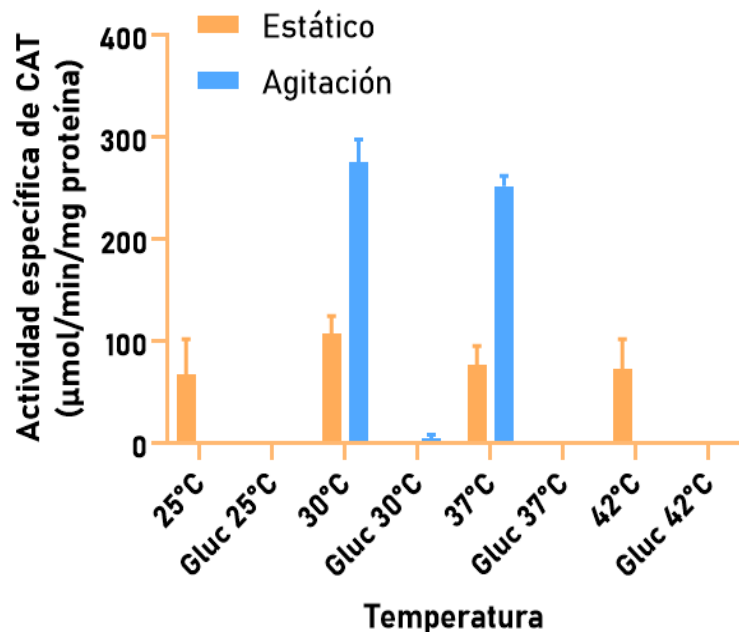


Figura 24. Actividad específica CAT de *C. rodentium* con fusión transcripcional del operón *crf2*, en distintas temperaturas en M.M.-N. Se incubó en M.M.-N con glicerol a la cepa silvestre de *C. rodentium* que porta la fusión transcripcional del operón *crf2* a 25, 30, 37 y 42°C en condiciones estáticas por 40 horas (a excepción de la incubada a 37°C que se creció por 30 horas). Adicionalmente se incubó en agitación a 30 y 37°C por 24 horas. Y en cada experimento se agregó un control de M.M. con glucosa (Gluc). Los resultados representan el promedio y desviación estándar de tres experimentos diferentes realizados por duplicado.

Por otro lado, se encontró que entre los valores de pH 6 a 7.5 y 8.5 no hay diferencias significativas en la expresión transcripcional del operón ($p=0.0971$), pero en la cepa cultivada en medio con pH 8 la expresión transcripcional de *crf2* incrementó significativamente ($p=0.013$), llegando a 402 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína (Fig. 25).

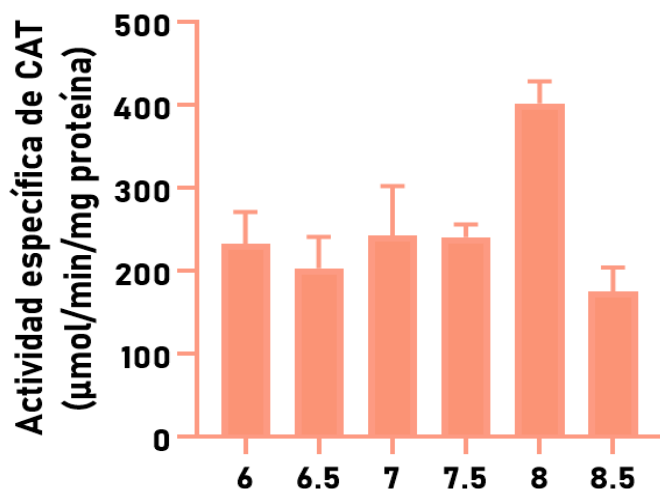


Figura 25. Actividad específica CAT de *C. rodentium* con fusión transcripcional del operón *crf2*, en M.M.-N. con distintos valores de pH. La cepa silvestre de *C. rodentium* que porta la fusión transcripcional del operón *crf2* se creció por 24 horas en M.M.-N con glicerol variando su valor de pH entre 6, 6.5, 7, 7.5, 8 y 8.5. Los resultados representan el promedio y desviación estándar de tres experimentos diferentes realizados por duplicado.

7.4. La proteína sensible a leucina, Lrp, se une con especificidad a la región reguladora del operón *crf2*

Adicionalmente se hicieron ensayos de cambio en la corrida electroforética (EMSA, por sus siglas en inglés), los cuales son útiles para probar la interacción y afinidad de alguna proteína con fragmentos de DNA. Estos ensayos se hicieron con fragmentos de la región reguladora de distintos tamaños: 237, 501 y 733 pb (denominados *crf2-1*, *crf2-2* y *crf2-3*, en orden creciente), considerando los sitios de unión predichos *in silico* para la proteína Lrp (Fig. 26).

