



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO

Efecto del regulador transcripcional Fur sobre
la expresión de los genes *icsA* y *rnaG* en *Shigella flexneri*

THOMAS KARL HAGEMANN GUTTER

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA.

Director de Tesis: Prof. Dr. Juan Carlos Salazar Garrido

2015

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina,
que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

THOMAS KARL HAGEMANN GUTTER

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para
optar al Grado de Magíster en Microbiología en el Examen de Defensa de
Tesis rendido el día 23 de abril de 2015.**

Prof. Dr. Juan Carlos Salazar Garrido

Director de Tesis

Programa de Microbiología y Micología, ICBM

Facultad de Medicina, Universidad de Chile

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dra. Claudia Lefimil P.

Prof. Dr. Germán Hermosilla D.

Prof. Dr. Ricardo Soto R.

Prof. Dra. Cecilia Toro U.

Presidenta Comisión

A mis queridos hermanos, Inge y Erich.

AGRADECIMIENTOS

La totalidad de las actividades realizadas en sociedad son producto de un esfuerzo colectivo, y claramente la actividad científica no escapa a esta noción. Siendo así, pormenorizar los agradecimientos tiene el riesgo de caer en ingratitud con quienes no han sido nombrados, quiero prevenir ello expresando mi profunda gratitud a todo el Programa de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

En particular quiero agradecer a mi amiga Mirta Silva por su compañía en el laboratorio. A Mirka Pardo por su diálogo ameno y permanente voluntad de apoyar mi trabajo de tesis. A Sandra Céspedes por su alegría y simplicidad. A Nayaret Chamorro por su actitud distendida y apoyo en mis presentaciones. Por último a Carlos Guerra y en especial también a Nora Mamani por su calidez y alegría.

Un gran agradecimiento al Dr. Roberto Vidal por sus valiosos comentarios, disposición a facilitar su laboratorio, y su buen humor. Al Dr. Felipe del Canto por sus aportes para mejorar mi presentación. Al Dr. Fabien Magne también por aportar a mis presentaciones. Agradezco a la Dra. Cecilia Toro por facilitar su laboratorio y siempre buena disposición a atender mis consultas, y hago de paso mi agradecimiento extensivo a los integrantes de su laboratorio.

Agradezco a mi familia. A mis padres: Cynthia y Walter, a mis hermanos: Inge y Erich. Mis amigos: Constanza, Felipe y Otto. También a mi amigo, Don René.

Agradezco a la Dra. Claudia Lefimil por facilitar material de trabajo y consejos para realizar parte de los experimentos de este trabajo. Al Dr. Edio Maldonado por facilitar parte de los reactivos empleados en los ensayos EMSA. Al Dr. Klaus Hantke por facilitar la cepa mutante empleada en el ensayo FURTA.

Finalmente mi completo agradecimiento al Dr. Juan Carlos Salazar, por ser un libro abierto del que aprendí muchísimo. Por estar siempre presente, más allá de cualquier obligación que pueda haber tenido con este trabajo. Y por transmitir la premura necesaria para poder llevar mi trabajo a buen puerto. Infinitas gracias.

Índice General.

• ABREVIATURAS.....	8
• RESUMEN.....	9
• ABSTRACT.....	11
1. Introducción	
• <i>Shigella</i> spp.: causante de disentería bacilar y su relevancia en Salud Pública.....	13
• El modelo invasivo <i>Shigella</i> spp.....	13
• El plásmido de virulencia de <i>Shigella</i> spp.....	14
• Cómo la bacteria se enfrenta a la baja disponibilidad de hierro presente.....	16
• Fur, regulador transcripcional global de la homeostasis del hierro.....	17
• Efecto de Fur en virulencia y movimiento dependiente de actina (ABM).....	18
2. Hipótesis.....	21
3. Objetivos.....	21
4. Materiales y Métodos.....	22
4.1. Medios y condiciones de cultivo.....	22
4.1.1. Medios de Cultivo.....	22
4.1.2. Condiciones de cultivo.....	22
4.2. Preparación y transformación de células competentes.....	22
4.2.1. Preparación de células quimiocompetentes.....	22
4.2.2. Preparación de células electrocompetentes.....	23
4.2.3. Transformación de células quimiocompetentes.....	24
4.2.4. Transformación de células electrocompetentes.....	24

4.3. Geles y corrida electroforética	24
4.4. Herramientas bioinformáticas empleadas.....	25
4.5. Clonamiento del gen <i>fur</i> , que codifica para la proteína Fur de <i>Shigella flexneri</i> con terminación de histidina.....	25
4.6. Ensayo de funcionalidad de la proteína recombinante Fur .de <i>S. flexneri</i>	26
4.7. Clonamiento de los genes blanco de <i>S. flexneri</i>	27
4.7.1. Clonamiento en el vector de expresión pTZ54R/T.....	27
4.7.2. Clonamiento en el vector de expresión pJS21FR.....	29
4.8. Determinación de la actividad β -galactosidasa de los promotores de los genes <i>icsA</i> y <i>rnaG</i> de <i>S. flexneri</i>	30
4.9. Ensayo de titulación de Fur, FURTA cualitativo.....	30
4.10. Ensayo de retardo en la corrida electroforética de DNA, EMSA.....	31
4.10.1. Generación de las sondas de DNA y Purificación de la proteína Fur.....	31
4.10.2. Protocolo de EMSA en gel de poliacrilamida.....	32
5. Resultados	
5.1. Clonamiento del gen <i>fur</i> de <i>S. flexneri</i> y determinación de la funcionalidad de la proteína Fur recombinante con terminación de histidinas en el carboxilo terminal....	33
5.2. Clonamiento de los promotores de los genes <i>icsA</i> y <i>rnaG</i> de <i>S. flexneri</i>	34
5.3. Generación de la fusión transcripcional de la región promotora de <i>icsA</i> y <i>rnaG</i> con <i>lacZ</i> respectivamente.....	36
5.4. Análisis del efecto de la proteína Fur sobre la transcripción de <i>icsA</i> y <i>rnaG</i> mediante deteminación de la actividad β - galactosidasa.....	39
5.5. Detección de cajas fur funcionales a través del ensayo FURTA cualitativo.....	40

5.6. Unión de Fur de <i>S. flexneri</i> a las regiones promotoras de <i>icsA</i> y <i>rnaG</i>	44
6. Discusión.....	47
7. Conclusiones.....	55
8. Bibliografía.....	56

Índice de figuras.

Figura 1: Modelo de invasión propuesto para <i>Shigella flexneri</i>	14
Figura 2: Esquema del plásmido de virulencia de <i>Shigella</i> spp.....	16
Figura 3: Esquema de las regiones promotoras convergentes de <i>icsA</i> y <i>rnaG</i>	19
Figura 4: Predicción bioinformática de cajas fur hipotéticas en la región promotora de <i>icsA</i> y de <i>rnaG</i>	20
Figura 5: Representación esquemática de la región que contiene los dos sitios de policlonamiento del plásmido pJS21FR.....	29
Figura 6: Ensayo de funcionalidad de la proteína Fur recombinante.....	34
Figura 7: Obtención y análisis de clones recombinantes de cada región promotora en pTZ57R/T.	35
Figura 8: Representación esquemática de las construcciones obtenidas en vector de expresión pJS21FR.	37
Figura 9: Análisis de clones recombinantes de cada región promotora en pJS21FR.....	38
Figura 10: Determinación de la actividad β -galactosidasa de las fusiones transcripciones PICSA:: <i>lacZ</i> y PRNAG:: <i>lacZ</i> en presencia y ausencia de Fur y hierro.....	40
Figura 11: Ensayo FURTA cualitativo.....	42

Figura 12: Ensayo de retardo en la migración electroforética de la región promotora de *icsA* y *rnaG*.45

Figura 13: Modelo propuesto de la regulación de Fur sobre la expresión de *icsA* durante la invasión y diseminación a lo largo del tejido colónico52

Índice de tablas.

Tabla 1.- Cepas empleadas en esta investigación.....	23
Tabla 2.- Oligonucleótidos empleados.....	28
Tabla 3.- Vectores de clonamiento y expresión utilizados.....	42
Tabla 4.- Enzimas y equipos (o kits) bioquímicos empleados.....	46

Abreviaturas.

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTT: Ditioneitol

DO₄₂₀: Densidad óptica a 420 nm

DO₅₅₀: Densidad óptica a 550 nm

DO₆₀₀: Densidad óptica a 600 nm

EMSA: Retardo en la corrida electroforética de DNA (Electrophoretic Mobility Shift Assay, por sus siglas en inglés)

FURTA: Ensayo de titulación de Fur. ("*Fur titration assay*", por sus siglas en inglés)

HEPES: Ácido N-2-Hidroxietilpiperacina-N'-2-Etanosulfónico

IPTG: Isopropilo-beta-tiogalactopiranosido

LB: caldo luria ("*Luria Broth*")

MOPS: Ácido 3-N-morfolino propanosulfónico

ONPG: orto-nitrofenil-β-D-galactopiranosido

PCR: Reacción de polimerasa en cadena

PMSF : persulfato de amonio.

RPM: Revoluciones por minuto

SDS: Dodecilsulfato sódico

sRNA: RNA pequeño ("*small*" RNA)

X-Gal: 5-bromo-4 cloro-3 indolil-β-D-galactopiranosido

Resumen

Shigella flexneri es un patógeno entérico, que afecta principalmente a niños menores de 5 años, ocasionando cuadros de diarrea acuosa con y sin sangre. En un porcentaje minoritario la enfermedad presenta su manifestación más severa, el síndrome disentérico, donde la diarrea con sangre es abundante, y que de no ser tratada, puede llegar a producir la muerte.

Shigella spp presenta un ciclo de vida intracelular, para lo cual ha desarrollado sofisticados mecanismos que le permiten inducir su propia fagocitosis por parte de la célula blanco, el enterocito del colon. Para que este mecanismo de invasión sea posible, la bacteria posee un plásmido de virulencia, donde están codificados diversos factores que permiten explicar este fenotipo de *Shigella* spp, así como su capacidad de diseminar en el tejido colónico. La expresión de los genes del plásmido de virulencia está bajo el control del regulador plasmidial VirF, que gobierna entre otros, la llamada región de entrada, donde están codificadas las proteínas del sistema secretor tipo III, que media el ingreso de efectores a la célula hospedera.

Para que la bacteria pueda avanzar a lo largo de la mucosa colónica, genera polímeros elongados a partir de la actina que forma parte del citoesqueleto de la célula infectada. En este proceso resulta esencial la participación de la proteína IcsA, factor de virulencia codificado en el plásmido, y encargado de iniciar la generación de estos polímeros o colas de actina. Enfrentada la bacteria a la temperatura corporal del hospedero, la transcripción de *icsA* se ve favorecida por el activador VirF, mientras que la regulación negativa es mediada por el RNA pequeño RnaG, reprimiendo su expresión.

Además, otros factores ambientales gobiernan la expresión de los genes del plásmido de virulencia, dentro de ellos está la concentración de hierro, nutriente fundamental para los microorganismos, y cuya homeostasis está controlada por el regulador transcripcional Fur (Ferric uptake regulator) codificado en el genoma.

La proteína Fur además puede controlar la transcripción de otros genes no involucrados en el metabolismo del hierro, como por ejemplo *virF* en el plásmido de virulencia. Fur también reprime la transcripción del RNA pequeño RyhB, el que a su vez reprime la transcripción de *virB*, regulador principal secundario del plásmido de virulencia.

Análisis bioinformáticos y manuales realizados sobre la región promotora de *icsA*, y *rnaG* arrojaron la detección de secuencias blanco de unión a Fur, o cajas fur. Planteándose de este modo la hipótesis que esta proteína pueda regular la expresión de estos genes. Para ello se emplearon las estrategias de: fusiones transcripcionales para el análisis del efecto de Fur sobre la transcripción de las regiones promotoras de *icsA* y *rnaG*, y el ensayo de retardo en la migración, para evaluar si Fur puede unir a las regiones promotoras de *icsA* y *rnaG*.

En primera instancia se procedió a la amplificación y clonamiento de las regiones promotoras de los genes *icsA* y *rnaG* en un vector de multicopia. Posteriormente, se liberó el inserto y se obtuvo una fusión transcripcional en un vector de expresión que controlaba la expresión del gen reportero *lacZ*. Adicionalmente, se realizaron construcciones similares donde en otro sitio de clonamiento del mismo vector, se clonó el gen *fur* sintetizándose una proteína funcional. Se midió el nivel de transcripción en presencia y ausencia de Fur mediante la determinación de la actividad β -galactosidasa, observándose que Fur es capaz de reprimir la transcripción de *icsA*, pero no la de *rnaG*, de forma significativa.

Para evaluar si Fur une a las regiones promotoras estudiadas, se empleó la cepa reportera *E. coli* H1717. Esta cepa posee una fusión transcripcional en el cromosoma, el gen *lacZ*, que está bajo el control del promotor sensible a Fur, *fhuf* y fue utilizada para la detección de cajas fur mediante el ensayo FURTA. Al transformar esta cepa con los plásmidos recombinantes se obtuvo un resultado FURTA-positivo para *icsA* y FURTA-negativo para *rnaG*. Por último, se evaluó posibilidad que Fur pueda unir directamente las respectivas secuencias promotoras a través del ensayo de retardo en la migración de la corrida electroforética de DNA, EMSA. Para ello la proteína Fur fue purificada e incubada con las respectivas sondas de *icsA* y *rnaG*, observándose que la retención para *icsA* alcanza casi el 80%, mientras que para *rnaG* era de alrededor del 17%

Los datos presentados en esta tesis sugieren que Fur es capaz de reprimir la expresión de *icsA* de forma directa a través de la unión a su secuencia promotora, mientras que no afecta la transcripción de *rnaG* de forma significativa.

Abstract.

Shigella flexneri is an enteric pathogen that mainly affects children under 5 years old, causing watery diarrhea with or without blood. While, the most severe illness, dysenteric syndrome, is present in a small percentage, diarrhea with abundant blood is presented, and if not treated, may cause death.

Shigella spp has an intracellular life style, for what it has developed mechanisms allowing to induce its own phagocytosis by the target cell, the colonic enterocyte. To make possible this invasion mechanism, the virulence factors of the bacterium are encoded in a virulence plasmid, as well its capability to disseminate across the colonic tissue. The expression of genes within the virulence plasmid are under control of the VirF regulator, including the entry region, among others, where is encoded the type three secretion system, through which the effectors are secreted inside the host cell.

To make possible for the bacterium to move across the colonic mucosa, it generates elongated actin polymers, in which process, IcsA has a crucial role. This virulence factor, encoded on the plasmid, is responsible of initiating the manufacture of these polymers or actin tails. The expression of *icsA* is positively regulated by the master regulator VirF, while it is strongly repressed by a sRNA, RnaG. This RNA is encoded in the complementary strand of *icsA*. Beside temperature, other environmental signals control the expression of the genes encoded on the virulence plasmid, among them is the iron concentration, an essential nutrient for all the microorganisms, which its homeostasis is under tight regulation by the transcriptional regulator Fur. Fur protein can also control the transcription of other genes not involved in iron metabolism, such as *virF* in the virulence plasmid. Fur also represses transcription of the small RNA RyhB, which in turn represses transcription of *virB*, secondary master regulator of the virulence plasmid.

Bioinformatics analyzes on the promoter region of *icsA*, and *rnaG* allowed to detect binding sequences of Fur regulator, fur boxes. Thus, considering the hypothesis that this regulator may act on the regulation of these genes, a transcriptional fusions strategy was used, for analyzing the effect of Fur on the transcription of the of *icsA* and *rnaG*. A complementary strategy involved the electrophoretic mobility shift assay, to assess whether Fur could bind to the promoter regions of *icsA* and/or *rnaG*.

We proceeded to the amplification and cloning of both promoter regions of genes *icsA* and *rnaG* into a multicopy plasmid. Subsequently, the insert was released and a transcriptional fusion was obtained into an expression vector, in which expression of the *lacZ* reporter gene is controlled by one of those promoter. Additionally, similar constructions were made, where the *fur* gene coding for functional Fur protein was cloned into same expression vector. The transcription level was measured in the presence and absence of Fur by determining the β -galactosidase activity. Fur was able to repress transcription of *icsA*, but not significantly to *rnaG*.