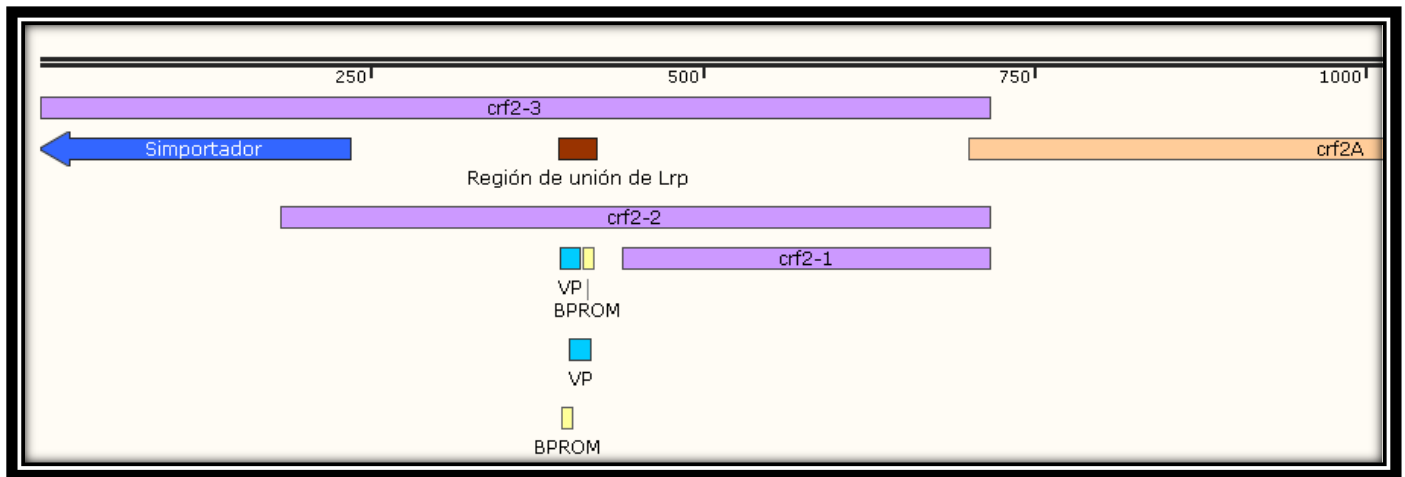


Figura 26. Sitios de unión de Lrp predichos *in silico* a la región reguladora de *crf2*. Se muestran los fragmentos de DNA de distintos tamaños de la región reguladora del operón *crf2* (marcados en lila) usados para los EMSAs. Su tamaño se eligió considerando los sitios de unión de Lrp predichos *in silico* con los programas BPR0M (predijo dos sitios de unión marcados en amarillo) y Virtual Footprint (VP, predijo dos sitios de unión marcados en azul), los cuales forman una región putativa de unión de Lrp (marcada en café).

Los EMSAs se realizaron con la proteína purificada Lrp, de ella se usaron concentraciones crecientes para determinar la concentración específica en la cual esta secuestra por completo el DNA disponible. Y se usaron los fragmentos *crf2-1*, *crf2-2* y *crf2-3*, antes mencionados, para intentar delimitar la región de unión de la proteína dentro esa región reguladora. Además, se hicieron ensayos con adición de aminoácidos (15 mM), leucina y glicina (como control), para determinar si la leucina afecta la interacción de la proteína con el DNA (Fig. 27).