To assess Fur binding to the promoter regions studied, the reporter strain, *E. coli* H1717, having a chromosomal transcriptional fusion with *lacZ* under the control of *fhuF* promoter, was used for detecting the fur boxes, by FURTA assay. By transforming this strain with the recombinant plasmids a FURTA-positive assay was observed with the *icsA* promoter.

Finally, a pure Fur protein was able to bind and retard the electrophoretic migration of *icsA* promoter with almost 80% of retention, while for *rnaG* was around 17%. The data presented in this thesis suggest that Fur is able to repress the expression of *icsA* directly through the binding to its promoter sequence, while not affecting transcription of *rnaG* significantly.

1. Introducción

***Shigella* spp.: causante de disentería bacilar y su relevancia en Salud Pública.**

El género *Shigella* es causante de la disentería bacilar, enfermedad entérica autolimitada en la cual ocurre destrucción del epitelio colónico, y que en casos minoritarios puede ocasionar la muerte. El hospedero exclusivo de la bacteria es el hombre. La enfermedad se manifiesta con: fiebre alta, dolor abdominal severo, calambres abdominales, defecación dolorosa con diarrea acuosa con sangre, mucus y pus (Mandel y cols., 2006).

En el mundo se estima que *Shigella* infecta a 200 millones de personas al año, mientras que causa la muerte a 650.000, presentando una alta tasa de mortalidad en neonatos (Mandel y cols., 2006). El género se divide en cuatro especies: *S. dysenteriae*, *S. flexneri*, *S. sonnei*, y *S. boydii*. En Chile y el resto del mundo las especies más comunes son *S. sonnei* y *S. flexneri*. (ISP., 2014. Kosek y cols., 2010).

El modelo invasivo *Shigella* spp.

La bacteria la podemos encontrar en alimentos contaminados y en aguas estancadas, pudiendo ingerirse por esta vía o por transmisión fecal-oral. Luego de la ingesta, *Shigella* transita por el sistema digestivo, para finalmente encontrar a su tejido blanco, la mucosa colónica. Entonces es capaz de inducir su entrada a la célula M (Wassef y cols., 1989) atravesándola y continuando su avance hasta ingresar al macrófago envuelta en una vacuola. El escape de la bacteria desde la vacuola fagocítica hacia el citoplasma del macrófago lleva consigo la secreción de proteínas Ipa, estas invasinas activan la proteína caspasa I, la que provoca a su vez la liberación de interleuquina-I, desencadenando la muerte por piroptosis del macrófago (Zychlinsky y cols., 1992. Senerovic y cols., 2012), lo que implica la liberación de nuevas interleuquinas, provocando en última instancia el reclutamiento de polimorfos nucleares neutrófilos, los que finalmente serán encargados de terminar con la infección (Lucchini y cols., 2005). Luego del escape desde el macrófago, *Shigella* entra a la célula epitelial por la cara basolateral, su ingreso se realiza nuevamente a través de una vacuola dada la capacidad de la bacteria de inducir a la célula epitelial para que, a pesar de no ser un fagocito profesional, pueda fagocitarla (Sansonetti y cols., 1986) desde donde escapa para luego comenzar un desplazamiento intra e intercelular mediante el movimiento dependiente de

actina (ABM, por la sigla en inglés para "Actin Based Motility") (**Figura 1**). Para ello, la bacteria es capaz de provocar el re-arreglo del citoesqueleto del hospedero. En este proceso ocurre la nucleación y consiguiente polimerización de actina, generándose filamentos o colas de actina cuyo origen es producto de la interacción entre la proteína bacteriana de membrana externa IcsA con la proteína N-WASP y componentes del complejo Arp2/3. La interacción de IcsA con N-WASP activa a esta última con la apertura del dominio de unión a actina de esta proteína. Después de la nucleación, la proteína activante (WASP) se disocia del complejo Arp2/3 y puede participar en un nuevo sitio de nucleación (*Khaitlina, 2014*). De este modo la bacteria es capaz de avanzar de enterocito en enterocito, lo que sumado a liberación de citoquinas e infiltración de polimorfonucleares (PMN) al escapar del macrófago dan cuenta en conjunto, de la injuria celular que explica el cuadro de diarrea que presentan quienes padecen de la enfermedad (**Figura 1**).

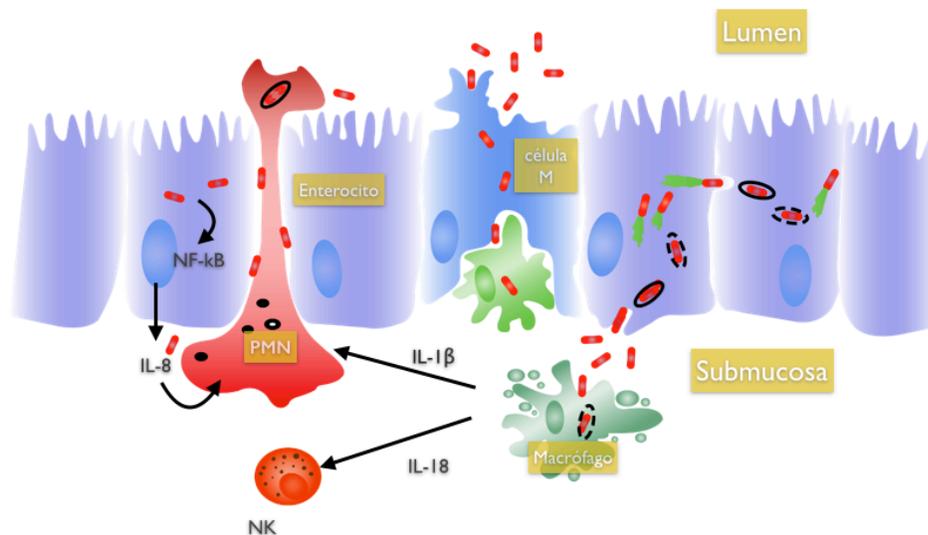


Figura 1: Modelo de invasión propuesto para *Shigella flexneri*. Ver texto para descripción del modelo. Adaptado de *Schroeder y Hilbi 2008*.

El plásmido de virulencia de *Shigella* spp.

Un elemento extracromosómico de la bacteria, de aproximadamente 230 kb es el responsable de otorgar la cualidad invasiva a *Shigella* (*Sansonetti y cols., 1982*), es denominado "plásmido de virulencia" del que son portadores todos los serotipos del género. El

plásmido está conformado en gran medida por elementos móviles, tratándose de un mosaico de alrededor de 100 genes y numerosas secuencias de inserción (*Le Gall y cols., 2005*).

Al analizar la conformación del plásmido, se definió una región de 30 kilobases de longitud, sin la cual la bacteria no puede invadir las células epiteliales, ésta es la llamada región de entrada (**Figura 2**) (*Maurelli y cols., 1985*). Dentro de este segmento resaltan dos regiones génicas, en la primera región están codificadas proteínas encargadas de mediar el ingreso a la célula hospedera, destacando dentro de ellas las invasinas IpaA, IpaB, IpaC, IpaD e IpgC. La segunda región está orientada de forma divergente a la primera, y codifica un sistema secretor tipo III (SST3), estructura similar a una jeringa molecular, a través de la cual la bacteria es capaz de inyectar a la célula hospedera los efectores necesarios para invadir (*Blocker y cols., 2001*). Se ha establecido que IpaB y D son esenciales para que ocurra la secreción de efectores por el SST3, controlando de ese modo el tránsito que ocurre por esta estructura (*Menard, 1994*). La regulación de la expresión génica del plásmido de virulencia responde principalmente a la temperatura ambiental en la que se encuentra la bacteria. Otras señales ambientales importantes son pH, osmolaridad, temperatura y concentración de hierro (*Schroeder y Hilbi, 2008*).

La expresión de los elementos codificados en el plásmido está finamente regulada. En este contexto, el producto del gen *virF* participa como el regulador maestro responsable de activar la transcripción de los genes del plásmido (*Adler y cols., 1989*), siendo su expresión favorecida a 37°C, temperatura corporal de hospedero, o temperatura permisiva. Subsecuentemente, VirF activa la transcripción del regulador secundario *virB* y también de *icsA* (*Sakai y cols., 1988*).

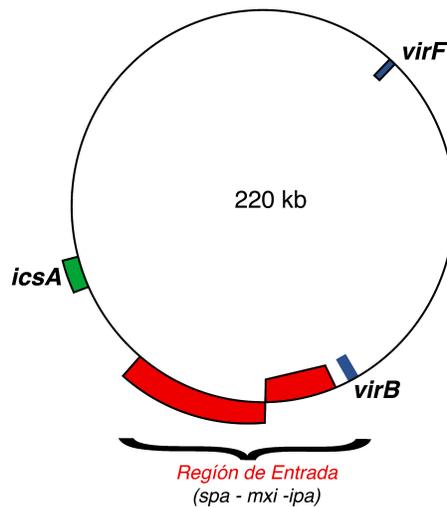


Figura 2: Esquema del plásmido de virulencia de *Shigella* spp. Se observa el gen *virF* que codifica para el regulador principal del plásmido y *virB* que codifica para el regulador secundario (ambos en azul). Se observa además en verde al gen *icsA* y en rojo la región de entrada, dentro de la que destaca la zona que codifica para el sistema secreción tipo III y la de las proteínas Ipa. (Adaptado de Venkatesan y cols., 2001)

Cómo la bacteria se enfrenta a la baja disponibilidad de hierro presente.

El hierro es un micronutriente esencial para los patógenos entéricos y seres vivos en general, ya que es utilizado como cofactor en un sinnúmero de procesos enzimáticos.

Dentro del hospedero la concentración de hierro libre es de 10^{-24} M (Mandell y cols., 2010) mientras que el requerimiento de la bacteria es del orden de 10^{-9} M (Braun, 2001), es decir, el hospedero presenta condiciones restrictivas en cuanto a disponibilidad de hierro. Por lo anterior no es extraño que las bacterias hayan desarrollado sistemas altamente especializados para competir por el hierro presente en el hospedero, que se activan o sobreexpresan cuando la bacteria enfrenta un ambiente carente de hierro. Dentro de las estrategias más usuales empleadas en este escenario está la secreción de quelantes de hierro extracelular, denominados sideróforos. Los sideróforos son capaces de solubilizar el escaso ion férrico (Fe^{+3}) que se pueda encontrar libre o bien que ha sido capturado por quelantes

frente a los cuales el sideróforo pueda tener mayor afinidad. El sideróforo entonces secuestra el ion férrico mediante la formación del complejo ferri-sideróforo. La bacteria posee receptores de membrana externa que permiten el paso del complejo ferri-sideróforo hacia el periplasma, y desde allí al citoplasma por transportadores ABC. Entonces, el ion férrico es reducido o bien el sideróforo degradado, para la utilización del ion ferroso (*Carpenter y Payne, 2014*).

Fur, regulador transcripcional global de la homeostasis del hierro.

El microorganismo no solamente debe satisfacer sus requerimientos mínimos de hierro, sino también protegerse de su exceso, dado que el metal es tóxico en altas concentraciones, en condiciones aeróbicas es capaz de catalizar la reacción de Fenton, en la cual el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es convertido en el radical hidroxilo, el que ocasiona estrés oxidativo en la célula (*Fillat, 2013, Carpenter y Payne, 2014*). Entonces, resulta clara la importancia de controlar los niveles de hierro dentro de un rango óptimo para la fisiología bacteriana.

En 1978 se detectaron mutantes en *Salmonella* que expresaban constitutivamente sistemas captadores de hierro, estos mutantes fueron denominados Fur, por las siglas en inglés para "regulador de la captación férrica". En la actualidad se habla de la familia de proteínas Fur, conformada por variadas subclases con diferentes funciones, siendo descritos múltiples homólogos de *fur*, lo que constituye un grupo ubicuo en procariontes, existiendo en bases de datos cerca de 10000 secuencias pertenecientes a 4091 bacterias y arqueas diferentes (*Fillat 2013*).

La proteína Fur es un regulador transcripcional conformado por 120 aminoácidos totalizando un peso molecular de alrededor de 17 kDa. Para ser activo debe unirse al ion ferroso (Fe^{+2}), tomando una conformación de homodímero, pudiendo entonces unir a secuencias palindrómicas, ricas en A/T (*Fillat, 2013*) denominadas cajas fur, en un inicio definidas como una secuencia de 19 pb de invertido repetidos (GATAATGATAATCATTATC), y posteriormente como la repetición del hexámero GATATT (*Escolar y cols., 1988*), aunque también hay otros autores que definen la caja fur como un heptámero invertido repetido que en conjunto totalizaría 15 pb (*Baichoo y Helmann, 2002*).

El espectro de procesos regulados por Fur va más allá de aquéllos involucrados en la captación y síntesis de hierro, pudiendo abarcar procesos relacionados a la respiración celular,

metabolismo de nitrógeno, expresión de factores de virulencia y defensa contra el estrés oxidativo, entre otros (Fillat 2013).

Si bien Fur ha sido descrito principalmente como represor, también puede operar como regulador positivo, es el caso del gen *sodB* en *E. coli*, que codifica para la superóxido dismutasa B (Dubrac y Touati 2000).

Efecto de Fur en virulencia y movimiento dependiente de actina (ABM).

Del punto de vista de la relación entre Fur y virulencia en *Shigella flexneri*, es relevante mencionar que en trabajos previos del laboratorio se ha observado que Fur regula negativamente a *virF* (Otárola, 2012) notándose que el regulador es capaz de unir a la secuencia promotora de este gen (*datos no mostrados*). Lo anterior iría de acuerdo con que al estar en condiciones de carencia de hierro, como es el medio intracelular, Fur se encuentra inactivo y entonces no habría represión sobre la expresión de los efectores codificados en el plásmido de virulencia que son regulados positivamente a través de VirF, como es el caso de *icsA* (Sakai y cols., 1988).

En *S. flexneri* se ha reportado que Fur activo regula negativamente al RNA pequeño (sRNA) RhyB (Oglesby y cols., 2005). Éste, a su vez en *S. dysenteriae* es capaz de reprimir la expresión del regulador principal secundario del plásmido de virulencia *virB*, lo que lleva a una atenuación en la virulencia de la bacteria (Murphy y Payne, 2007, Broach y cols., 2012). Este es solo un ejemplo de la acción de un sRNA, que como estrategia de regulación está ampliamente distribuido (Gottesman, 2004). Se ha sugerido también que la acción de los sRNAs podría estar especialmente ligada a virulencia, dándose el caso de *E. coli*, donde la mayoría de estos sRNA están presentes en cepas patogénicas (Giangrossi y cols., 2010). Dicha situación también se replica en *S. flexneri*, donde se ha descrito un sRNA codificado en el plásmido de virulencia, RnaG. Este sRNA regula negativamente la transcripción del gen que codifica al factor de virulencia IcsA (**Figura 3**).

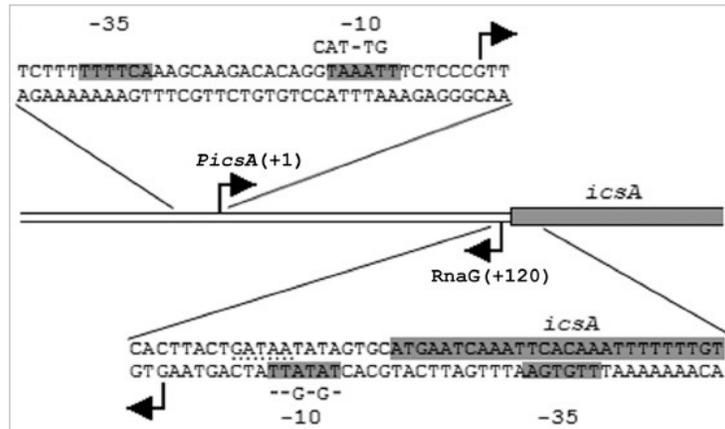


Figura 3: Esquema de las regiones promotoras convergentes de *icsA* y *rnaG*. Se indican las cajas -10 y -35 de cada gen. Las flechas en ángulo recto indican los sitios de inicio de transcripción de cada gen (Giangrossi y cols., 2010).