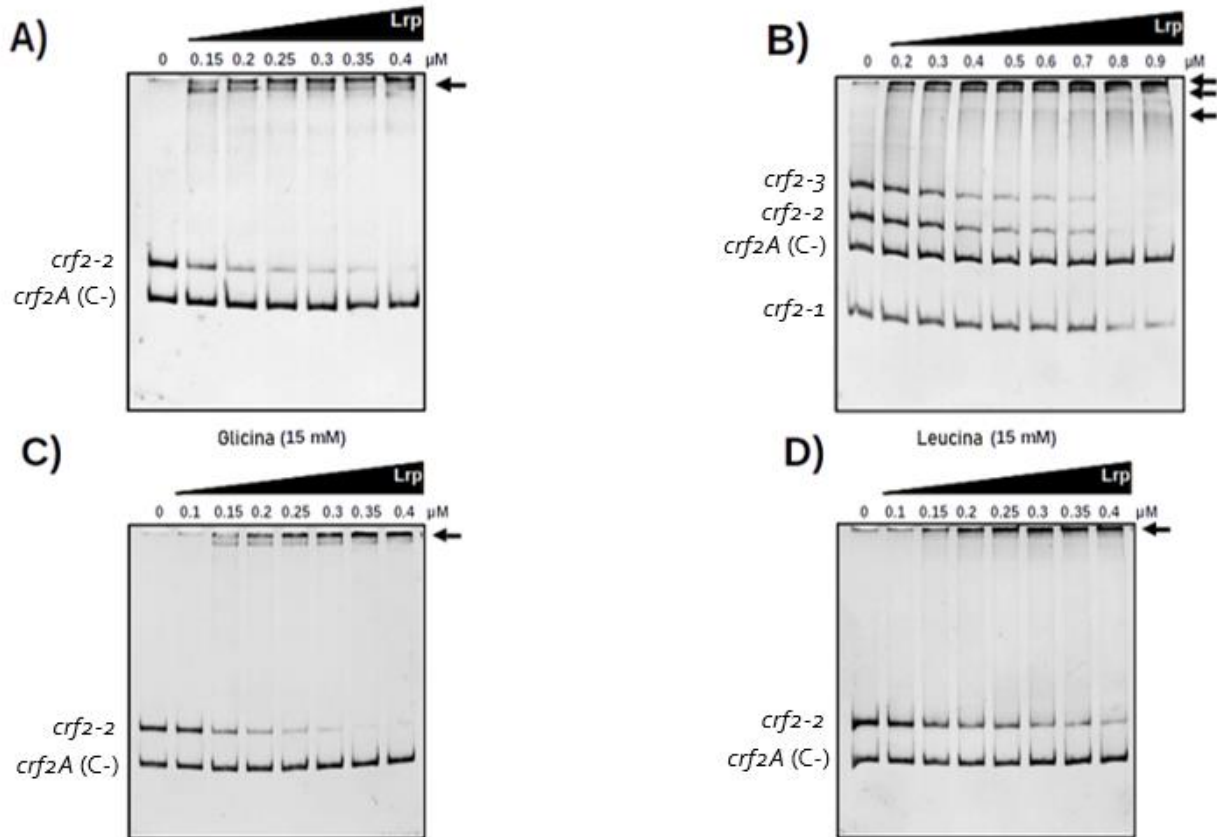


Figura 27. Lrp se une a la región reguladora del operón *crf2*. Se muestran geles de poliacrilamida nativos al 6% con tinción de bromuro de etidio para el DNA libre y los complejos de DNA-proteína (estos últimos indicados con flechas en la parte superior de los geles). A) EMSA con Lrp en concentraciones de 0.15-0.4 μM (aumentando en intervalos de 0.05 μM) y la región reguladora de 535 pb de *crf2* (fragmento *crf2-2*), contenida en la fusión transcripcional usada en los experimentos CAT antes mencionados. La proteína muestra alta afinidad por el fragmento de DNA pues es necesario solo 0.4 μM de ella para secuestrarlo por completo. B) EMSA con Lrp en concentraciones de 0.2-0.9 μM (aumentando en intervalos de 0.1 μM) y fragmentos de DNA de distintos tamaños 237, 501 y 733 pb que abarcan la región reguladora de *crf2*. Se observa muy baja afinidad por el fragmento más corto (*crf2-1*), llegando hasta una concentración de 0.9 μM de proteína sin observar muchos cambios el secuestro del DNA por la proteína. Y alta afinidad por las regiones largas *crf2-2* y *crf2-3* (prácticamente sin diferencias entre ellas) necesitando 0.8 μM de proteína para secuestrarlos casi por completo. C y D) EMSA con Lrp en concentraciones de 0.15-0.4 μM (aumentando en intervalos de 0.05 μM) y la región *crf2-2* en presencia de glicina o leucina (15mM), respectivamente. En el EMSA adicionado con glicina (C) se observa un comportamiento de afinidad e interacción de la proteína con el fragmento de DNA muy similar a aquel sin adición de aminoácidos (A), siendo secuestrado por completo a 0.4 μM . Mientras que en presencia de leucina (D) se observa una disminución muy clara de afinidad e interacción entre la proteína y el DNA, siendo insuficiente 0.4 μM de proteína para secuestrar por completo el DNA presente. Como control negativo de todos los ensayos se usó una secuencia codificante de DNA perteneciente al operón (gen *crf2*).

8. Discusión

Las bacterias encuentran constantemente cambios en su ambiente, los cuales, en muchas situaciones, pueden ser letales a menos que estas respondan adecuadamente a ellos (Suh *et al.*, 1999). Especialmente, las bacterias patógenas necesitan tener la capacidad de adaptarse rápidamente a ambientes en constante cambio para ser exitosos, porque a lo largo de la transmisión e infección al huésped, experimentan muchos tipos de estrés (Dong & Schellhorn, 2010).

Uno de los factores que ayudan a las bacterias a responder adecuadamente al entorno son las fimbrias, las cuales les permiten adherirse a superficies tanto bióticas como abióticas y algunas de ellas tienen adhesinas en sus puntas que le confieren tropismo tisular (Wurpel *et al.*, 2013). Estos apéndices proteicos también son reconocidos como factores importantes de virulencia y patogenicidad en bacterias que infectan el tracto gastrointestinal, urinario y respiratorio (Waksman & Hultgren, 2009). EPEC, por ejemplo, expresa un pili tipo IV, llamado pili formador de mechones (BFP, por sus siglas en inglés), que ayuda al inicio de la adherencia al intestino delgado y posteriormente, su sistema de secreción tipo III (T3SS) media una adherencia íntima a los enterocitos (Kallonen & Boinett, 2016).

No todos los factores de virulencia confieren ventajas selectivas al microorganismo en la misma etapa de infección o en el mismo sitio. Su síntesis debe darse en la locación adecuada para una infección exitosa, por lo que su expresión tiene que ser modulada en respuesta a señales ambientales, como temperatura, pH, osmolaridad, disponibilidad de nutrientes o la presencia de sustancias tóxicas, encontradas en el ciclo infeccioso y durante la transición del medio externo al huésped. A través del uso de un gran conjunto de fimbrias, distintos patógenos son capaces de unirse al sitio adecuado en el momento adecuado durante su paso a través del tracto gastrointestinal. La síntesis de esos apéndices está bajo controles regulatorios complejos y, como otros factores de virulencia, es mediada por una combinación de señales fisicoquímicas variables, que afectan sus niveles transcripcionales (Edwards & Puente, 1998; Harel & Martin, 1999).

C. rodentium es, al igual que EHEC y EPEC, un patógeno A/E que provoca lesiones características en su huésped, el ratón. Es por esta razón que se ha catalogado como un modelo válido y adecuado para estudiar la patogenicidad de bacterias que infectan el tracto gastrointestinal humano (Bouladoux *et al.*, 2017). Este patógeno murino presenta un repertorio de 19 operones fimbriales (Petty *et al.*, 2010), de los cuales muy pocos han sido estudiados a fondo o se han ligado a funciones importantes para la patogenicidad de la bacteria. En este estudio se investigó la regulación génica de tres de esos operones fimbriales: ROD_193441-19381, ROD_22311-22341 y ROD_34961-35021, los cuales se denominaron *crf2*, *pkkc2* y *crf4*, respectivamente.

Los resultados obtenidos para los operones *pkkc2* y *crf4* de *C. rodentium* indican que el primero se expresa poco y el segundo no se expresa, bajo las condiciones

probadas. Esto sugiere que bajo las condiciones de crecimiento examinadas los operones fimbriales están reprimidos y/o que las señales necesarias para activar la expresión no estaban presentes. Por ejemplo, en EPEC, la fimbria BFP se induce a 37°C y la presencia de calcio y amonio reprimen su expresión (Puente *et al.*, 1996). En EHEC, el pili común de *E. coli* (ECP), se expresa a temperaturas entre 30 y 37°C, en presencia de CO₂ y por señales de las células epiteliales (Rendón *et al.*, 2007). Estudios transcripcionales *in vivo* ayudarán a responder si la expresión de estos operones requiere una señal o señales específicas del hospedero.

Por otro lado, los niveles bajos de expresión de *crf2* observados en el medio precondicionado sugerían que alguna señal de las células o del suero fetal bovino podría estar favoreciendo la expresión de los operones fimbriales ya que el mismo medio de cultivo (DMEM), pero no precondicionado, se había probado antes y no se observó expresión de los operones. Sin embargo, cuando se examinó el medio DMEM adicionado con 10% de suero fetal bovino, se registró de nuevo nula o poca expresión de los operones fimbriales, similar a los resultados de los primeros experimentos (Tabla 5).

El medio precondicionado es el filtrado que queda después de crecer células eucariontes en medio DMEM y por lo tanto muchos de los nutrientes que tiene inicialmente, se agotan. Pensando que el estrés por falta de nutrientes fuera la señal para que los operones fimbriales se expresaran se decidió evaluar la expresión transcripcional en MM-N con glicerol en lugar de glucosa.

Al probar la expresión del operón *crf2* en medio mínimo con 0.5% de glicerol como fuente de carbono se comenzó a observar expresión transcripcional alta, pero sin diferencias significativas ($p > 0.05$) en la expresión de las cepas Δhns , $\Delta stpA$, Δler , $\Delta pehH$, $\Delta cicR$ y la silvestre DBS100 (Fig. 20). Estos resultados permiten afirmar que los reguladores transcripcionales H-NS, StpA, Ler, CicR y PehH, no están involucrados en la expresión transcripcional del operón *crf2* bajo las condiciones probadas.

Adicionalmente, se evaluó la expresión de *crf2* en las mutantes $\Delta rpoS$ y Δcrp , debido que los resultados de análisis *in silico* sugirieron una posible unión de RpoS y Crp a la región reguladora del operón. En ambos casos se observa la disminución significativa ($p < 0.05$) de su expresión con respecto a la cepa silvestre. La disminución tan importante en la expresión transcripcional de *crf2* en estas cepas mutantes permite afirmar que los reguladores RpoS y Crp funcionan como activadores del operón y por ende son necesarios para la expresión de este.

Además, la cinética realizada con la cepa silvestre DBS100 que porta la fusión transcripcional del operón *crf2* (Fig. 22) permitió reconocer el punto de mayor expresión del operón, así como la etapa en la curva de crecimiento en la que este punto es alcanzado. De esta forma se logra afirmar que el operón *crf2* alcanza su

mayor expresión en M.M.-N con glicerol y durante la fase estacionaria tardía del crecimiento, lo cual sucede entre las horas 18 y 24 de incubación (Sin diferencias significativas entre estos tiempos, $p > 0.05$).

Hay reguladores globales que están involucrados en la regulación de la expresión de genes de virulencia. En bacterias patógenas, reguladores como H-NS, Crp, RpoS y Lrp tienen el papel de descifrar señales complejas que modulan la síntesis de factores de virulencia. Algunos de ellos, como Crp, reconocen secuencias específicas de nucleótidos, a las cuales se unen y sus efectos son localizados a los sitios de unión. Mientras que proteínas como Lrp tienen una mayor influencia sobre la transcripción, contribuyendo a la organización del DNA dentro de la célula (Harel & Martin, 1999).

Dos de los reguladores globales antes mencionados, en *E. coli* y otras bacterias patógenas incluyendo *C. rodentium*, controlan el sistema de respuesta a estrés y la capacidad de búsqueda de nutrientes, estos son RpoS y Crp (Franchini *et al.*, 2015). RpoS es un factor sigma de la RNA polimerasa, que controla a un conjunto de genes (regulón) involucrados en la respuesta general al estrés, particularmente a inanición y durante la transición a fase estacionaria (Dong & Schellhorn, 2010). Por otro lado, Crp es una proteína que regula genes involucrados en represión catabólica por carbono y búsqueda de nutrientes. La formación de un complejo de Crp con la molécula de señalización cAMP, la cual se produce en condiciones de limitación de glucosa, permite su unión a secuencias específicas de DNA y la activación de la transcripción de genes catabólicos (Görke & Stülke, 2008).

Los resultados obtenidos con respecto a la regulación de la expresión transcripcional del operón *crf2* coinciden con la información antes mencionada pues el medio en el que mejor se expresó la fimbria fue en aquel que no contenía glucosa (M.M.-N con glicerol) (señal conducida por Crp) y durante la fase de crecimiento estacionaria de la bacteria (señal conducida por RpoS), lo cual avala que la regulación de *crf2* depende de manera positiva de estos dos reguladores.

Una vez que se encontró el medio adecuado para la expresión de *crf2* se hicieron cambios en las condiciones de los cultivos para intentar encontrar aquellas de máxima expresión para el operón. Al cambiar la fuente de carbono en el M.M.-N se observó la menor expresión transcripcional de *crf2* en glucosa y la mayor en glicerol, manosa y arabinosa, sin diferencias significativas entre ellas ($p > 0.05$) (Fig. 23). Estos resultados permiten confirmar que la ausencia de glucosa es la señal que activa la transcripción del operón (represión catabólica) y, a su vez, avala que Crp está involucrada en la activación de la expresión transcripcional del operón.

Por otro lado, los resultados obtenidos para el cambio en la temperatura de incubación nos indican que no existen diferencias significativas entre las temperaturas probadas ($p > 0.05$), comparando, por un lado, 25, 30, 37 y 42°C en condiciones estáticas y, por otro lado, 30 y 37°C en agitación. Pero sí existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los cultivos realizados en condiciones

estáticas y en agitación, alcanzando su máxima expresión en agitación y disminuyendo considerablemente en condiciones estáticas (Fig. 24).

Lo anterior parece indicar que la temperatura no es una de las señales que regulan la actividad del operón *crf2*, pero habría que analizar también la actividad del operón en agitación a distintas temperaturas para confirmarlo. Por otro lado, la diferencia de expresión que existe entre las condiciones de agitación y estáticas puede deberse a que en agitación (aireación) el crecimiento celular es mucho más eficiente (los cultivos estáticos deben ser incubados por tiempos mayores que los que se encuentran en agitación), lo cual permite que al momento de la recolección de la muestra haya más células en fase de crecimiento estacionario, que es donde se expresa mejor el operón.

Finalmente, cambios en el pH del medio de cultivo permitieron observar diferencias en la expresión del operón: *crf2* logra una mejor expresión en M.M.-N con glicerol a pH 8, que en ese medio a pH 6-7.5 y 8.5 ($p < 0.05$). Entre estos últimos valores de pH no existen diferencias significativas en la expresión ($p > 0.05$). Esto permite afirmar que la alcalinidad del medio es un factor de regulación del operón, particularmente, un pH de 8 señala una mayor expresión del operón en las condiciones probadas.