Existen otros patógenos de vida intracelular, donde se ha descrito la relación entre virulencia y hierro, como el caso de *Listeria monocytogenes*, bacteria gram positivo que junto a *S. flexneri* y *Rickettsia conorii* comparten aspectos del ciclo infeccioso, como el ingreso a células no fagocíticas e internalización al fagosoma. En el caso de *L. monocytogenes* se suma el hecho que al diseminarse, esta bacteria presenta ABM a través de una proteína funcionalmente análoga a IcsA, ActA. Se ha reportado que la producción de ActA es inducida al interior de células eucariotas (Moors y cols., 1999). Al igual que *Shigella*, *L. monocytogenes* posee Fur (McLaughlin, 2011), notándose además que la formación de colas de actina es más eficiente en condiciones de carencia de hierro (Conte y cols., 2000).

Por tanto es posible que en *L. monocytogenes* la relación entre la carencia de hierro y la generación de colas de actina sea mediada por Fur. Si bien, esta bacteria no está emparentada con *Shigella*, hay autores que proponen que ambas bacterias llegaron a una solución altamente similar de punto de vista de la movilidad al interior (y entre) células hospederas (Goldberg y cols., 1995, Zeile y cols., 1996).

A través de análisis bioinformáticos y manuales de la región promotora de *icsA* y *rnaG* (Giangrossi y cols., 2010) se detectaron siete y cinco cajas de unión a Fur, respectivamente (Figura 4), lo que sumado a los antecedentes presentados, hace posible plantear que la expresión de *icsA*, similarmente a lo observado para *actA* en *L. Monocytogenes*, sea regulada positivamente en condiciones de carencia de hierro, donde el mediador de este proceso sea el

regulador transcripcional Fur. Alternativamente, es posible que Fur pueda operar de forma indirecta sobre *icsA* a través de *rnaG*.



Figura 4: Predicción bioinformática de cajas fur presentes en la región promotora de *icsA* (A) y de *rnaG* (B). Las líneas rojas indican posibles cajas fur. La secuencia color rosa corresponde a la región promotora incluyendo las respectivas cajas -10, -35 en fondo negro. La flecha negra en ángulo recto corresponde al inicio de la transcripción como fue descrito por *Giangrossi y cols., 2010*.

En base a los antecedentes presentados se propone la siguiente hipótesis de trabajo.

2. Hipótesis.

La expresión de los genes *icsA* y *rnaG* es regulada por la proteína Fur.

3. Objetivos.

General: Establecer la participación del regulador Fur sobre la actividad transcripcional de los genes *icsA* y *rnaG*, determinando si su regulación es directa o indirecta.

Específico: **1) Determinar si Fur actúa como regulador positivo o negativo de *icsA* y/o *rnaG*.**

Actividades:

1.1- Generar vectores recombinantes que porten la región promotora de *icsA* y *rnaG*.

1.2- Generar fusiones transcripcionales y medir la actividad transcripcional de *icsA* y *rnaG* en presencia y ausencia de Fur, mediante fusiones transcripcionales.

Específico: **2) Establecer que Fur se une a la región promotora de *icsA* y/o *rnaG*.**

Actividades:

2.1.-Evaluar funcionalidad de cajas fur mediante ensayo de titulación de Fur, FURTA.

2.2- Evaluar la unión de Fur a la región promotora de *icsA* y/o *rnaG* mediante el ensayo de retardo de la corrida electroforética en gel, EMSA.

4. Materiales y Métodos.

4.1 Medios y condiciones de cultivo.

4.1.1 Medios de Cultivo:

Medio LB y agar-LB: fueron preparados con NaCl (1% p/v), extracto de levadura (0,5% p/v) y triptona (1% p/v). Para medios sólidos, se agregó agar al 1,5% p/v. El medio agar MacConkey se preparó como describe el proveedor (51,5g/l). Según los requerimientos se empleó ampicilina, estreptomycin y kanamicina, a una concentración final de 100µg/ml.

4.1.2 Condiciones de cultivo:

Los medios líquidos y sólidos de cultivo fueron incubados a 37°C en condiciones aeróbicas, con agitación a 160 rpm cuando fue requerido. El tiempo de incubación para cultivos de toda la noche fue de 16 h. Para la el ensayo de determinación de actividad β-galactosidasa el medio se suplementó con FeSO₄ 60 µM, o el quelante de hierro 2,2'-dipiridil 250 µM.

4.2 Preparación y transformación de células competentes.

4.2.1 Preparación de células quimiocompetentes:

La preparación de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5-α (**Tabla 1**) se realizó mediante una adaptación del método de Inoue (*Inoue y cols., 1990*).

A partir de un preinóculo de células DH5-α cultivadas toda la noche, se extrajo un inóculo cuyo volumen es igual al 1% del volumen total del cultivo del que se prepararon las células competentes. Las bacterias se cultivaron a 37°C y 160 rpm de agitación hasta DO_{600nm} de 0,3. Entonces el cultivo se dejó en hielo por 10 min. Se colectaron las células por centrifugación a 3420 xg durante 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el sedimento de células se suspendió en solución de Inoue pre enfriada (HEPES 10 mM, CaCl₂ 15 mM, KCl 250 mM y MnCl₂ 55 mM, pH 6,7) en una relación de : 40 ml de solución de Inoue, por 40 ml de volumen de cultivo centrifugado.. Las bacterias se mantuvieron durante 10 minutos en hielo y a continuación se centrifugó a 3420 xg durante 10 min a 4°C. Eliminado el sobrenadante, se suspendieron las células en 4 ml de solución de Inoue y se incubó en hielo 30 min. Luego se agregó 70 µl de DMSO por ml de suspensión de células y se mantuvo por 10 min en hielo. Finalmente se

generaron alícuotas de 200 µl en tubos eppendorf pre enfriados. Las células se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Tabla 1.- Cepas empleadas en esta investigación.

Cepas	Descripción, genotipo relevante.	Origen
<i>S. flexneri</i> 2457T	Cepa silvestre	Laboratorio Dr. Juan C. Salazar.
<i>E. coli</i> DH5-α	<i>lacZ</i> ΔM15	<i>Sambrook y cols., 1989</i>
<i>E. coli</i> H1717	cepa reportera para FURTA, MC4100 (F ⁻ [<i>araD139</i>] _{B_r} Δ(<i>argF-lac</i>)169* &lambda ⁻ e14- <i>flhD5301</i> Δ(<i>fruK-yeiR</i>)725 (<i>fruA25</i>)‡ <i>relA1 rpsL150</i> (strR) <i>rbsR22</i> Δ(<i>fimB-fimE</i>)632(::IS1) <i>deoC1</i>) <i>aroB</i> , <i>fhuF</i> ::λ <i>lacMu</i>	Obtenida del Dr. Klaus Hantke.
<i>E. coli</i> QC1732	F-(<i>argF-lac</i>)U169 <i>rpsL</i> Δ <i>fur</i> :: <i>kan</i>	<i>Touati y cols., 1995</i>
<i>E. coli</i> H1780	<i>fhu</i> :: <i>lacZ</i> Δ <i>fur</i>	<i>Hantke, 1987</i>

4.2.2 Preparación de células electrocompetentes:

A partir de un preinóculo de células de *E. coli* H1717 o QC-1732, cultivado toda la noche, se extrajo un inóculo cuyo volumen es igual al 0,25 % del volumen total del cultivo del que se prepararon las competentes. En este caso 250µl para 100ml de cultivo con antibiótico. Se procedió a cultivar a 37°C con agitación a 160 rpm. hasta que alcanzó una DO₆₀₀ de 0,4. En ese momento el cultivo se dejó en hielo por 10 min. A continuación fue centrifugado a 3420 xg durante 10 min a 4°C. El sobrenadante fue desechado y el sedimento de células suspendido en H₂O miliQ estéril. Nuevamente se centrifugó a 3420 xg durante 10 min a 4°C. Se repitió el

descarte del sobrenadante y las células fueron nuevamente lavadas con H₂O miliQ estéril y centrifugadas a 3420 xg durante 10 min a 4°C. Finalmente las células fueron suspendidas en 1 ml de glicerol 10% v/v generando alícuotas de 50 µl en tubos de 1,5 ml. Entonces las células competentes fueron almacenadas a -80°C hasta su uso.

4.2.3 Transformación de células quimiocompetentes por “shock” térmico.

Las células quimiocompetentes *E. coli* DH5-α descongeladas en hielo se incubaron con el DNA por 30 minutos en hielo. Seguidamente la mezcla fue sometida a 42°C por 45s exactos, sin agitación. A continuación las células fueron dejadas en hielo por 2 min para luego agregar 800 µl de medio LB (sin antibiótico). A continuación las células fueron incubadas a 37°C con agitación (160 rpm). Seguidamente las células fueron centrifugadas a 3420 xg durante 3 min y suspendidas en 120 µl de LB. Por último las células fueron sembradas en placas de agar-LB o agar MacConkey para ser crecidas durante la noche a 37°C.

4.2.4 Transformación de células electrocompetentes por electroporación.

Se descongelaron en hielo 50 µl de células electrocompetentes de *E. coli* H1717 o QC1732, según requirió el experimento. A las células se agregó 1 µl de DNA plasmidial. Los 51 µl se depositaron en cubeta estéril para electroporador, previamente enfriada. La cubeta cargada con la muestra se sometió a 2400 volt durante 5 ms. Inmediatamente después de electroporar se agregó a la cubeta 800 µl de LB sin antibiótico ambientado a 37°C. Se retiró el volumen total de la cubeta y se dejó en cultivo por 1h a 37°C, con agitación (a 160 rpm). Posteriormente las células fueron centrifugadas a 16000 xg por 3 min y el sedimento fue suspendido en 100 µl de LB para ser sembrado en placas de agar-LB o agar MacConkey para ser crecidas durante la noche (mínimo 20 h) a 37°C.

4.3 Geles y corrida electroforética.

- Geles de agarosa

Los geles empleados para la separación electroforética de DNA se prepararon con TAE 0,5x (Tris ácido acético 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) a concentraciones de agarosa desde

0,6% (p/v) hasta 1,2% (p/v) según fue requerido en cada experimento. La condición de corrida electroforética fue de 100mV desde 40 min hasta 1 h 30 min.

- Geles de poliacrilamida (Relación Acrilamida/Bis-acrilamida, 29:1).
 - Separación electroforética de proteínas: gel de poliacrilamida concentrador al 5%, y separador al 15% (*Harlow y Lane, 1998*). La condición de corrida electroforética fue de: 150 mV durante 1 h 10 min.
 - Separación electroforética de DNA (ensayo EMSA): gel poliacrilamida al 6%. La condición de corrida electroforética fue de: 70 mV durante 2 h 20 min.

4.4 Herramientas bioinformáticas empleadas.

-Detección bioinformática de cajas fur.

Para la detección de posibles cajas fur se empleó el programa bioinformático en línea, *Virtual footprinting 3.0* (*Münch y cols., 2005*) realizando el análisis sobre los datos obtenidos para las secuencias promotoras para *icsA* y *rnaG* descritas por *Giangriossi y cols., 2010*. Para la detección de cajas fur adicionales y corroboración de las regiones promotoras previamente reportadas, se empleó la herramienta en línea BPROM (<http://www.softberry.com/berry.html>)

- Diseño de Partidores.

Se empleo el programa computacional Vector NTI® versión 11.0 de Invitrogen™

- Predicción de digestión con endonucleasas de restricción.

La digestión *in silico* para las digestiones ensayadas se realizó con el programa bioinformático en línea, NEBcutter V2.0 (*Vincze y cols., 2003*) <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>

4.5 Clonamiento del gen *fur*, que codifica para la proteína Fur de *Shigella flexneri* con terminación de histidina.

El gen *fur* de *Shigella flexneri*, fue amplificado desde el DNA genómico por PCR usando el par de partidores SFFurF y SFFurR2 (**Tabla 2**), los que fueron diseñados para no incluir el codón de término nativo del gen. El producto de PCR fue purificado a partir del gel de agarosa y ligado al vector de clonamiento pTZ57R/T mediante el kit InsTAclone™ PCR Cloning (Fermentas). La mezcla de ligación fue transformada en células quimiocompetentes

de *E. coli* DH5- α , las que a continuación fueron sembradas en placas LB-ampicilina y X-Gal (40 μ g/ml).

Las colonias transformadas fueron seleccionadas mediante α -complementación del gen *lacZ* en DH5- α ("screening" blanco/azul) y aisladas en placas nuevas de LB-ampicilina. Se confirmó la presencia del inserto que portaban las colonias blancas mediante PCR colonia utilizando los partidores T7ter y M13F (**Tabla 2**).

El DNA plasmidial de los clones seleccionados fue purificado y digerido con enzimas de restricción que reconocen sitios de cortes que flanquean el inserto (*NcoI-XhoI*). El inserto liberado fue purificado desde el gel de agarosa. Una vez estimada la concentración de DNA, fue ligado al vector de expresión pJS21FR, que río abajo del sitio *XhoI* tiene codificado una secuencia de histidinas que permitirá la posterior purificación del producto génico del gen *fur*. La mezcla de ligación fue transformada en células quimiocompetentes de *E. coli* DH5- α . Las células transformadas y sus respectivos controles de ligación fueron propagados en placas nuevas de LB-ampicilina. Los clones fueron seleccionados por α -complementación del gen *lacZ* ("screening" blanco/azul), donde a diferencia de la selección hecha desde el vector de clonamiento, ésta vez fueron seleccionadas las colonias azules, dado que la construcción del vector permite la producción de la enzima β -galactosidasa si está clonado en orientación correcta un promotor funcional, río arriba de *lacZ*.

Finalmente los clones fueron verificados por PCR colonia empleando para ello la misma pareja de partidores ya señalada, el DNA plasmidial de dos clones seleccionados fue purificado y la integridad de su secuencia nucleotídica se verificó mediante secuenciación.

4.6 Ensayo de funcionalidad de la proteína recombinante Fur de *S. flexneri*.

Se evaluó la funcionalidad de la proteína Fur codificada en las construcciones hechas en 4.6, a través de un ensayo cualitativo desarrollado en medio agar-MacConkey. Para ello se empleó la cepa H1780, que es mutante por delección para *fur* y que posee una fusión transcripcional del promotor del gen *fiu* (que es reconocido por Fur) con *lacZ*. Entonces, la cepa de *E. coli* fue transformada con el vector *pfur* en búsqueda de un fenotipo lactosa negativo, o colonias blancas, lo que indicaría que la proteína Fur sintetizada es capaz de reconocer el promotor del gen *fiu* y por lo tanto funcional.

Bacterias electrocompetentes de la cepa de *E. coli* H1780 fueron transformadas con el vector recombinante (experimental y control) se aislaron sobre medio MacConkey sólido en dos condiciones, una condición fue suplementada con hierro 40 μM y la otra condición, sin hierro. Las placas fueron incubadas durante la noche a 37°C, y observadas al día siguiente en búsqueda de detectar cambios en la actividad β -galactosidasa.

4.7 Clonamiento de los genes blanco de *S. flexneri*.

4.7.1 Clonamiento en el vector pTZ54R/T.

La región promotora de *icsA* y *rnaG* de *S. flexneri* fue amplificada mediante PCR desde el DNA plasmidial de la cepa de trabajo *S. flexneri* 2457T, mientras que desde el DNA genómico fueron amplificados los promotores de los genes *sitA* y *dksA* empleando las parejas de partidores pIcsAF/pIcsAR, pRnaGF/pRnaGR, pSitAlz-f/pSitAlz-r y PromdksAF/PromdksARST respectivamente (**Tabla 2**).

En ambos partidores, directo y reverso se incluyeron sitios reconocidos por las endonucleasas de restricción *Bam*HI en el extremo 5' y *Hind*III en el extremo 3'. El producto de PCR fue luego purificado a partir del gel de agarosa y ligado en una razón molar de 5:1 al vector de clonamiento comercial pTZ57R/T, utilizando para ello la enzima T4 DNA ligasa (Fermentas®), la mezcla de ligación fue incubada a 4°C durante 16 h. El vector pTZ57R/T posee alfa complementación del gen *lacZ*, lo que permite detectar la presencia del inserto en el vector. En caso de una ligación exitosa, no se producirá el fragmento de β -galactosidasa que aporta el vector, y la cepa transformante no tendrá la capacidad de hidrolizar el sustrato agregado para detección, por ejemplo X-gal (ver más adelante).