La regulación de la patogenicidad es compleja, ya que existen interconexiones entre sistemas regulatorios. Se sabe que parámetros como la temperatura, osmolaridad, pH, aminoácidos, fuente de nitrógeno y de carbono, concentración de CO₂, iones, amonio o bicarbonato de sodio, afectan la regulación de genes de virulencia (Edwards & Puente, 1998). La combinación e interpretación de esas señales ambientales, conducidas por receptores ampliamente distribuidos, le confieren a las bacterias patógenas la habilidad de reconocer su locación precisa dentro de un organismo, lo que lleva a la expresión de factores de virulencia, particularmente factores de adherencia específicos (Edwards & Puente, 1998).

En especial, el pH y la fuente de carbono proveen señales significativas para las bacterias entéricas, porque dentro del tracto gastrointestinal existen gradientes de nutrientes y variaciones en el pH dependiendo del órgano y de la ubicación dentro de él. El pH es ácido en el estómago, y se hace más habitable en el lumen intestinal, variando entre 6.5 y 7.5. Mientras que la concentración de glucosa es muy alta en el duodeno y va disminuyendo casi a cero en la parte distal del intestino delgado. Muchos operones fimbriales bacterianos son regulados en respuesta a glucosa. Por ejemplo, la expresión de las fimbrias de ETEC 987P y K99, que median la adhesión a la parte distal del intestino delgado es estimulada con el crecimiento en medio con fuentes de carbono pobres, como aquellas que inducen a la proteína represora de catabolismo Crp (Edwards & Puente, 1998; Harel & Martin, 1999).

En el caso de los resultados antes discutidos, se hace evidente que la fuente de carbono (particularmente la ausencia/presencia de glucosa en el medio), la fase

de crecimiento, el pH, y la aireación/agitación, son importantes para la expresión del operón *crf2*. Es factible que la ubicación en la que se expresa esta fimbria dentro del huésped sea en el intestino delgado, particularmente en la región distal, donde la disponibilidad de nutrientes es muy baja y el pH es alcalino (Edwards & Puente, 1998), pero el pH dentro del intestino delgado nunca rebasa niveles de 7.5. Por otro lado, en órganos como el páncreas, hígado, vesícula biliar y riñones, el pH si puede alcanzar niveles alcalinos muy altos, desde 7.5 hasta 8.8, debido a su acción neutralizadora de ácidos y los nutrientes en ellos son escasos (Kaufman *et al.*, 2016). Además, se ha localizado a *C. rodentium* en estos órganos en roedores (de la Puente-Redondo *et al.*, 1999; Spahn *et al.*, 2004; Mundy *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2010).

Todo lo anterior permite hipotetizar que si *crf2* codifica a una fimbria funcional, podría estar ayudando a *C. rodentium* a establecerse en alguno de los órganos antes mencionados para usarlo como reservorio, y entonces, la importancia de *crf2* en la colonización al huésped (Saldaña *et al.*, en proceso) puede deberse a que el órgano en el que se exprese *crf2* funge como un sitio de adaptación al ambiente intestinal, donde se activan genes requeridos para la colonización eficiente del huésped, pudiendo actuar como un sitio de liberación de bacterias al intestino. Es importante recalcar que la colonización del huésped es un trabajo sinérgico de muchos factores (Wiles *et al.*, 2004) y Crf2 no sería el único responsable de la unión a órganos que actúan como reservorio.

Por otro lado, debido a los resultados arrojados por el análisis bioinformático con respecto a la unión de Lrp a la región reguladora de *crf2* (Fig. 26), se realizaron ensayos de movilidad electroforética (EMSAs, por sus siglas en inglés) (Fig. 27) con el objetivo de confirmar o refutar si la proteína se une con afinidad, y si es el caso, delimitar la región de unión. Los ensayos se realizaron con tres fragmentos de distintos tamaños de la región reguladora de *crf2* y la proteína Lrp.

Estos ensayos permitieron confirmar que Lrp se une con afinidad a la región reguladora de *crf2*, tanto a la usada en la fusión transcripcional de los ensayos de CAT antes descritos (*crf2*-2) (Fig. 27, A), como a la región grande de 743 pb (*crf2*-3), comprobado en un EMSA competitivo con los tres fragmentos (Fig. 27, B). En este se observa que se requiere una concentración de Lrp mayor (0.8 μ M) que en el ensayo sin competencia (Fig. 27, A) para secuestrar por completo al fragmento 2. Lo anterior se explica porque al haber otro fragmento por el que la proteína es afín (*crf2*-3), disminuye su concentración disponible para secuestrar ambos fragmentos, lo cual ocasiona que haya más DNA libre y que se requiera más proteína para secuestrarlos por completo. Además, se confirmó que Lrp presenta afinidad muy baja por *crf2*-1, parecida al control *crf2A* (región codificante de *crf2*), lo cual podría significar que este fragmento no contiene los sitios de unión, como fue predicho *in silico*.

La proteína sensible a leucina o Lrp es otro regulador global que afecta la transcripción de un gran número de operones, y se ha sugerido que su papel fisiológico es monitorear el estado nutricional y ajustar el metabolismo dependiendo de las condiciones ambientales, cooperando en otras redes regulatorias como la de RpoS para adaptarse y coordinar esos cambios (Landgraf et al., 1996; Cho *et al.*, 2008). Esto coincide con las condiciones de expresión de *crf2*, pues sucede en estados nutricionales pobres y en fase estacionaria de crecimiento, lo cual hace muy factible la idea de que Lrp sea también un regulador de la transcripción del operón (Newman & Lin, 1995). Es particularmente importante considerar que Lrp está involucrada en todos los mecanismos conocidos de expresión fimbrial (Harel & Martin, 1999) y que su acción reguladora es modulada usualmente por la presencia de leucina, la cual se sabe que puede afectar esa regulación de todas las formas posibles (Fig. 12).