Células quimiocompetentes de *E. coli* DH5- α , fueron transformadas con la mezcla de ligación y sembradas en placas LB- ampicilina-X-Gal (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Las colonias transformantes crecidas luego de 16 h fueron seleccionadas mediante α -complementación del gen *lacZ* en DH5- α ("screening" blanco/azul) y aisladas en placas nuevas de LB-ampicilina. Mediante PCR de colonia utilizando los partidores universales T7pro y M13F (**Tabla 2**) se confirmó la presencia del inserto. Posteriormente se aisló el DNA plasmidial utilizando el Kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen® para luego ser secuenciados con el fin de confirmar la presencia del inserto y descartar posibles mutaciones que se hayan generado a lo largo del proceso de clonamiento. Los fragmentos aquí generados fueron clonados en el vector de expresión

pJS21FR, a la vez que se usaron también como sonda en los ensayos EMSA.

Tabla 2.- Oligonucleótidos empleados.

Oligonucleótidos	Secuencia 5' a 3'	Descripción.
pIcsAF	<u>GGATCC</u> AAATGGAATGTTATTCTTCTC	Amplifica región promotora de <i>icsA</i> desde -320 hasta +15. Subrayado sitio <i>Bam</i> HI en 5'.
pIcsAR	<u>AAGCTT</u> ATATATCAATGCAACGGGAG	Amplifica región promotora de <i>icsA</i> desde -320 hasta +15. Subrayado sitio <i>Hind</i> III en 5'
pRnaGF	<u>GGATCC</u> GGGTTGGAAGAAGTTATATA	Amplifica región promotora de <i>rnaG</i> desde -311 hasta +20. Subrayado sitio <i>Bam</i> HI en 5'
pRnaGR	<u>AAGCTT</u> TTTCAGGGGTTTATCAACCAC	Amplifica región promotora de <i>rnaG</i> desde -311 hasta +20. Subrayado sitio <i>Hind</i> III en 5'
PromdksAF	<u>GGATCC</u> AAGCGAAGTAAAATACGG	Amplifica gen <i>dksA</i> desde -506 hasta +527. Subrayado sitio <i>Bam</i> HI en 5'
PromdksARST	<u>AAGCTT</u> GTGATGGAACGGCTGTAAT	Amplifica gen <i>dksA</i> desde -506 hasta +527. Subrayado sitio <i>Hind</i> III en 5'
pSitAlz-f	<u>AAGGATCC</u> GGGCAAAAATCACAATA	Amplifica gen <i>sitA</i> , desde -281 hasta +216. Subrayado sitio <i>Bam</i> HI en 5'
pSitAlz-r	<u>CCAAGCTT</u> GGTTATGGATGAGACTT	Amplifica gen <i>sitA</i> , desde -281 hasta +216. Subrayado sitio <i>Hind</i> III en 5'
SFFurR1	<u>CCATGGCT</u> GATAACAATACCGCCCTAA	Amplifica gen <i>fur</i> desde el ATG. Subrayado sitio <i>Nco</i> I en 5'
SFFurR2	<u>CTCGAGT</u> TTGCCTTCGTGCGGTGCTC	Amplifica gen <i>fur</i> sin codón de término. Subrayado sitio <i>Xho</i> I en 5'
M13 F	GTAAAACGACGGCCAGT	En pTZ57RT, amplifica segmentos clonados río abajo del único sitio de clonamiento. En pJS21FR, amplifica segmentos clonados río arriba del sitio de restricción <i>Hind</i> III

Oligonucleótidos	Secuencia 5' a 3'	Descripción.
T7 pro	TAATACGACTCACTATAGGG	Partidor de pTZ57RT, amplifica segmentos clonados río arriba del único sitio de clonamiento.
T7 ter	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Partidor pJS21FR, amplifica segmentos clonados río abajo del sitio de restricción <i>XhoI</i> .

4.7.2 Clonamiento en el vector de expresión pJS21FR.

Se purificaron los plásmidos recombinantes empleados en el ensayo FURTA: pTZ-PICSA, pTZ- PRNAG, pTZ-SITA y pTZ-*pdksA*. Mediante digestión con las enzimas de restricción *BamHI/HindIII* se liberó el inserto que contiene las regiones promotoras de *icsA*, *rnaG* y los respectivos controles. Posteriormente, el inserto fue ligado a pJS21FR en el sitio de clonamiento contiguo a *lacZ* (**Figura 5**). De esta manera se obtuvieron los nuevos plásmidos recombinantes pJS-PICSA y pJS- PRNAG.

El vector de expresión pJS21FR tiene un segundo sitio de clonamiento que a su vez contiene los sitios de restricción *NcoI/XhoI* contiguos al promotor TRC, derivado del promotor *tac*, que es inducible por IPTG (*Aman y cols., 1983*). Es en este sitio donde se clonó el gen *fur*, quedando su expresión bajo el control del promotor fuerte TRC.

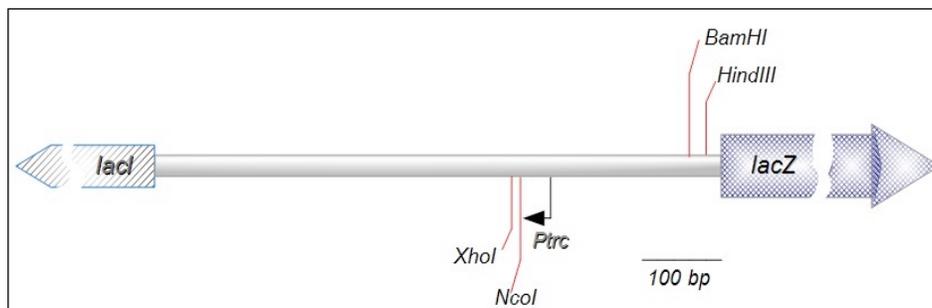


Figura 5: Representación esquemática de la región que contiene los dos sitios de policlonamiento del plásmido pJS21FR. Las regiones promotoras experimentales fueron clonadas en orientación divergente a la que presenta el promotor de TRC (marcado por flecha negra en ángulo recto).

4.8 Determinación de la actividad β -galactosidasa de la regiones promotoras de *icsA* y *rnaG* de *S. flexneri*.

Los vectores recombinantes: pJS-PICSA, pJS-PRNAG, pJS-SITA, pJS-DKSA, sumados a aquéllos que además portaban el gen *fur* y el vector *pfur* (que no posee un promotor río arriba de *lacZ*) fueron transformados en la cepa electrocompetente de *E. coli* QC1732, mutante por delección para *fur*. Ello con el propósito de establecer el efecto de Fur de *Shigella flexneri* sobre actividad transcripcional de las regiones promotoras estudiadas. Para ello se realizó la determinación de actividad β -galactosidasa utilizando el protocolo descrito por Miller (1972). Los pre-inóculos correspondientes a cada cepa en las condiciones experimentales requeridas, fueron cultivados toda la noche en 3ml de LB-ampicilina-kanamicina. Posteriormente se cultivó el inóculo al 1% medio LB-ampicilina, hasta una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0,2, en ese momento se indujo el cultivo con IPTG 1mM y se separó éste en dos fracciones iguales, donde una fue suplementada con hierro (40 μ M), y la otra con quelante de hierro 2,2'-dipiridil (250 μ M). Una vez que el cultivo alcanzó una DO₆₀₀ aproximada de 0,7 se detuvo el crecimiento y se registró precisamente la DO₆₀₀. A partir de éste momento el ensayo prosiguió como se describe en el protocolo de Miller (1972). Finalmente con los datos de DO₆₀₀ obtenidos al inicio y los de DO₄₂₀ y DO₅₅₀ registrados una vez finalizada la reacción de β -galactosidasa se determinó la actividad en unidades Miller según la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad (Unidades Miller)} = \frac{(\text{DO}_{420\text{nm}} - 1,75 \times \text{DO}_{550\text{nm}}) \times 1000}{\text{Volumen (ml)} \times \text{Tiempo (min)} \times \text{DO}_{600\text{nm}}}$$

4.9 Ensayo de titulación de Fur, FURTA cualitativo.

La cepa electrocompetente de *E. coli* H1717 se transformó con los plásmidos recombinantes que portan la secuencia de interés y clonada en el vector multicopia pTZ57RT y se procedió a evaluar el ensayo de titulación de Fur (FURTA). Para el ensayo FURTA, dos clones portadores de pTZ-*picsA*, dos portadores de pTZ-*prnaG* y dos de cada condición control: portadores de pTZ-*sitA* y pTZ-*pdksA* respectivamente, fueron sembrados en dos

condiciones: en la primera condición el medio fue suplementado con hierro 40 μM , en la segunda condición el medio fue suplementado con el quelante de hierro (2,2'-dipiridil 250 μM). El experimento se realizó por duplicado y las placas fueron incubadas 16 hrs durante la noche a 37°C para su observación.

4.10 Ensayo de retardo en la corrida electroforética de DNA, EMSA.

4.10.1 Generación de las sondas de DNA y Purificación de la proteína Fur.

Para realizar el ensayo EMSA, mediante PCR se generaron las sondas de DNA requeridas. Como DNA templado se emplearon los plásmidos recombinantes :pTZ-PICSA y pTZ-PRNAGpTZ usando los partidores pIcsAF/pIcsAR y pRnaGF/pRnaGR obteniéndose amplificados de 347 y 342 pb respectivamente. Del mismo modo se obtuvo el fragmento de la región promotora de *sitA* y *dkxA*

Para purificar la proteína Fur se realizó el siguiente procedimiento: Se cultivó un pre-inóculo en LB-ampicilina del clon recombinante que lleva clonado el gen que codifica para la proteína Fur fusionada a una secuencia diana de seis histidinas en el carboxilo terminal. Posteriormente las bacterias fueron inoculadas al 1% en 200 ml de LB-ampicilina y cultivadas hasta una DO_{600} de 0,4-0,6. En ese momento se indujo la expresión del gen mediante la adición al cultivo de IPTG 1mM, se continuó el crecimiento por tres horas más. A continuación, el total de cultivo se concentró por centrifugación a 4°C, siendo el pellet lavado 2 veces con PBS 1X.

Posteriormente el sedimento bacteriano se suspendió con solución amortiguadora de lisis y PMSF 1mM. Se agregó lisozima 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e incubó en hielo por 60 min. Seguidamente se sonicó en hielo 5 veces durante 30 segundos. Se centrifugó a 3420 g a 4°C durante 45 min. Para retirar las trazas celulares, el volumen total fue filtrado por filtros Millipore® 0,25 μm e incubado a 4°C.

La resina de cobalto TALON™ (Clontech) fue pre-equilibrada para remover la solución de almacenamiento del producto. Posteriormente se agregó el filtrado proteico, quedando la mezcla resina-filtrado en incubación por 60 min a 4°C y agitación suave. Se preparó la columna y se procedió a lavar con: solución de lavado I (Tris 50mM pH 8,0, NaCl 500mM, Imidazol 25 mM, glicerol 10%), y luego la solución de lavado II (Tris 50mM pH 8,0,

NaCl 150mM, Imidazol 50 mM, glicerol 10%). Finalmente se eluyó desde la columna con solución de elución (Tris 50mM pH 8,0, NaCl 150mM, Imidazol 500 mM, glicerol 10%). Se guardaron alícuotas de cada etapa de purificación para observarlas en un gel SDS-PAGE.

Aquellas fracciones donde se encontró la proteína purificada en mayor concentración fueron reunidas y concentradas mediante proceso de diálisis en frío. Las muestra de elución concentrada se almacena a -20°C en solución de almacenamiento (glicerol 50%, Tris 50 mM pH 8 y NaCl 150 mM).

4.10.2 Protocolo de EMSA en gel de poliacrilamida.

En tubos de PCR de 200 µl se colocaron en el siguiente orden: agua, tampón unión 1x (Tris 40 mM pH 6,5, MgCl₂ 8 mM, KCl 50 mM, DTT 1 mM, NP40 0,05%, BSA 0,1 mg. Cuando fue requerido, como cofactor de Fur se adicionó MnCl₂ 100 mM), 30 ng de la sonda, poly(dI•dC) 0,8 ng/µl y la proteína Fur en cantidades de 200, 500 y 700 ng). La incubación se realizó por 20 min a temperatura ambiente. Al momento de cargar en el gel se adicionó 1 µl de solución amortiguadora de carga . La corrida se realizó en el tampón Tris-Borato-EDTA(Merck)(1X) a 70mV durante 2 h 20 min y el gel se tiñó con bromuro de etidio.

5. Resultados:

Objetivo 1: Determinar si Fur actúa como regulador positivo o negativo de *icsA* y/o *rnaG*.

Actividad 1.1: Generación vectores recombinantes que porten la región promotora de *icsA* y *rnaG*.

5.1 Clonamiento del gen *fur* y determinación de la funcionalidad de la proteína Fur recombinante con terminación de histidinas en el carboxilo terminal.

Como se se mencionó en el punto 4.5, el gen *fur* de *S. flexneri*, fue amplificado desde el DNA genómico por PCR usando el par de partidores SFFurF y SFFurR2. Con el fin de establecer si la proteína Fur con terminación de histidina, codificada en el vector *pfur* es funcional, se desarrollaron ensayos de funcionalidad. Para ello se empleó la actividad β -galactosidasa como reportero de la actividad del gen *fur*, mediante fusiones transcripcionales. Con este fin se utilizó la cepa reportera de *E. coli* H1780 (Hantke, 1987), la que presenta una mutación por delección del gen *fur* y en su cromosoma posee la fusión transcripcional de *lacZ* con el promotor del gen *fiu*, que es regulado negativamente por Fur. El gen *fiu* codifica para una proteína de membrana externa involucrada en la captación de ion férrico (Schaffer y cols., 1985).

En este ensayo cualitativo se observó que la cepa de *E. coli* H1780 transformada con el vector *pfur* (C2 y C3) presenta un fenotipo lactosa negativo dado que la proteína Fur recombinante reconoció el promotor del gen *fiu* (Figura 9).

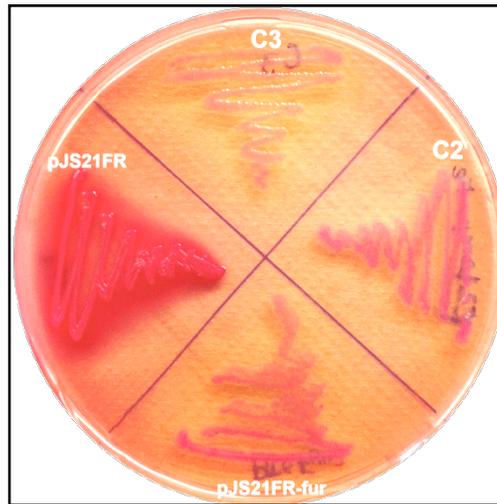


Figura 9: Ensayo de funcionalidad de la proteína Fur recombinante. Una placa de agar MacConkey fue dividida en cuatro secciones. Dentro de cada sección fue sembrada una condición experimental. La sección marcada **pJS21FR-fur** corresponde al vector que codifica para la proteína Fur nativa. Esta corresponde al control positivo donde se observó el crecimiento de colonias claras, dado que Fur bloqueó la transcripción de *lacZ*, a través de la unión a la región promotora de *fliu*. La sección marcada **pJS21FR** corresponde al clon portador del vector vacío, por tanto carece del gen *fur*. En esta condición no se observó represión sobre la región promotora de *fliu*, permitiendo por tanto la transcripción de *lacZ*, obteniéndose colonias rojas. Por último las secciones denominadas **C2** y **C3** corresponden a dos aislados transformados con el vector pJS21FR portador de la proteína Fur experimental, en ambos se verificó un fenotipo lactosa negativo, similar al control positivo, por lo que la proteína recombinante producida era funcional.

5.2 Clonamiento de las regiones promotoras de *icsA* y *rnaG* de *S. flexneri*.

Con el objetivo de analizar el efecto de Fur sobre la transcripción de los genes *icsA* y *rnaG*, se utilizó la estrategia de fusiones transcripcionales, la cual consiste en fusionar el promotor del gen de interés a un gen reportero sin promotor. Para esto se construyeron plásmidos recombinantes con los promotores en estudio en el vector de clonamiento pTZ57 R/T.