Los EMSAs también permitieron confirmar una relación entre la presencia de leucina exógena y cambios en la unión de Lrp a sus sitios blanco, pues el fragmento *crf2-2* sin adición de aminoácidos o con adición de glicina (la cual no está relacionada con la modulación de Lrp) (Fig. 27, A y C), necesita 0.4 μ M para ser secuestrado por completo, mientras que en presencia de leucina (Fig. 27, D) esa misma concentración de proteína no es suficiente para secuestrarlo totalmente.

Lo anterior nos permite afirmar que, bajo las condiciones probadas, la leucina sí afecta la unión de Lrp a la región reguladora de *crf2* y ese efecto es específico para leucina, pues no se observa reacción en presencia de glicina. Así, la leucina se une a Lrp e impide que esta se una a su vez a sus sitios blanco dentro de la región reguladora de *crf2*. Entonces, se puede afirmar que, en el caso del operón *crf2*, la leucina revierte o disminuye la actividad reguladora de Lrp, actuando de un modo recíproco. Pero, aunque se sabe que la leucina disminuye la unión de Lrp a la región reguladora de *crf2*, es necesario averiguar el efecto que tiene la proteína en esa expresión, es decir, si es activador o represor (Fig. 12, 3 y 6), lo cual se podrá responder al probar la expresión de *crf2* en una mutante Δ *lrp* que porte la fusión transcripcional de ese operón.

Todo lo antes discutido nos permite reconocer que la regulación de *crf2* sucede por medio de mecanismos complejos y en respuesta a distintas señales provenientes de las condiciones ambientales. También siendo importante considerar que reguladores globales Lrp, Crp y RpoS pueden intervenir entre ellos, contribuir y convergir en redes de regulación transcripcional intrincadas. Por ejemplo, se sabe que proteínas como Lrp, que cambian la estructura del DNA, pueden ayudar a RpoS a reconocer a sus promotores de manera más específica (Hengge-Aronis, 2002). De igual forma, es conocido que muchos genes regulados por RpoS también son regulados por Crp (Franchini *et al.*, 2015). Además, se ha comprobado que la expresión de Lrp en *E. coli*, que controla a su vez la expresión de fimbrias tipo 1, está bajo el control del complejo Crp-cAMP (Müller *et al.*, 2009). Debido a esto, es asequible la idea de que estas tres proteínas, en conjunto, orquestan cascadas regulatorias, en respuesta a las condiciones ambientales, que controlan la expresión transcripcional de *crf2*

9. Conclusiones

Se analizó la expresión transcripcional de operones pertenecientes a la familia C/U en *C. rodentium* bajo distintas condiciones de crecimiento, algunas de las cuales permitieron la inducción de la transcripción de *crf2*. Además, se determinó que, bajo las condiciones analizadas, los reguladores H-NS, PehH, CicR, StpA y Ler no juegan un papel en la regulación de *crf2*, pero Crp, RpoS y probablemente también Lrp, sí juegan papeles importantes en su regulación.

Entonces, podemos afirmar que el operón *crf2* de *C. rodentium* es un factor de virulencia importante y es necesario para su adherencia a células y la colonización del huésped. Es regulado positivamente por los reguladores transcripcionales Crp y RpoS. Y la proteína Lrp presenta alta afinidad a su región reguladora. La fimbria se expresa mejor en ausencia de glucosa en el medio, en fase estacionaria de crecimiento, en agitación y con pH 8.

Por medio de los datos obtenidos en este estudio se lograron encontrar condiciones de crecimiento *in vitro* y factores que regulan la expresión del operón *crf2*, un operón perteneciente a la familia C/U, lo cual confirma la hipótesis principal del presente.

La información presentada en este trabajo es muy importante para continuar con el estudio del proceso de infección de los patógenos A/E, lo cual permite a su vez obtener herramientas para el control de la patogénesis que estos provocan, sobre todo en los humanos.

10. Perspectivas

- A) Realizar ensayos de actividad transcripcional *in vivo* para identificar el sitio de expresión específico de *crf2*
- B) Realizar pruebas con mutantes Δlrp para identificar su papel sobre la regulación de *crf2*
 - C) Delimitar la región mínima promotora de *crf2*
 - D) Determinar si *crf2* codifica para una fimbria funcional
- F) Probar en las mutantes Δlrp , Δcrp y $\Delta rpoS$ la expresión de los operones putativos *crf4* y *pkkc2*
- G) Probar la expresión transcripcional de los operones putativos *crf4* y *pkkc2* *in vivo*
 - H) Realizar EMSAs con las proteínas Crp, RpoS y Lrp, con las regiones reguladoras de las mismas para explorar la posibilidad de regulación entre ellas

11. Referencias

- Baek, C. H., Kang, H. Y., Roland, K. L., & Curtiss III, R. (2011). Lrp acts as both a positive and negative regulator for type 1 fimbriae production in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *PLoS one*, 6(10).
- Bhatt, S., Romeo, T., & Kalman, D. (2011). Honing the message: post-transcriptional and post-translational control in attaching and effacing pathogens. *Trends in microbiology*, 19(5), 217-224.
- Borenshtein, D., McBee, M. E., & Schauer, D. B. (2008). Utility of the *Citrobacter rodentium* infection model in laboratory mice. *Current opinion in gastroenterology*, 24(1), 32-37.
- Bouladoux, N., Harrison, O. J., & Belkaid, Y. (2017). The mouse model of infection with *Citrobacter rodentium*. *Current protocols in immunology*, 119(1), 19-15.
- Brückner, R., & Titgemeyer, F. (2002). Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. *FEMS microbiology letters*, 209(2), 141-148.
- Busch, A., & Waksman, G. (2012). Chaperone–usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 367(1592), 1112-1122.
- Caballero-Flores, G. G., Croxen, M. A., Martínez-Santos, V. I., Finlay, B. B., & Puente, J. L. (2015). Identification and regulation of a novel *Citrobacter rodentium* gut colonization fimbria (Gcf). *Journal of bacteriology*, 197(8), 1478-1491.
- Chen, S., Hao, Z., Bieniek, E., & Calvo, J. M. (2001). Modulation of Lrp action in *Escherichia coli* by leucine: effects on non-specific binding of Lrp to DNA. *Journal of molecular biology*, 314(5), 1067-1075.
- Cho, B. K., Barrett, C. L., Knight, E. M., Park, Y. S., & Palsson, B. Ø. (2008). Genome-scale reconstruction of the Lrp regulatory network in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(49), 19462-19467.