Desde la cepa de referencia de *Shigella flexneri* 2457T se amplificó la región promotora de los genes *icsA* (desde -320 hasta +15) y *rnaG* (desde +100 hasta +430, en relación al sitio +1 de *icsA*) usando los pares de primarios: pIcsAF/pIcsAR y pRnaGF/pRnaGR respectivamente (**Tablas 2 y 3** respectivamente). Con el fin de clonar

directamente el fragmento de PCR de *icsA* y *rnaG* se empleó como vector de clonamiento el plásmido pTZ57R/T, que presenta un alto número de copia (y que además fue empleado en los ensayos de titulación de Fur).

El clonamiento en pTZ57R/T fue comprobado mediante amplificación, utilizando los pares de partidores M13F y T7pro, que alinean con los flancos del sitio de clonamiento del vector. De este modo se logró obtener clones recombinantes que poseen cada región promotora. Los clones además fueron confirmados mediante secuenciación. De este modo se obtuvieron los plásmidos experimentales pTZ-PICSA y pTZ-PRNAG. De manera análoga se obtuvieron pTZ-PSITA y pTZ-PDKSA, que son portadores de la región promotora de *sitA* y *dksA*, que serán empleados como control positivo y negativo respectivamente.

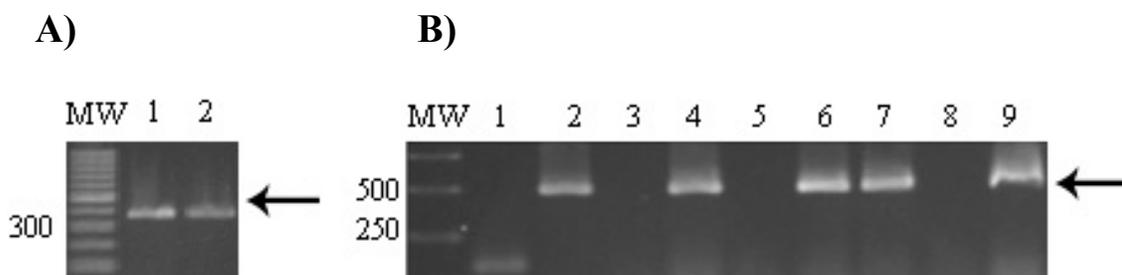


Figura 6: Obtención y análisis de clones recombinantes de cada región promotora en pTZ57R/T. Electroforesis en geles de agarosa al 1,2% (p/v) de la reacción de PCR. **A)** PCR de la región promotora de *icsA* (línea 1) y *rnaG* (línea 2) realizada desde DNA plasmidial de *S. flexneri* 2457T. La flecha señala el amplificado obtenido, que coincide con el esperado de 330 pb. **B)** PCR colonia, de aislados transformados con el plásmido multicopia pTZ54R/T, realizada con los partidores del vector de clonamiento M13F y T7pro, los que son externos al inserto. En la fotografía se observan los clones correspondientes al amplificado de *icsA* (líneas 2-5) y el amplificado de *rnaG* (líneas 6-9), como control se incluyó el plásmido vacío, línea 1. La flecha indica el producto obtenido que coincide con el esperado de 470 pb. MW: marcador de tamaño: a) 100 pb b) (1kb), se indican los tamaños del marcador.

Actividad 1.2: Generación de la fusión transcripcional de la región promotora de *icsA* y *rnaG* respectivamente y medición de la actividad transcripcional de estas regiones promotoras en presencia y ausencia de Fur, mediante fusiones transcripcionales.

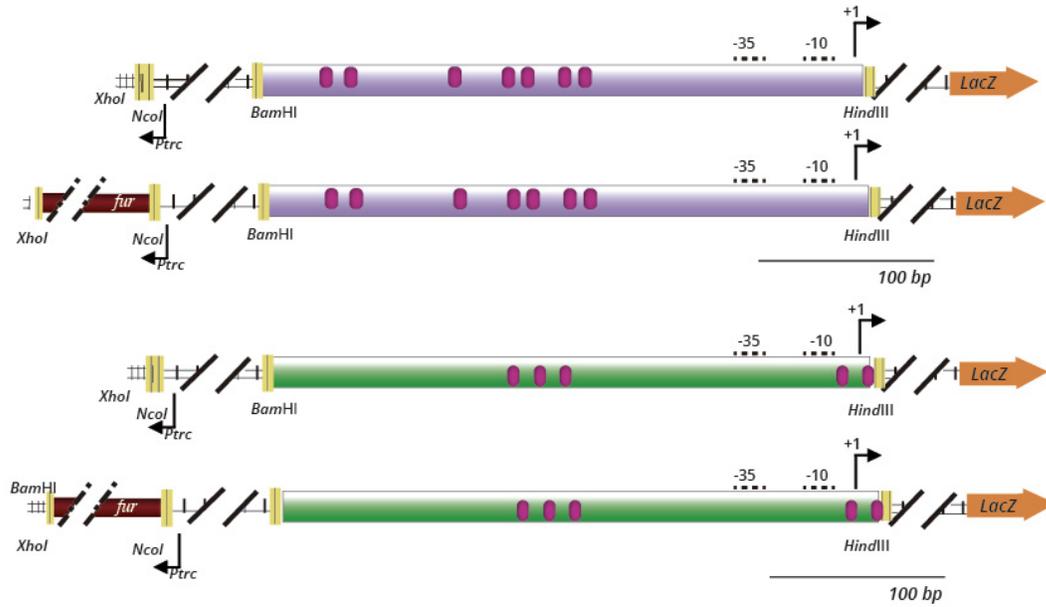
5.3 Generación de la fusión transcripcional de la región promotora de *icsA* y *rnaG* con *lacZ* respectivamente.

Desde los clones seleccionados en el punto anterior, se purificó el plásmido recombinante y liberó el fragmento de DNA correspondiente a la región promotora de cada gen mediante digestión con las endonucleasas *Bam*HI y *Hind*III para aislar este fragmento, lo que permitió realizar las fusiones transcripcionales empleadas.

Con el fin de cuantificar el efecto de Fur sobre la actividad transcripcional de *icsA* y *rnaG* se construyeron vectores recombinantes derivados del vector de expresión pJS21FR. El clonamiento de la región promotora de *icsA* y *rnaG* en dicho vector se dispuso en una fusión transcripcional con *lacZ*, de este modo se midió la actividad transcripcional de las regiones de interés mediante la determinación de la actividad β -galactosidasa.

Para obtener los insertos con los que se generaron los vectores recombinantes, el DNA plasmidial de los clones previamente seleccionados de pTZ-PICSA y pTZ-PRNAG fue purificado y digerido con las endonucleasas de restricción *Bam*HI/*Hind*III, que flanquean el inserto. Este segmento de DNA fue purificado y ligado a los vectores de expresión pJS21FR y *pfur*. El vector *pfur* porta entre los sitios *Xho*I y *Nco*I la secuencia que codifica para la proteína Fur de *S. flexneri* con una secuencia de histidinas en el carboxilo terminal. La transcripción del gen *fur* en este sistema está bajo el control del promotor inducible por IPTG, TRC. En tanto, en orientación divergente están las respectivas secuencias de la región promotora de *icsA* y *rnaG* dispuestas en una fusión transcripcional con el gen reportero *lacZ*, como puede observarse en la **figura 5**. De este modo se obtuvieron los vectores recombinantes sin *fur*: pJS-PICSA y pJS-PRNAG, y los vectores con el gen *fur*: *pfur*-PICSA y *pfur*-PRNAG. Bajo el mismo procedimiento fueron construidas las condiciones de: control positivo pJS-PSITA, *pfur*-PSITA y las de control negativo: pJS-PDKSA, *pfur*-PDKSA.

A)



B)

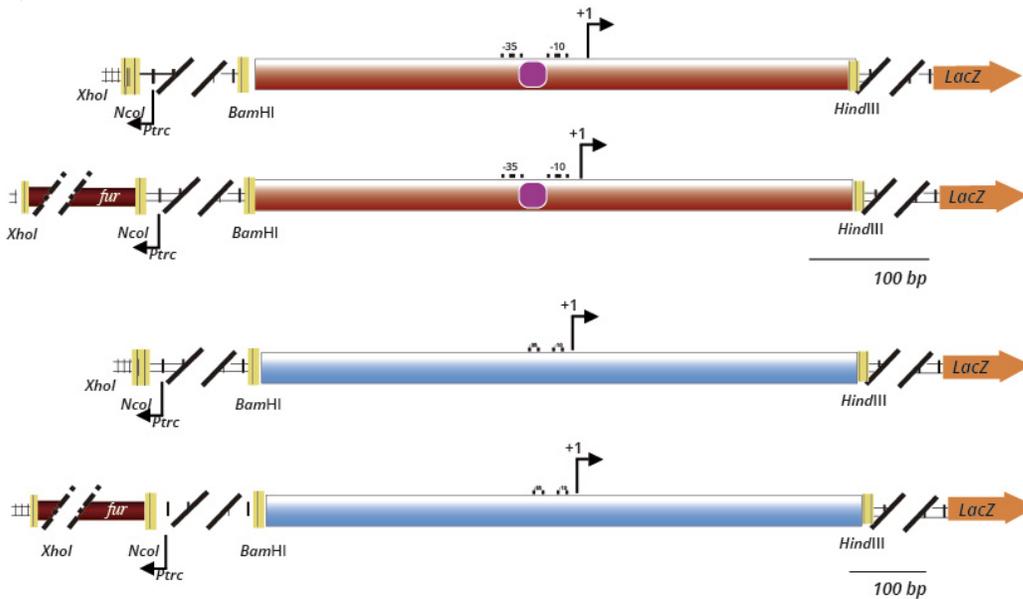


Figura 7: Representación esquemática de las construcciones obtenidas en vector de expresión pJS21FR. A) Esquema de los constructos experimentales pJS-PICSA (púrpura) y pJS-PRNAG (verde) en ausencia y presencia de *fur* respectivamente. **B)** Esquema de los constructos controles pJS-PSITA (rojo) y pJS-PDKSA (celeste) también en ausencia y presencia de Fur. Los óvalos púrpura en A) y B) señalan cajas fur detectadas manual y bioinformáticamente. Las flechas en ángulo recto sobre la hebra codificante señalan el punto de inicio de la transcripción. Mientras que las que están en la hebra complementaria señalan la ubicación del promotor TRC.

Los clones fueron confirmados por PCR, empleando para ello los partidores del plásmido, externos al inserto, T7ter/M13F (**Tabla 2**). De este modo, se seleccionaron vectores que poseían el segmento de interés, los que posteriormente fueron verificados con digestión con las endonucleasas de restricción *HindIII/XhoI* (**Figura 8**) y nuevamente verificados, esta vez a través de una reacción de PCR con partidores externos e internos al inserto (**Figura 8**).

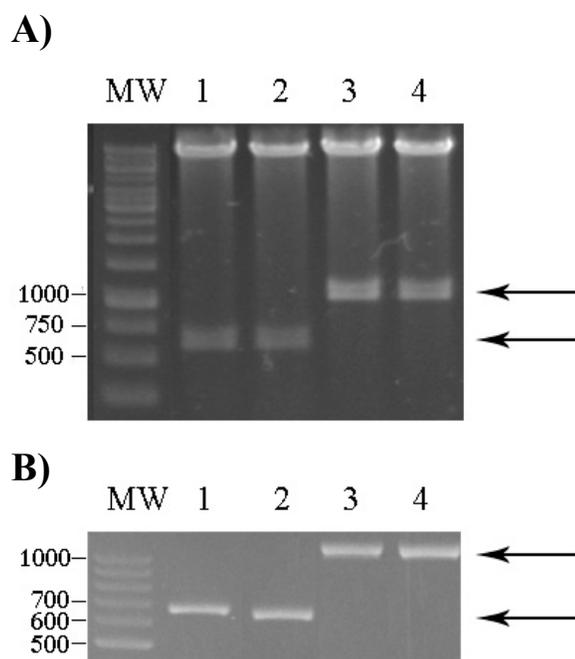


Figura 8: Análisis de clones recombinantes de cada región promotora en pJS21FR. **A)** Digestión con las endonucleasas de restricción *HindIII/XhoI*. Líneas 1 a 4 corresponden a los vectores pJS-PICSA, pJS- PRNAG, *pfur*-PICSA y *pfur*-PRNAG, respectivamente. Para los clones sin *fur* se liberó un fragmento cercano al esperado, de 563 pb (flecha inferior). Mientras que para los clones portadores de *fur* se liberó un fragmento cercano al esperado, de 995 pb (flecha superior) **B)** PCR colonia realizado con el partidore externo al inserto (T7 ter) y los respectivos partidores reversos para las regiones promotoras de *icsA* y *rnaG*: PicsaR y RnaGR, respectivamente (Tabla 2). Las líneas 1 y 2 corresponden a aislados portadores de pJS-PICSA, y pJS-PRNAG. Líneas 3 y 4 corresponden a aislados portadores de *pfur*-PICSA, y *pfur*- PRNAG. Desde los aislados que no portaban el gen *fur* se obtuvo un amplificado coincidente al esperado de 660 pb. Mientras que para aquellos que portaban *fur* se amplificó un tamaño coincidente al esperado de 1 kb.

5.4 Análisis del efecto de Fur sobre la transcripción de *icsA* y *rnaG* mediante determinación de la actividad β -galactosidasa.

Completadas las etapas anteriores, los plásmidos recombinantes que poseen las fusiones transcripcionales descritas en el punto 5.2, fueron incorporados en la cepa *E. coli* Q1732, que es mutante por delección para el gen *fur* y mutante para el gen *lacZ* (**Tabla 1**).

El ensayo de β -galactosidasa se realizó siguiendo el protocolo de Miller (1972), donde la actividad transcripcional se midió en presencia de: quelante de hierro 2'-2' dipiridil o hierro.

Para la región promotora de *sitA*, control positivo del ensayo, se observó que al estar Fur activo, se presentó una disminución significativa de actividad β -galactosidasa. Lo anterior es consistente con lo reportado en la literatura, dado que *sitA* posee una secuencia de DNA que es reconocida por Fur, evitando de este modo la posibilidad de transcripción de *lacZ* en el sistema estudiado. Se observa además que al estar Fur inactivo aun así existe represión, ya que se observa una disminución en la actividad enzimática. Dicha disminución es estadísticamente inferior a la de la proteína activa.

En tanto, para el control positivo *dksA* se presentó una disminución de 28,7 % que si bien es notablemente menor que la observada para la región promotora de *sitA* (97,1%), aun así es estadísticamente significativa, lo que no era esperado. En experiencias previas del laboratorio, utilizando la cepa de *E.coli* H1717 se observó que el promotor de *dksA* no fue capaz de secuestrar la proteína Fur nativa de la bacteria, manteniéndose la represión de *lacZ*, obteniéndose un fenotipo FURTA negativo (datos no mostrados).

En cuanto a las condiciones experimentales, se observó para el clon portador de pJS-PICSA, que la actividad transcripcional de *lacZ* disminuyó en un 18,7 % al incluir *fur* en el constructo (*pfur*-PICSA), en presencia de hierro. Mientras que en el caso de *rnaG* no se presentó diferencia significativa entre pJS-PRNAG y *pfur*-PRNAG. Lo que es sugerente de un rol represor de Fur activo sobre el promotor del gen *icsA*, en tanto que el regulador transcripcional no tiene efecto en *rnaG* (**Figura 10**).