Cox, C. D., Bavi, N., & Martinac, B. (2018). Bacterial mechanosensors. *Annual review of physiology*, 80, 71-93.

De la Puente-Redondo, V. A., Gutierrez-Martin, C. B., Pérez-Martínez, C. C., del Blanco, N. G., García-Iglesias, M. J., Pérez-García, C. C., & Rodríguez-Ferri, E. F. (1999). Epidemic infection caused by *Citrobacter rodentium* in a gerbil colony. *Veterinary record*, 145(14), 400-403.

Deutscher, J. (2008). The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Current opinion in microbiology*, 11(2), 87-93.

Dong, T., Coombes, B. K., & Schellhorn, H. E. (2009). Role of RpoS in the virulence of *Citrobacter rodentium*. *Infection and immunity*, 77(1), 501-507.

Dufrêne, Y. F., & Persat, A. (2020). Mechanomicrobiology: how bacteria sense and respond to forces. *Nature Reviews Microbiology*, 1-14.

Dufresne, K., Saulnier-Bellemare, J., & Daigle, F. (2018). Functional analysis of the chaperone-usher fimbrial gene clusters of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 8, 26.

Edwards, R. A., & Puente, J. L. (1998). Fimbrial expression in enteric bacteria: a critical step in intestinal pathogenesis. *Trends in microbiology*, 6(7), 282-287.

Franchini, A. G., Ihssen, J., & Egli, T. (2015). Effect of global regulators RpoS and cyclic-AMP/CRP on the catabolome and transcriptome of *Escherichia coli* K12 during carbon-and energy-limited growth. *PLoS One*, 10(7).

Gaytán, M. O., Martínez-Santos, V. I., Soto, E., & González-Pedrajo, B. (2016). Type three secretion system in attaching and effacing pathogens. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6, 129.

Görke, B., & Stülke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*, 6(8), 613-624.

- Gosset, G., Zhang, Z., Nayyar, S., Cuevas, W. A., & Saier, M. H. (2004). Transcriptome analysis of Crp-dependent catabolite control of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 186(11), 3516-3524.
- Grant, S. G., Jessee, J., Bloom, F. R., & Hanahan, D. (1990). Differential plasmid rescue from transgenic mouse DNAs into *Escherichia coli* methylation-restriction mutants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(12), 4645-4649.
- Harel, J., & Martin, C. (1999). Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Research, BioMed Central*, 30 (2-3), pp.131-155.
- Hart, E., Yang, J., Tauschek, M., Kelly, M., Wakefield, M. J., Frankel, G. & Robins-Browne, R. M. (2008). RegA, an AraC-like protein, is a global transcriptional regulator that controls virulence gene expression in *Citrobacter rodentium*. *Infection and immunity*, 76(11), 5247-5256.
- Hartland, E. L., Huter, V., Higgins, L. M., Goncalves, N. S., Dougan, G., Phillips, A. D., & Frankel, G. (2000). Expression of Intimin γ from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in *Citrobacter rodentium*. *Infection and immunity*, 68(8), 4637-4646.
- Hengge-Aronis, R. (1993). Survival of hunger and stress: the role of RpoS in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell*, 72(2), 165-168.
- Hengge-Aronis, R. (2002). Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter σ S-selective?. *Current opinion in microbiology*, 5(6), 591-595.
- Ho, Y. C., Hung, F. R., Weng, C. H., Li, W. T., Chuang, T. H., Liu, T. L. & Hashimoto, M. (2017). Lrp, a global regulator, regulates the virulence of *Vibrio vulnificus*. *Journal of biomedical science*, 24(1), 54.
- Hwang, P. M., Pan, J. S., & Sykes, B. D. (2014). Targeted expression, purification, and cleavage of fusion proteins from inclusion bodies in *Escherichia coli*. *FEBS letters*, 588(2), 247-252.

Kalivoda, E. J., Stella, N. A., O'Dee, D. M., Nau, G. J., & Shanks, R. M. (2008). The cyclic AMP-dependent catabolite repression system of *Serratia marcescens* mediates biofilm formation through regulation of type 1 fimbriae. *Appl. Environ. Microbiol.*, 74(11), 3461-3470.

Kaufman, M., Nikitin, A. Y., & Sundberg, J. P. (2016). Histologic basis of mouse endocrine system development: a comparative analysis. *CRC Press*.

Kallonen, T., & Boinett, C. J. (2016). EPEC: a cocktail of virulence. *Nature Reviews Microbiology*, 14(4), 196-196.

Landgraf, J. R., Wu, J., & Calvo, J. M. (1996). Effects of nutrition and growth rate on Lrp levels in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 178(23), 6930-6936.

Lee, A. S., Gibson, D. L., Zhang, Y., Sham, H. P., Vallance, B. A., & Dutz, J. P. (2010). Gut barrier disruption by an enteric bacterial pathogen accelerates insulinitis in NOD mice. *Diabetologia*, 53(4), 741-748.

Luperchio, S. A., & Schauer, D. B. (2001). Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia. *Microbes and infection*, 3(4), 333-340.

Mata, G. M. S. C., Ferreira, G. M., & Spira, B. (2017). RpoS role in virulence and fitness in enteropathogenic *Escherichia coli*. *PloS one*, 12(6).

Mata, G. M. S. C., Ferreira, G. M., & Spira, B. (2017). RpoS role in virulence and fitness in enteropathogenic *Escherichia coli*. *PloS one*, 12(6).

McLeod, S. M., & Johnson, R. C. (2001). Control of transcription by nucleoid proteins. *Current opinion in microbiology*, 4(2), 152-159.