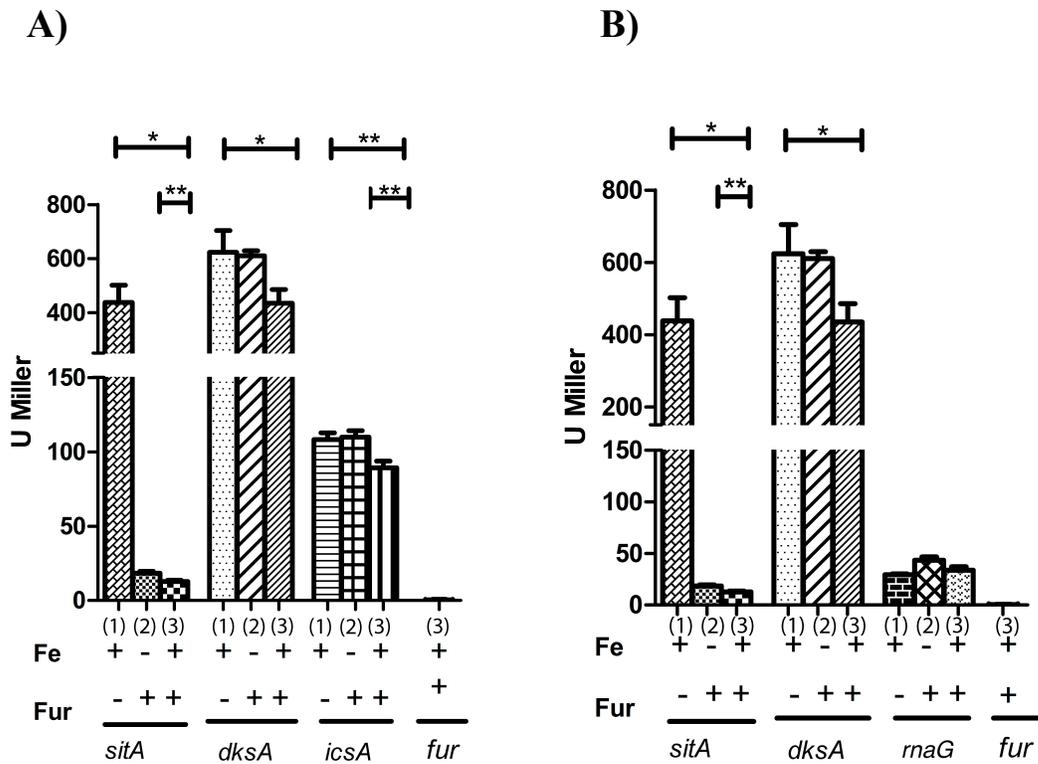


Figura 10: Determinación de la actividad β -galactosidasa de las fusiones transcripciones **A)** PICSA::lacZ y **B)** PRNAG::lacZ en tres condiciones señaladas en cada uno, de izquierda a derecha: (1) ausencia del gen *fur* en el constructo y en presencia de hierro, (2) presencia de *fur* y ausencia de hierro y (3) presencia de *fur* y presencia de hierro. Adicionalmente en cada gráfico se presentan los controles: positivo, *sitA* y negativo, *dksA*. Cada columna corresponde a tres experimentos realizados en triplicado cada uno.

Objetivo 2: Establecer que Fur se une a la región promotora de *icsA* y/o *rnaG*.

Actividad 2.1: Evaluación de la funcionalidad de cajas fur mediante ensayo de titulación de Fur, FURTA.

5.5 Detección de cajas fur funcionales a través del ensayo FURTA cualitativo.

Con el fin de evaluar la funcionalidad de las cajas fur hipotéticas reconocidas bioinformáticamente, se empleó la cepa reportera de *E. coli* H1717 (Hantke, 1987) la cual presenta a nivel cromosomal la fusión transcripcional entre el promotor del gen *fhuF* (que codifica para la reductasa de ion férrico) y el gen reportero *lacZ*. Por tanto, en esta cepa reportera sin transformar o transformada con un segmento de DNA que no posee secuencias

reconocibles por Fur (cajas fur), no se observa actividad β -galactosidasa. En este caso Fur une al promotor de *fhuF*, reprimiendo la transcripción de *lacZ*, obteniéndose colonias blancas, o denominadas FURTA negativo. En tanto, si la cepa es transformada con un plásmido multicopia que posee secuencias de unión a Fur, el represor une a esas cajas fur, liberando la represión de *fhuF::lacZ*, generando así un fenotipo de lactosa positivo que se observa como colonias rojas, o FURTA positivo.

Los clones de *E. coli* H1717 portadores de pTZ-PICSA, pTZ-PRNAG, pTZ-PSITA y pTZ-PDKSA fueron sembrados en líneas ("streak") paralelas una de la otra, sobre dos placas de agar MacConkey, una suplementada con hierro 60 μ M, y la otra con dipiridil, 250 μ M. De este modo se generaron dos condiciones experimentales. En la primera condición, sobre la placa suplementada con dipiridil, en orientación perpendicular a las siembras realizadas, fue depositada una franja de papel filtro embebido en hierro. En la otra condición, sobre la placa suplementada con hierro fue posado una franja de papel filtro embebido en el quelante de hierro dipiridil. Por tanto, se tiene una placa de agar MacConkey suplementada con hierro 60 μ M con una franja al centro de dipiridil 20 mM. La otra placa de agar MacConkey es suplementada con dipiridil 250 μ M llevando una franja de papel filtro con hierro 10 mM.

En aquella condición en que las bacterias estuvieron en presencia de una mayor concentración de hierro se observó que los clones de pTZ-PICSA (**Tabla 3**) presentaron una coloración rojiza hasta la cercanía del papel filtro embebido, lo que indica que esta secuencia es reconocida por Fur. Mientras que las colonias sembradas con clones que contienen pTZ-PRNAG presentaron una coloración más clara en la cercanía de la franja embebida con hierro (**Figura 5A**). En presencia del quelante de hierro, dipiridil, se observó que al alejarse de la franja de papel filtro, los clones de pTZ-PICSA presentaron una coloración rosácea más extendida que la de pTZ-RNAG (**Figura 5B**), lo que indica que al ir aumentando la concentración de hierro, Fur es secuestrado por de manera más eficiente por pTZ-PICSA, que pTZ-RNAG.

Puede observarse en tanto que el control positivo pTZ-PSITA, presenta una coloración rojiza constante dado que permanentemente está secuestrando el Fur cromosomal (**Figura 5, A y B**)

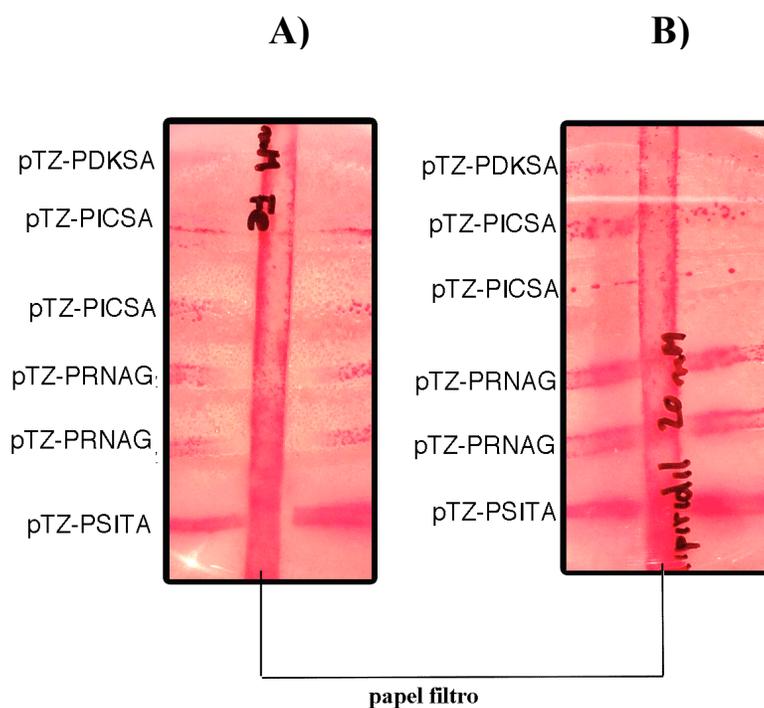


Figura 11: Ensayo FURTA cualitativo. Crecimiento de los clones de la cepa *E. coli* H1717 transformada con los plásmidos recombinantes en pTZ57R/T. A) En presencia de hierro 10 mM (franja de papel filtro al centro) los clones portadores de pTZ-PICSA presentan una tonalidad rosácea, en relación a los de pTZ-PRNAG que es más traslúcida. **B)** En presencia de 20 mM de 2⁺-2⁺ dipiridil todas las colonias presentan color rojo al estar Fur inactivo, sin hierro. De arriba hacia abajo en la fotografía están clones portadores de: pTZ-PDKSA (control negativo), dos clones de pTZ-PICSA dos de pTZ-PRNAG y pTZ-PICSA (control positivo). Los transformantes fueron sembrados en agar McConkey suplementado con 1g/l lactosa y crecidos 16h a 37°C.

Tabla 3.- Vectores de clonamiento y expresión utilizados.

Vector	Descripción	Origen
pTZ57R/T	Vector de clonamiento. Amp ^R .	Fermentas
pTZ-picsA	<i>icsA</i> desde -320 hasta +15 clonado en vector pTZ57RT. Se empleó en el ensayo FURTA.	Este trabajo.
pTZ-prnAG	<i>rnaG</i> desde -311 hasta +20 clonado en vector pTZ57RT. Se empleó en el ensayo FURTA.	Este trabajo.
pTZ-psitA	<i>sitA</i> , desde -281 hasta +216 clonado en vector pTZ57RT. Se empleó en el ensayo FURTA.	Este trabajo.

Vector	Descripción	Origen
pTZ-pdksA	<i>dksA</i> desde -512 hasta +533 clonado en vector pTZ57RT. Se empleó en el ensayo FURTA.	Laboratorio.
pJS21FR	Vector de fusión transcripcional derivado de pBR322 Amp ^R .	Laboratorio
picsA	Promotor del gen <i>icsA</i> (desde -320 hasta +15):: <i>lacZ</i> en vector pJS21FR	Este trabajo.
pfur-picsA	Derivado de <i>picsA</i> .Donde el vector pJS21FR lleva además clonado el gen <i>fur</i> de <i>S. flexneri</i> bajo el control del promotor TRC.	Este trabajo.
prnaG	Promotor del gen <i>rnaG</i> (desde -311 hasta +20):: <i>lacZ</i> en vector pJS21FR.	Este trabajo.
pfur-prnaG	Derivado de <i>prnaG</i> .Donde el vector pJS21FR lleva además clonado el gen <i>fur</i> de <i>S. flexneri</i> bajo el control del promotor TRC.	Este trabajo.
psitA	Promotor del gen <i>sitA</i> (desde -281 hasta +216):: <i>lacZ</i> en vector pJS21FR	Este trabajo.
pfur-psitA	Derivado de <i>psitA</i> .Donde el vector pJS21FR lleva además clonado el gen <i>fur</i> de <i>S. flexneri</i> bajo el control del promotor TRC.	Este trabajo.
pdksA	Promotor y gen <i>dksA</i> (desde -512 hasta +533):: <i>lacZ</i> en vector pJS21FR	Este trabajo.
pfur-dksA	Derivado de <i>pdksA</i> .Donde el vector pJS21FR lleva además clonado el gen <i>fur</i> de <i>S. flexneri</i> bajo el control del promotor TRC.	Este trabajo.
pfur	Vector pJS21FR, con el gen <i>fur</i> de <i>S. flexneri</i> clonado bajo el control del promotor TRC, se sintetiza una proteína con una secuencia de histidinas en su C-terminal.	Este trabajo

5.6 Unión de Fur de *S. flexneri* a las regiones promotora de *icsA* y *rnaG*.

Con el fin de verificar que Fur es capaz de unir directamente la región promotora de *icsA* y *rnaG* se desarrollaron los ensayos de retardo en la migración electroforética de DNA, EMSA. Para ello se purificó la proteína Fur producida a partir del cultivo de un clon de *E. coli* QC1732 transformada con el plásmido *pfur*. En paralelo se generaron por PCR sondas de la región promotora de *icsA* y *rnaG* empleando los mismos pares de partidores que se usaron en los clonamientos (**Tabla 2**), obteniéndose un amplificado de 347 y 342 pb respectivamente. Estos Se observa que la sola activación de Fur con manganeso provoca retardo en la corrida electroforética, lo que resulta notorio sobre todo para el promotor de *icsA* (**Figura 12A**). En tanto para el promotor de *rnaG* presenta un retardo menor (**Figura 12A**). La sonda de *sitA* (**Figura 12B**), el control positivo, presenta un notorio retardo al estar Fur activado por manganeso, el que contrasta con lo visto para el regulador sin manganeso, cuando éste se encuentra inactivo. En tanto llama la atención que el promotor de *dksA* presente un leve retardo, sin embargo, ello es concordante a lo observado en el ensayo de β -galactosidasa donde Fur tiene efecto sobre la actividad transcripcional de *dksA* (**Figura 12B**).

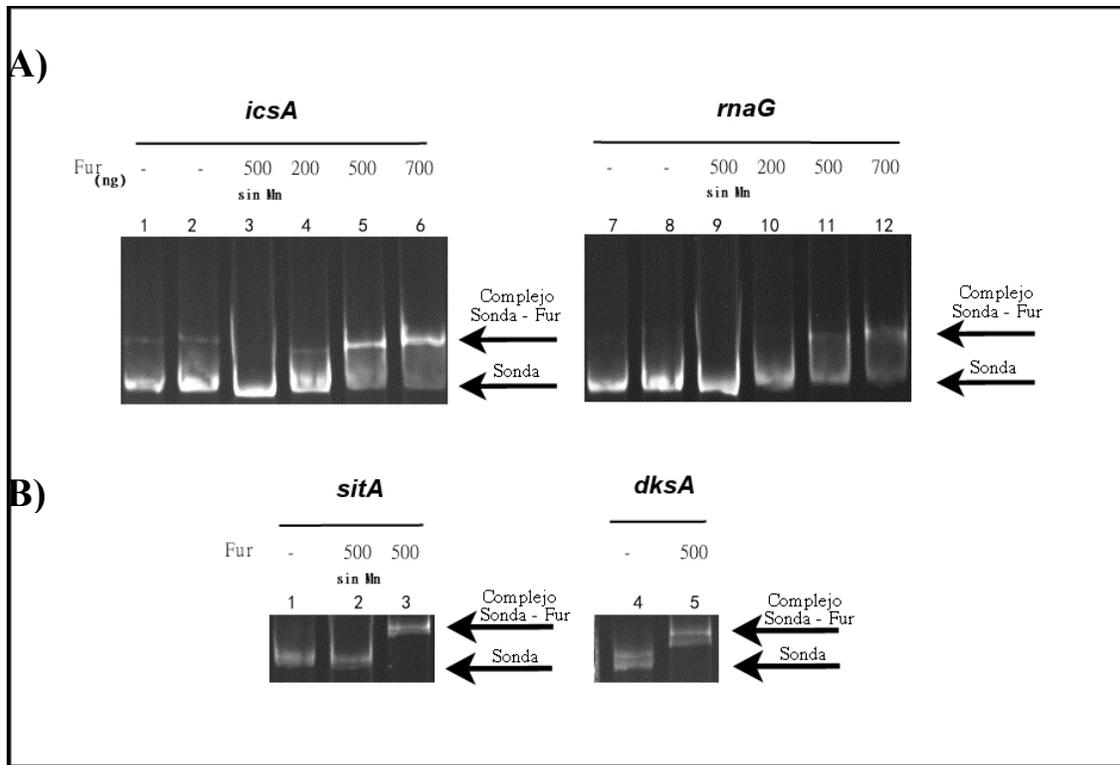


Figura 12: Ensayo de retardo en la migración electroforética de la región promotora de *icsA* y *rnaG*. **A)** Retención en la migración de la región promotora de *icsA* y *rnaG*. Líneas 4 a 6 corresponden a proteína Fur activada por Manganeso. En tanto la línea 3 corresponde a la proteína Fur inactiva, o sin Manganeso. Las líneas 1 y 2 corresponden únicamente a la sonda y la sonda solo con BSA respectivamente. **B)** Retención en la migración de las condiciones controles. Líneas 3 y 5 corresponden a proteína Fur activa interactuando con la región promotora de *sitA* y *dksA*, respectivamente. Líneas 1 y 4 corresponden a corresponden a las respectivas sondas. La línea 2, proteína Fur sin activar con *sitA*. La imagen corresponde a la mejor lograda de cuatro ensayos.

Tabla 4.- Enzimas y equipos (o kits) bioquímicos empleados.

Nombre del Equipo (kit) o reactivo empleado.	Uso
<i>High Fidelity</i> PCR Enzyme Mix Fermentas	Amplificación de segmentos de la regiones promotoras de <i>icsA</i> y <i>rnaG</i> desde el cromosoma de <i>S. flexneri</i> .
Gotaq DNA polimerase de Promega ®	Empleado en PCR colonia u otros.
SpinPrep™ Gel DNA de Invitrogen ®	Purificación de DNA desde gel de agarosa.
InsTAclone™ PCR Cloning, de Fermentas	Clonamiento de segmentos de interés en el vector pTZ57RT.
QIAprep Spin Miniprep de Qiagen ®	Purificación de DNA plasmidial.