Medina-Aparicio, L., Rebollar-Flores, J. E., Gallego-Hernández, A. L., Vázquez, A., Olvera, L., Gutierrez-Rios, R. M. & Hernandez-Lucas, I. (2011). The CRISPR/Cas immune system is an operon regulated by LeuO, H-NS, and leucine-responsive regulatory protein in *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Journal of bacteriology*, 193(10), 2396-2407.

Molina-Quiroz, R. C., Silva-Valenzuela, C., Brewster, J., Castro-Nallar, E., Levy, S. B., & Camilli, A. (2018). Cyclic AMP regulates bacterial persistence through repression of the oxidative stress response and SOS-dependent DNA repair in uropathogenic *Escherichia coli*. *MBio*, 9(1), e02144-17.

Müller, C. M., Åberg, A., Strasevičiene, J., Emödy, L., Uhlin, B. E., & Balsalobre, C. (2009). Type 1 fimbriae, a colonization factor of uropathogenic *Escherichia coli*, are controlled by the metabolic sensor CRP-cAMP. *PLoS pathogens*, 5(2).

Mundy, R., MacDonald, T. T., Dougan, G., Frankel, G., & Wiles, S. (2005). *Citrobacter rodentium* of mice and man. *Cellular microbiology*, 7(12), 1697-1706.

Mundy, R., Pickard, D., Wilson, R. K., Simmons, C. P., Dougan, G., & Frankel, G. (2003). Identification of a novel type IV pilus gene cluster required for gastrointestinal colonization of *Citrobacter rodentium*. *Molecular microbiology*, 48(3), 795-809.

Newman, E. B., & Lin, R. (1995). Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *E. coli*. *Annual Reviews in Microbiology*, 49(1), 747-775.

Nuccio, S. P., & Bäumlér, A. J. (2007). Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71(4), 551-575.

Ou, Q., Fan, J., Duan, D., Xu, L., Wang, J., Zhou, D., & Li, B. (2017). Involvement of cAMP receptor protein in biofilm formation, fimbria production, capsular polysaccharide biosynthesis and lethality in mouse of *Klebsiella pneumoniae* serotype K1 causing pyogenic liver abscess. *Journal of medical microbiology*, 66(1), 1-7.

Peterson, S. N., & Reich, N. O. (2010). LRP: a nucleoid-associated protein with gene regulatory functions. In *Bacterial Chromatin* (pp. 353-364). Springer, Dordrecht.

- Petty, N. K., Bulgin, R., Crepin, V. F., Cerdeño-Tárraga, A. M., Schroeder, G. N., Quail, M. A., & Toribio, A. L. (2010). The *Citrobacter rodentium* genome sequence reveals convergent evolution with human pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 192(2), 525-538.
- Puente, J. L., Bieber, D., Ramer, S. W., Murray, W., & Schoolnik, G. K. (1996). The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Molecular microbiology*, 20(1), 87-100.
- Remaut, H., Tang, C., Henderson, N. S., Pinkner, J. S., Wang, T., Hultgren, S. J. & Li, H. (2008). Fiber formation across the bacterial outer membrane by the chaperone/usher pathway. *Cell*, 133(4), 640-652.
- Rendón, M. A., Saldaña, Z., Erdem, A. L., Monteiro-Neto, V., Vázquez, A., Kaper, J. B., & Girón, J. A. (2007). Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(25), 10637-10642.
- Saldaña, Z., Xicohtencatl-Cortes, J., Avelino, F., Phillips, A. D., Kaper, J. B., Puente, J. L., & Girón, J. A. (2009). Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. *Environmental microbiology*, 11(4), 992-1006.
- Schauer, D. B., & Falkow, S. (1993). Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. *Infection and immunity*, 61(6), 2486-2492.
- Spahn, T. W., Maaser, C., Eckmann, L., Heidemann, J., Lügering, A., Newberry, R. & Kucharzik, T. (2004). The lymphotoxin- β receptor is critical for control of murine *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Gastroenterology*, 127(5), 1463-1473.
- Sperandio, V., & Nguyen, Y. (2012). Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 90.

- Stella, N. A., Kalivoda, E. J., O'Dee, D. M., Nau, G. J., & Shanks, R. M. (2008). Catabolite repression control of flagellum production by *Serratia marcescens*. *Research in microbiology*, 159(7-8), 562-568.
- Subsin, B., Thomas, M. S., Katzenmeier, G., Shaw, J. G., Tungpradabkul, S., & Kunakorn, M. (2003). Role of the stationary growth phase sigma factor RpoS of *Burkholderia pseudomallei* in response to physiological stress conditions. *Journal of bacteriology*, 185(23), 7008-7014.
- Suh, S. J., Silo-Suh, L., Woods, D. E., Hassett, D. J., West, S. E., & Ohman, D. E. (1999). Effect of rpoS mutation on the stress response and expression of virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 181(13), 3890-3897.
- Thanassi, D. G., Saulino, E. T., & Hultgren, S. J. (1998). The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway. *Current opinion in microbiology*, 1(2), 223-231.
- Van der Woude, M. W., Kaltenbach, L. S., & Low, D. A. (1995). Leucine-responsive regulatory protein plays dual roles as both an activator and a repressor of the *Escherichia coli* pap fimbrial operon. *Molecular microbiology*, 17(2), 303-312.
- Waksman, G., & Hultgren, S. J. (2009). Structural biology of the chaperone–usher pathway of pilus biogenesis. *Nature Reviews Microbiology*, 7(11), 765-774.
- Wiles, S., Clare, S., Harker, J., Huett, A., Young, D., Dougan, G., & Frankel, G. (2004). Organ specificity, colonization and clearance dynamics in vivo following oral challenges with the murine pathogen *Citrobacter rodentium*. *Cellular microbiology*, 6(10), 963-972.
- Wurpel, D. J., Beatson, S. A., Totsika, M., Petty, N. K., & Schembri, M. A. (2013). Chaperone-usher fimbriae of *Escherichia coli*. *PloS one*, 8(1).