6. Discusión

Desde hace 25 años que se explora la participación de IcsA y hierro en miras a desarrollar alternativas terapéuticas en la prevención de la shigelosis. Una estrategia empleada en el desarrollo de vacunas para combatir la infección por *Shigella* es la eliminación de factores de virulencia que posee la bacteria, como es el caso de IcsA. *Shigella* spp. al no producir esta proteína queda impedida para diseminarse (Makino y cols., 1986). Además de obtener un candidato a vacuna inactivando el gen *icsA*, también se incluyó la delección de los genes *iuc-iut* cuyos productos génicos son responsables de la síntesis del sideróforo aerobactina (Fontaine y Sansonetti, 1990, O’Ryan y cols, 2015). Los sideróforos son compuestos que son utilizados por bacterias patógenas para la captura del hierro (Braun y Hanke, 2013). De esta forma toma sentido el conocer en mayor profundidad la regulación de la expresión génica del gen *icsA*, que es lo que se pretendió abordar en esta tesis.

La expresión de *icsA* es regulada positivamente por VirF a 37°C, y negativamente por H-NS a 30°C (Tran y cols., 2011). Dicha regulación por parte de VirF se lograría gracias a que este regulador interactuaría con la región comprendida por *icsA* y *rnaG*: i) estimulando al promotor de *icsA*, ii) reduciendo el nivel intracelular de RnaG y iii) disminuyendo la frecuencia de inicio de transcripción desde el promotor de *rnaG* (Tran y cols., 2011). Cabe notar que IcsA es expuesto en toda la superficie bacteriana, pero la proteasa IcsP posibilita que IcsA se acumule en el polo antiguo donde ocurrirá ABM (Egile y cols., 1997).

Este complejo modelo de regulación al que está sujeto el factor de virulencia IcsA da lugar para explorar cómo pueden contribuir otras señales ambientales a las que es enfrentada la bacteria, como por ejemplo, la concentración de hierro. Y en ese contexto evaluar la posibilidad que el regulador global de la homeostasis del hierro, Fur, pueda regular el proceso de movilidad basada en actina actuando sobre elementos integrantes del proceso, como las regiones promotoras de *icsA* y/o *rnaG*.

Análisis bioinformáticos y manuales realizados en esta investigación en búsqueda de cajas fur sobre la región promotora de ambos genes apoyaron la propuesta de esta hipótesis (Figuras 4 y 7).

La estrategia empleada en este trabajo para pesquisar la acción de Fur sobre las regiones promotoras estudiadas fue usar fusiones transcripcionales. El ensayo FURTA cualitativo, luego de ser estandarizado variando distintas condiciones como: concentración de hierro, suplemento del medio y carga del inóculo dio un resultado sugerente de la presencia de cajas fur más conservadas en la región promotora de *icsA*, resultado que contrastó con lo observado para la región promotora de *rnaG* desde donde se obtuvo un resultado FURTA negativo, o lactosa negativo. Estos resultados sugieren que en esta última condición, la cepa reportera de *E. coli* H1717 transformada con el plásmido multicopia portador de la región promotora de *rnaG* y en presencia de hierro, el regulador transcripcional Fur presente en el citoplasma bacteriano no fue secuestrado con la misma eficiencia que en el caso de *icsA*, donde se obtuvo un fenotipo más cercano a lactosa positivo (**Figuras 11**).

Al realizar el ensayo cuantitativo para estos mismos genes, se observó un crecimiento extremadamente lento de las cepas, y cuando fue posible realizar la medición de la actividad β -galactosidasa, no se lograron obtener resultados reproducibles ni fiables ya que los controles no se comportaban como lo esperado. Una posibilidad que explique este resultado, es que las condiciones de crecimiento no hayan sido las requeridas para la cepa, sin embargo, a lo largo de las pruebas realizadas para subsanar estos resultados, se descartaron elementos como presencia de posible contaminación en el agua, o el mismo medio LB. Una alternativa que podría cooperar con el crecimiento de la cepa es suplementar el medio LB con una solución amortiguadora, dado que el pH del cultivo bacteriano cambia durante la curva de crecimiento (*Corona-Izquierdo y Membrillo-Hernández 2002*), es posible que dicha variación haya ido en perjuicio de las transformantes de *E. coli* H1717.

No obstante lo anterior, se optó por continuar realizando las fusiones transcripcionales y determinar la actividad β -galactosidasa, pero esta vez utilizando la cepa de *E. coli* QC1732, que es mutante por deleción para Fur, empleando esta vez un vector de expresión. En paralelo, y usando los mismos segmentos clonados en el vector de expresión, se realizaron los ensayos de retardo en la corrida electroforética de DNA, EMSA.

En miras a establecer que Fur regulaba el sistema estudiado, se esperaba que si la región promotora era regulada por Fur, entonces al transformar una cepa que no posee *fur*, con un vector de expresión portador de un gen *fur* funcional, este regulador iba a unir a la región

promotora en cuestión (que está clonada en el mismo vector) disminuyendo de ese modo la expresión de *lacZ*, dado que está fusionado transcripcionalmente a la región promotora estudiada.

Al respecto, para la construcción *pfur*-pICSA se observó que al estar Fur activado por hierro, entonces disminuyó significativamente la transcripción de *lacZ* (Figura 9), lo que indicaría que el regulador sí tiene efecto sobre la transcripción de *icsA*. Si a este resultado se suma la importante retención observada en la migración de *icsA* en el ensayo EMSA (79%), se configuraría un escenario en que al estar Fur activo, éste reprimiría la transcripción de *icsA*, pudiendo ocurrir esta represión a través de la unión directa del regulador a la secuencia promotora. Lo anterior coincide con experiencias realizadas en el laboratorio, donde se detectó que Fur tiene un efecto represor sobre la transcripción de *virF* (Otárola, 2012), habiéndose verificado también que este efecto puede ocurrir por unión directa del regulador a la secuencia promotora (datos no mostrados).

Los resultados observados para *rnaG* indican que Fur no tendría efecto sobre transcripción de la región promotora estudiada, como fue visto en los ensayos de actividad β -galactosidasa, donde no hubo variación significativa en las condiciones estudiadas. Del mismo modo, en los ensayos EMSA practicados, no se observó que la migración de la banda fuera retardada en la medida de lo observado para *icsA*, 79 % versus 17 % para *rnaG*.

Si bien estos resultados señalan que Fur no regula directamente a *rnaG*, está descrito que sí puede actuar sobre el ABM, dado que estando activo influenciaría positivamente a IcsP a través de la represión que ejerce sobre la transcripción del pequeño RyhB (Africa y cols., 2011).

En tanto, Tran y cols., (2011) señalan que VirF actúa negativamente sobre la producción de RnaG, evitando que este sRNA pueda interferir con el transcrito de *icsA*. Por tanto, a través de VirF, Fur regularía positivamente a *rnaG*, a través de la acción represora que tiene sobre *virF*, cuando la concentración de hierro es relativamente alta, como sería el caso del lumen colónico, o el medio ambiente, donde además *rnaG* es regulado positivamente por H-NS (Tran y cols., 2011).

En consecuencia durante la invasión, mientras la bacteria se encuentra en el citoplasma de la célula hospedera, el regulador transcripcional Fur es inactivo, fomentando la transcripción de *icsA*, primero porque no se reprime la transcripción de *icsA* e incrementaría ya que la transcripción de *virF* (el regulador positivo de *icsA*, Sakai y cols., 1988) está siendo favorecida en esas condiciones. Ello toma sentido en el contexto biológico de la bacteria, dado que es en el medio intracelular cuando IcsA actúa como iniciador del proceso de ABM, permitiendo así el desplazamiento de la bacteria desde un enterocito al siguiente.

Un elemento adicional por evaluar es cómo actuaría Fur en el medio extracelular, tanto en el lumen como en la submucosa colónica. En ambos lugares suceden dos situaciones que a primera vista no tendrían por qué estar relacionadas: la concentración de hierro es baja, y *Shigella* entra en contacto con la célula blanco.

Menard y cols., (1993) describieron que las mutantes *ΔipaB* e *ΔipaD*, eran altamente adherentes en células HeLa. Zumsteg y cols.,(2013) reportaron que este fenotipo hiperadhesivo de las cepas mutantes de *Shigella* es suprimido al inactivar el gen *icsA*, estos resultados permitieron proponer que IcsA, en el medio extracelular, posee una función de adhesina. Entonces se configura un escenario en que en el medio extracelular y a concentraciones bajas de hierro (Ni y cols., 2015), IcsA opera como adhesina. Similarmente, en el medio intracelular, donde las concentraciones de hierro también serían bajas (Runyen-Janecky y cols., 2003) Fur inactivo permitirá a IcsA funcionar como iniciador de ABM.

En relación a las condiciones controles empleadas, para el ensayo de determinación de actividad β-galactosidasa y EMSA, se empleó como control positivo la región promotora del gen *sitA*, que contiene una caja Fur conservada (Runyen-Janecky y cols., 2003). El gen *sitA* codifica para un mediador de transporte de hierro y manganeso, siendo su expresión inducida en el medio intracelular (Runyen-Janecky y Payne., 2002). Como era esperado, la proteína Fur de *Shigella* unió eficientemente a la caja fur de la región promotora de *sitA*, lo que se reflejó en la dramática disminución de la actividad enzimática (de 438 a 12 unidades miller) (**Figura 10**) indicando que la transcripción de *lacZ* es reprimida, siendo ello corroborado por el retardo en la migración durante el ensayo EMSA (**Figura 12**).

En tanto, el control negativo escogido fue el promotor del gen *dksA*, cuyo producto génico es un regulador transcripcional asociado a la RNA polimerasa. En experiencias previas de laboratorio, en el ensayo FURTA este promotor no fue capaz de secuestrar la proteína Fur que está codificada en el cromosoma, implicando ello que *dksA* no poseería cajas *fur* similares al consenso que sean funcionales. Por ello, en el presente trabajo llamó la atención el resultado obtenido para este control, dado que en el ensayo de la fusión transcripcional de este promotor y Fur activo se observó una disminución en la actividad enzimática, lo que indicaba que Fur es capaz de reprimir la expresión de *dksA*, si bien en una magnitud bastante menor en relación a lo visto para la región promotora de *sitA*, fue un resultado no esperado, este hecho fue concordante a los resultados del ensayo EMSA, donde también la proteína Fur activa ocasiona un leve retardo en la migración (**Figura 12**).

Por tanto, el regulador transcripcional Fur es capaz de reprimir la expresión de *icsA*. Lo anterior sugiere un modelo de acción en el medio intracelular, donde la concentración de hierro es baja, Fur se encuentre inactivo, posibilitándose la transcripción de *icsA*, y por consiguiente el movimiento dependiente de actina, que es fundamental para que *Shigella* se disemine. En el medio extracelular en tanto, en la cercanía de la mucosa y en la submucosa, donde la concentración de hierro también sería baja, operaría un mecanismo de regulación similar, donde la liberación de la represión de Fur sobre *icsA* estaría relacionado a la función de adhesina propuesto para IcsA (*Brotcke Zumsteg y cols., 2014*) (**Figura 13**).

Ahora bien, en el lumen colónico, donde Fur estaría activo dada la mayor cantidad de hierro, ocurriría que el regulador participaría negativamente sobre la movilidad dependiente de actina, lo que toma sentido dado que la bacteria no está en contacto con la célula hospedera (**Figura 13**). RnaG en tanto, no es regulado de forma directa por Fur en las condiciones estudiadas.

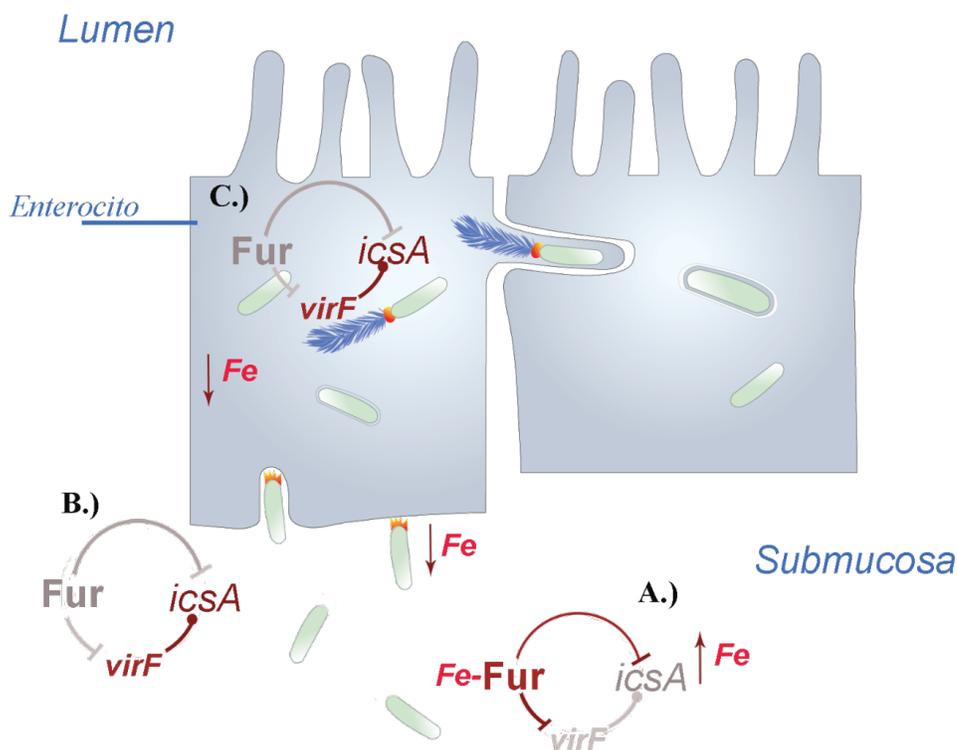


Figura 13: Modelo propuesto de la regulación de Fur sobre la expresión de *icsA* durante la invasión y diseminación a lo largo del tejido colónico. A) Se observa que en el medio extracelular Fur se encuentra activo, e inhibiendo la transcripción de *icsA* y *virF*. B) Al momento de adherir y C) diseminar, el regulador se encuentra inactivo debido a la baja concentración de hierro, lo que provoca la liberación de la represión sobre *icsA*, mientras que se permite la acción promotora de VirF sobre la transcripción de *icsA*. De este modo es producido *icsA* durante la adhesión y diseminación a través del ABM.

En relación al rol terapéutico de IcsA, es interesante mencionar que uno de los problemas que tienen las vacunas que contienen mutaciones para *icsA*, es que disminuirían la adhesión, lo que implicaría una disminución en la capacidad de inducción de la inmunidad (Biskri y Allaoui 2014). Lo anterior remarca la importancia de comprender mejor el mecanismo regulatorio que opera sobre *icsA*, de tal modo que sea posible desacoplar su rol como adhesina, de aquél de iniciador de ABM.

La proyección inmediata de este trabajo es realizar ensayos de inmunoblot para determinar si la producción de IcsA en *S. flexneri* varía bajo distintas concentraciones de

hierro. En la misma línea de lo señalado, se podría evaluar el nivel de transcrito de *icsA* obtenido en distintas concentraciones de hierro, esperándose un resultado que confirme lo visto en los ensayos de fusión transcripcional, es decir, una disminución en el transcrito de *icsA* dependiente de un aumento en la concentración de hierro.

También sería de interés evaluar cómo el hierro afecta la adhesión dependiente de IcsA, para ello sería necesario contar una cepa no adherente, por ejemplo la *E. coli* HB101 transformada con el gen *icsA*. Luego evaluar en este sistema heterólogo, con anticuerpos contra-IcsA, si bajo distintas concentraciones de hierro, la expresión de IcsA es polarizada en la bacteria, y qué relación tiene ello con adhesión.

Para estudiar las regiones promotoras de *icsA* y *rnaG*, así como el gen *fur*, se emplearon cepas de *E. coli* (H1717, QC1732 y H1780. **Tabla 1**). Son estos sistemas heterólogos los que presentaban las características más convenientes para estudiar directamente las regiones de interés, como por ejemplo: no poseer el gen *fur* y/o presentar fusiones transcripcionales que permiten verificar la afinidad de Fur por las regiones promotoras ensayadas. Sin embargo, estas mismas cualidades que permiten controlar el sistema de trabajo, se contraponen con el hecho de que al ser modelos alejados del sistema *in-vivo*, carecen de elementos reguladores de *Shigella* que pueden estar influenciando, en este caso la actividad transcripcional de *icsA* y *rnaG*. Por ejemplo en el caso del ensayo FURTA, cabe mencionar que se ensayó la unión de una proteína Fur heteróloga a secuencias promotoras de *S. flexneri*. Lo que en este caso no es dramático, dada la cercanía filogenética entre *Shigella* y *E. coli* (Pupo y cols., 1997, Escobar-Páramo y cols., 2003), pero que en otros modelos de estudio, por ejemplo en *Helicobacter pylori* sí marca una diferencia. En este último microorganismo se ha descrito que la caja fur cambia en un nucleótido del consenso (segundo nucleótido cambia guanina por adenina) definido por Baichoo y Helmann 2002, resultando en una unión menos eficiente de la proteína Fur heteróloga (Pich y cols., 2013).

Finalmente es necesario referirse a lo obtenido para *dksA*, que si bien fue inesperado, el resultado de la determinación de actividad β -galactosidasa y EMSA son concordantes entre sí, respecto que Fur tendría una acción directa sobre el gen *dksA*. En *E. coli* DksA tiene diversos efectos, por ejemplo actúa sobre la expresión génica, división celular, y síntesis de aminoácidos entre otros (Yun y cols., 2008). La acción de DksA es ejercida a través de la

unión al segundo canal de la RNA polimerasa, actuando como estabilizador de la alarmona ppGpp (Paul y cols., 2004). DksA y ppGpp actúan sinérgicamente respondiendo a condiciones de estrés y carencia de nutrientes de la bacteria en un control que recupera el balance entre la producción que tienen los ribosomas y el acervo de aminoácidos disponibles en condiciones de carencia (Blaby-Haas y cols., 2011). También, se ha demostrado que la carencia de hierro, como elemento de estrés estimula la acumulación de ppGpp, siendo esta alarmona a su vez capaz de estimular la producción de sistemas captadores de hierro (Vinella y cols., 2005). Es posible por tanto plantear, siguiendo esta relación entre estrés por nutrientes y hierro, que en presencia de hierro, Fur reprima la transcripción de *dksA*, dado que ya no se presentaría la condición de estrés metabólico haciendo innecesaria la presencia de DksA.

Uno de los principales antecedentes empleados en este trabajo fue la herramienta bioinformática "Virtual Footprint" como predictor de cajas fur en la región promotora de *icsA* y *rnaG*. Al respecto llamó la atención que a pesar de que la región promotora de *rnaG* presenta un sitio hipotético de unión a Fur en la zona de la caja -10, este no fue sitio blanco de Fur, como sí lo fueron las cajas fur hipotéticas de *icsA*. Estas últimas, a pesar de encontrarse más distantes del sitio de inicio de la transcripción, fueron más eficientes en la unión a Fur, como se pudo verificar en la importante retención observada en los ensayos EMSA. Una explicación posible para este resultado es que el número de cajas predichas para *icsA* es mayor que para *rnaG*, lo que indicaría que hay más proteína Fur unida en esta región promotora, teniendo en cuenta que cada monómero de Fur puede interactuar con un blanco de 7 pb (Pich y cols., 2012). En paralelo surge un segundo, y aún más importante elemento, qué tan conservadas son las cajas fur hipotéticas detectadas respecto del consenso. En este sentido es necesario evaluar el valor predictivo de la herramienta bioinformática empleada. La región promotora de *rnaG* poseía un puntaje de verosimilitud mayor al de *icsA* (1,89 versus 2,08, respectivamente). Lo que finalmente hace cuestionar el valor predictivo de esta herramienta.

7. Conclusiones.

- 1) La región promotora de *icsA* posee cajas fur funcionales.
- 2) La región promotora de *rnaG* no posee cajas fur funcionales
- 3) La proteína Fur activa ejerce un efecto represor sobre la transcripción de la región promotora de *icsA*.
- 4) La proteína Fur activa no ejerce un efecto represor significativo sobre la transcripción de la región promotora de *rnaG*.
- 5) La regulación de Fur sobre *icsA* puede ser realizada a través de la unión de Fur a la secuencia promotora de *icsA*.

8. Bibliografía

1. Adler B, Sasakawa C, Tobe T, Makino S, Komatsu K, Yoshikawa M. **1989**. A dual transcriptional activation system for the 230 kb plasmid genes coding for virulence-associated antigens of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol.* **3**:627-635.
2. Africa L, Murphy E, Egan N, Wigley A, Wing H. **2011**. The iron-responsive Fur/RyhB regulatory cascade modulates the *Shigella* outer membrane protease IcsP. *Infect Immun.* **79**:4543-4549.
3. Amann E, Brosius J, Ptashne M. **1983**. Vectors bearing a hybrid *trp-lac* promoter useful for regulated expression of cloned genes in *Escherichia coli*. *Gene.* **25**:167-178.
4. Baichoo, N.; Helmann, J. **2002**. Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol.* **184**:5826-5832.
5. Biskri L, Allaoui A. **2014**. *Shigella* stands up to the challenge of adhesion. *Cell Host Microbe.* **15**:393-395.
6. Blaby-Haas C, Furman R, Rodionov DA, Artsimovitch I, de Crécy-Lagard V. **2011**. Role of a Zn-independent DksA in Zn homeostasis and stringent response. *Mol Microbiol.* **79**:700-715.
7. Blocker A1, Jouihri N, Larquet E, Gounon P, Ebel F, Parsot C, Sansonetti P, Allaoui A. **2001**. Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secreton. *Mol Microbiol.* **39**:652-663.
8. Braun V. **2001**. Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. *J Med Microbiol.* **291**:67-79.

9. Broach W, Egan N, Wing H, Payne S, Murphy E. **2012**. VirF-independent regulation of *Shigella virB* transcription is mediated by the small RNA RyhB. *PLoS One*. **7**:e38592.
10. Brotcke Zumsteg A, Goosmann C, Brinkmann V, Morona R, Zychlinsky A. **2014**. IcsA is a *Shigella flexneri* adhesin regulated by the type III secretion system and required for pathogenesis. *Cell Host Microbe*. **15**:435-445.
11. Carpenter C, Payne S. **2014**. Regulation of iron transport systems in *Enterobacteriaceae* in response to oxygen and iron availability. *J Inorg Biochem*. **133**:110-117.
12. Conte M, Longhi C, Petrone G, Polidoro M, Valenti P, Seganti L. **2000**. Modulation of *actA* gene expression in *Listeria monocytogenes* by iron. *J Med Microbiol*. **49**:681-683.
13. Corona-Izquierdo F, Membrillo-Hernández J. **2002**. Biofilm formation in *Escherichia coli* is affected by 3-(N-morpholino)propane sulfonate (MOPS). *Res Microbiol*. **153**:181-185.
14. Dubrac S, Touati D. **2000**. Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *J Bacteriol*. **182**:3802-3808.
15. Egile C, d'Hauteville H, Parsot C, Sansonetti. **1997**. SopA, the outer membrane protease responsible for polar localization of IcsA in *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol*. **23**:1063-1073.
16. Escolar L, Pérez-Martín J, de Lorenzo V. **1998**. Binding of the *fur* (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. *J Mol Biol*. **283**:537-547.
17. Escolar L, Pérez-Martin J, de Lorenzo V. **1999**. Opening the Iron Box: Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein. *J Bacteriol*. **81**:6223-6229.
18. Escobar-Páramo P, Giudicelli C, Parsot C, Denamur E. **2003**. The evolutionary history of

- Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* revised. *J Mol Evol.* **57**:140-148.
19. Fillat M. **2014**. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch Biochem Biophys.* **546**:41-52.
 20. Fontaine A, Arondel J, Sansonetti P. **1990**. Construction and evaluation of live attenuated vaccine strains of *Shigella flexneri* and *Shigella dysenteriae* 1. *Res Microbiol.* **141**:907-912.
 20. Giangrossi M, Prosseda G, Nhan Chi, Brandi A, Colonna B, Falconi M. **2010**. A novel antisense RNA regulates at transcriptional level the virulence gene *icsA* of *Shigella flexneri*. *Nucleic Acids Res.* **38**:3362-3375.
 21. Goldberg M, Theriot J. **1995**. *Shigella flexneri* surface protein IcsA is sufficient to direct actin-based motility. *Proc Natl Acad Sci.* **92**:6572-6576.
 22. Gottesman S. **2004**. The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms. *Annu Rev Microbiol.* **58**:303-328.
 23. Hantke K. **1987**. Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K 12: *fur* not only affects iron metabolism. *Mol Gen Genet.* **210**:135-139.
 24. Inoue H, Nojima H, Okayama H. **1990**. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**:23-28.
 25. Instituto de Salud Pública (ISP). **2014**. Vigilancia de laboratorio *Shigella* spp. 2010-2014. *Boletín ISP* (4):1-13.
 26. Khaitlina S. **2014**. Intracellular transport based on actin polymerization. *Biochem (Mosc).* **79**:917-927.

27. Kosek M, Yori P, Olortegui M. **2010**. Shigellosis update: advancing antibiotic resistance, investment empowered vaccine development, and green bananas. *Curr Opin Infect Dis.* **23**:475-480.
28. Le Gall T, Mavris M, Martino M, Bernardini M, Denamur E, Parsot C. **2005**. Analysis of virulence plasmid gene expression defines three classes of effectors in the type III secretion system of *Shigella flexneri*. *Microbiol.* **151**:951-962.
29. Lucchini S, Liu H, Jin Q, Hinton J, Yu J. **2005**. Transcriptional adaptation of *Shigella flexneri* during infection of macrophages and epithelial cells: insights into the strategies of a cytosolic bacterial pathogen. *Infect Immun.* **73**:88-102.
30. Makino S, Sasakawa C, Kamata K, Kurata T, Yoshikawa M. **1986**. A genetic determinant required for continuous reinfection of adjacent cells on large plasmid in *S. flexneri* 2a. *Cell.* **46**:551-555.
31. Mandell G, Bennett J, Dolin R. **2010**. Principles and practice of infectious diseases. ELSEVIER. Cap 218. 7th Edition.
32. Maurelli A, Baudry B, d'Hauteville H, Hale T, Sansonetti P. **1985**. Cloning of plasmid DNA sequences involved in invasion of HeLa cells by *Shigella flexneri*. *Infect Immun.* **49**:164-171.
33. McLaughlin H, Hill C, Gahan C. **2011**. The impact of iron on *Listeria monocytogenes*; inside and outside the host. *Curr Opin Biotechnol.* **22**:194-199.
34. Ménard R, Sansonetti P, Parsot C. **1993**. Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells. *J Bacteriol.* **175**:5899-5906.

35. Ménard R, Sansonetti P, Parsot C. **1994**. The secretion of the *Shigella flexneri* Ipa invasins is activated by epithelial cells and controlled by IpaB and IpaD. *EMBO J.* **13**:5293-5302.
36. Miller J. **1972**. *Experiments in Molecular Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York:352-355.
37. Moors M, Levitt B, Youngman P, Portnoy D. **1999**. Expression of listeriolysin O and ActA by intracellular and extracellular *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* **67**:131-139.
38. Münch R, Hiller K, Grote A, Scheer M, Klein J, Schobert M, Jahn D. **2005**. Virtual Footprint and PRODORIC: an integrative framework for regulon prediction in prokaryotes. *Bioinformatics.* **21**:4187-4189.
39. Murphy, E. R., S. M. Payne. **2007**. RyhB, an iron-responsive small RNA molecule, regulates *Shigella dysenteriae* virulence. *Infect Immun* **75**:3470-3477.
40. Ni Z, Jiang L, Feng L, Wang L, Liu B. **2015**. Transcriptional adaptation of *Shigella flexneri* during adherence to epithelial cells. *J Basic Microbiol.* **55**:186-194.
41. O’Ryan M, Vidal R, Del Canto F, Salazar J, Montero D. **2015**. Vaccines for viral and bacterial pathogens causing acute gastroenteritis: Part II: Vaccines for *Shigella*, *Salmonella*, enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) and *Campylobacter jejuni* Hum Vaccine. **11**:601-619.
42. Oglesby A, Murphy E, Iyer V, Payne S. **2005**. Fur regulates acid resistance in *Shigella flexneri* via RyhB and *ydeP*. *Mol Microbiol.* **58**:1354-1367.

43. Otárola D. **2012**. Efecto del regulador transcripcional Fur sobre la actividad transcripcional del gen *virF* de *Shigella flexneri*. Tesis de Magíster. Universidad de Chile.
44. Paul B, Barker M, Ross W, Schneider D, Webb C, Foster J, Gourse R. **2004**. DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell*. **118**:311-322.
45. Pich O, Carpenter B, Gilbreath J, Merrell D. **2012**. Detailed analysis of *Helicobacter pylori* Fur-regulated promoters reveals a Fur box core sequence and novel Fur-regulated genes. *Mol Microbiol*. **84**:921-941.
46. Pupo M, Karaolis D, Lan R, Reeves P. **1997**. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. *Infect Immun*. **65**:2685–2692.
47. Runyen-Janecky L, Payne S. **2002**. Identification of chromosomal *Shigella flexneri* genes induced by the eukaryotic intracellular environment. *Infect Immun*. **70**:4379-4388.
48. Runyen-Janecky L, Reeves S, Gonzales E, Payne S. **2003**. Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, Iuc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition in vitro and in cultured cells. *Infect Immun*. **71**:1919-1928.
49. Sakai T, Sasakawa C, Yoshikawa M. **1988**. Expression of four virulence antigens of *Shigella flexneri* is positively regulated at the transcriptional level by the 30 kiloDalton VirF protein. *Mol Microbiol*. **2**:589-597.
50. Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T. **1989**. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. 2th edition USA.
51. Sansonetti P, Kopecko D, Formal S. **1982**. Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect Immun*. **35**:852-860.

52. Sansonetti P, Ryter A, Clerc P, Maurelli A, Mounier J. **1986**. Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: lysis of the phagocytic vacuole and plasmid-mediated contact hemolysis. *Infect Immun.* **51**:461-469.
53. Schroeder G, Hilbi H. **2008**. Molecular pathogenesis of *Shigella* spp.: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin Microbiol Rev.* **21**:134-156.
54. Senerovic L, Tsunoda S, Goosmann C, Brinkmann V, Zychlinsky A, Meissner F, Kolbe M. **2012**. Spontaneous formation of IpaB ion channels in host cell membranes reveals how *Shigella* induces pyroptosis in macrophages. *Cell Death Dis.* **3**:e384.
55. Touati D, Jacques M, Tardat B, Bouchard L, Despied S. **1995**. Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *J Bacteriol.* **177**:2305-2314.
56. Tran C, Giangrossi M, Prosseda G, Brandi A, Di Martino M, Colonna B, Falconi M. **2011**. A multifactor regulatory circuit involving H-NS, VirF and an antisense RNA modulates transcription of the virulence gene *icsA* of *Shigella flexneri*. *Nucleic Acids Res.* **39**:8122–8134.
57. Venkatesan M, Goldberg M, Rose D, Grotbeck E, Burland V, Blattner F. **2001**. Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri*. *Infect Immun.* **69**:3271-3285.
58. Vincze T, Posfai J, Roberts R. **2003**. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* **31**:3688-3691.
59. Vinella D, Albrecht C, Cashel M, D'Ari R. **2005**. Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **56**:958-970.

60. Wassef J, Keren D, Mailloux, J. **1989**. “Role of M cells in initial antigen uptake and in ulcer formation in the rabbit intestinal loop model of shigellosis”. *Infect Immun.* **57**:858-863.
61. Yun J, Jeon B, Barton Y, Plummer P, Zhang Q, Ryu S. **2008**. Role of the DksA-like protein in the pathogenesis and diverse metabolic activity of *Campylobacter jejuni*. *J Bacteriol.* **190**:4512-4520.
62. Zeile W, Purich D, Southwick F. **1996**. Cell Biol. Recognition of two classes of oligoproline sequences in profilin-mediated acceleration of actin-based *Shigella* motility. *J Cell Biol.* **133**:49-59.
63. Zychlinsky A, Prevost M, Sansonetti P. **1992**. *Shigella flexneri* induces apoptosis in infected macrophages. *Nature.* **358**:167-169.