

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



“Participación del sistema AtoS-AtoC en la expresión inducida por ácidos grasos de cadena corta del factor de virulencia *iha* en una cepa de *E. coli* STEC LEE”

Memoria presentada a la Universidad de Chile para optar al título profesional de
Bioquímico

Ariel Leonardo Araya González

DIRECTORES DE MEMORIA

Dr. Roberto Vidal Álvarez
Dr. Juan C. Salazar Garrido

Programa de Microbiología
y Micología
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

PROFESOR PATROCINANTE

Dr. Sergio Álvarez Armijo

Departamento de Bioquímica
y Biología Molecular
Facultad de Ciencias Químicas
y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago de Chile

2019

Este trabajo se realizó en el programa de Microbiología y Micología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile y fue financiado por el proyecto FONDECYT regular 1161161

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL.....	III
ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....	IV
ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN.....	VIII
SUMMARY.....	X
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
2.1 Métodos generales.....	13
2.2 Clonamientos y generación de mutantes.....	18
2.3 Evaluación de la expresión génica.....	28
3. RESULTADOS.....	34
3.1 Evaluar si el sistema AtoS-AtoC es activado por SCFAs.....	34
3.2 Evaluar si la activación del sistema AtoS-AtoC modifica el efecto que tienen los SCFAs sobre <i>iha</i>	55
4. DISCUSIÓN.....	63
5. CONCLUSIONES.....	69
6. BIBLIOGRAFÍA.....	70

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla I. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo.....	14
Tabla II. Reactivos químicos utilizados en este trabajo.....	17
Tabla III. Plásmidos utilizados en este trabajo.....	19
Tabla IV. Partidores utilizados en este trabajo.....	21
Tabla V. Programas de termociclado utilizados en este trabajo.....	22
Tabla VI. Parámetros de amplificación en tiempo real.....	31

Figura 1. Esquema de la isla LAA.....	5
Figura 2. Organización y función del sistema AtoS-AtoC.....	10
Figura 3. Plásmidos utilizados en el clonamiento del operón <i>atoSC</i>	26
Figura 4. Diseño del ensayo de restricción de <i>iha</i>	32
Figura 5. Confirmación del método de generación de mutantes mediante PCR de colonia.....	35
Figura 6. Efecto del activador acetoacetato sobre la expresión de los operones <i>atoSC</i> y <i>atoDAEB</i>	36
Figura 7. Efecto del activador acetoacetato sobre la expresión de los operones <i>atoSC</i> y <i>atoDAEB</i> (qRT-PCR).....	38
Figura 8. Efecto de la remoción del operón <i>atoSC</i> sobre la expresión del operón <i>atoDAEB</i>	40
Figura 9. Efecto del inductor ácido toluico sobre la expresión de los operones <i>atoSC</i> y <i>atoDAEB</i>	42
Figura 10. Expresión del operón <i>atoSC</i> recombinante.....	44
Figura 11. Activación del sistema AtoS-AtoC recombinante.....	45
Figura 12. Efecto del sistema AtoS-AtoC sin activar sobre la expresión del operón <i>atoDAEB</i> en la cepa mutante.....	48
Figura 13. Efecto de los SCFAs sobre la expresión de los operones <i>atoSC</i> y <i>atoDAEB</i>	50

Figura 14. Efecto de los SCFAs sobre la activación del sistema AtoS-AtoC.....	52
Figura 15. Curvas de crecimiento de las cepas utilizadas en este trabajo.....	54
Figura 16. Ensayo de restricción de <i>iha</i>	56
Figura 17. Curvas de fusión de los productos de amplificación de <i>iha</i>	57
Figura 18. Actividad transcripcional relativa entre ambos alelos de <i>iha</i>	58
Figura 19. Efecto de los SCFAs sobre la expresión de <i>iha</i>	60
Figura 20. Participación del sistema AtoS-AtoC en la regulación de la expresión de <i>iha</i>	62

ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
Cam	Cloranfenicol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
gDNA	Ácido desoxirribonucleico genómico
ECD	<i>Escherichia coli</i> diarreogénicas
EDTA	Ácido etilen di-amino tetra-acético
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
FRT	Secuencia de reconocimiento de la recombinasa F ₁ p
h	Horas
min	Minutos
s	Segundos
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
Kan	Kanamicina
L	Litros
mL	Mililitros
μ L	Microlitros
LB	Caldo de lisogenia
LEE	<i>Locus of Enterocyte Effacement</i>
LAA	Locus de Adherencia y Autoagregación
MOPS	Ácido 3-morfolinopropano-1-sulfónico
OD _{600nm}	Densidad óptica medida a una longitud de onda de 600 nm
O.N.	Durante toda la noche
ORF	Marco de lectura abierto
PAI	Isla de patogenicidad
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIPES	Ácido 1,4-piperazindietano sulfónico
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Temperatura ambiente
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, con transcripción reversa, en tiempo real
SCFAs	Ácidos grasos de cadena corta
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple
TAE	Tris-acetato-EDTA
TE	Tris-EDTA
T3SS	Sistema de secreción tipo III
U	Unidad enzimática
ua	Unidad arbitraria de absorbancia
ur	Unidad relativa de fluorescencia
UV	Ultravioleta
V	Volt

X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
STEC	<i>Escherichia coli</i> productor de Shiga-toxina
$^{\circ}\text{C}$	Grados Celsius
Ct	Número de ciclo en el cual la fluorescencia de la muestra supera la fluorescencia basal
ΔCt	Diferencia de Ct entre el gen normalizador y el gen blanco bajo idéntica condición experimental
ΔCt_N	Diferencia de Ct del gen normalizador bajo distintas condiciones experimentales
ΔCt (NT)	Diferencia de Ct entre el gen blanco y su control de amplificación carente de templado
ΔCt (NRT)	Diferencia de Ct entre el gen blanco y su control de retro-transcripción carente de transcriptasa reversa
$\Delta\Delta\text{Ct}$	Diferencia de Ct entre el ΔCt en una condición y el ΔCt en otra condición para el mismo gen en estudio

RESUMEN

Cada año se reportan más de 2 millones de casos de diarrea aguda en niños menores de cinco años. En este grupo, se estima que la diarrea aguda causa entre 0,8-2 millones de muertes anualmente. Existen más de 20 enteropatógenos causantes de diarrea aguda siendo los agentes más comunes los virus junto con bacterias del grupo de *Escherichia coli* diarreogénicas. De los patotipos pertenecientes a este último grupo, *E. coli* productor de Shiga-toxina (STEC) representa uno de los mejor documentados. STEC es un patógeno zoonótico causante de episodios de diarrea, colitis hemorrágica y síndrome hemolítico urémico (SHU), el cuadro clínico extraintestinal más grave producido por esta bacteria. El serotipo O157:H7 es el serotipo referencial de STEC y produce las infecciones más severas, siendo capaz de generar todos los cuadros clínicos antes mencionados. Sin embargo, existen más de 400 serotipos de STEC implicados en infecciones humanas. Las cepas de STEC se caracterizan por su habilidad de producir Shiga-toxinas, proteínas que median las complicaciones sistémicas de la infección, junto con su habilidad para inducir lesiones características en el epitelio intestinal humano, proceso mediado en gran parte por la isla de patogenicidad LEE (del inglés *Locus of Enterocyte Effacement*). Pese a que la presencia de la isla LEE se considera necesaria para la virulencia de STEC, recientes estudios han revelado la existencia de cepas de STEC carentes de LEE (LEE⁻), como las pertenecientes a los serotipos O113:H21 y O91:H21, cuyos brotes son capaces de generar cuadros clínicos indistinguibles de los producidos por cepas de STEC que sí poseen LEE (LEE⁺), como las del serotipo O157:H7. Desde esta perspectiva, los serotipos LEE⁻ representan un grupo de patógenos epidemiológicamente emergente.

Recientemente nuestro laboratorio reportó una nueva isla de patogenicidad presente únicamente en cepas LEE⁻, denominada Locus de Adherencia y Autoagregación (LAA). Esta isla codifica, entre otras cosas, la adhesina Iha y el sistema de dos componentes AtoS-AtoC. Un estudio reciente mostró que la expresión de la adhesina Iha se ve modificada por la presencia de ácidos grasos de cadena corta. En *E. coli*, la utilización de estos ácidos grasos se realiza mediante las enzimas codificadas por el operón *atoDAEB*, cuya expresión se encuentra a su vez bajo el control del sistema AtoS-AtoC. Sin embargo, se desconoce si este último sistema participa en el efecto que provocan los ácidos grasos sobre la expresión de *iha*, mecanismo a su vez desconocido. En lo particular, entender este mecanismo contribuiría a conocer la regulación génica de esta adhesina y de paso, a dilucidar el mecanismo general de patogenicidad de STEC LEE⁻ LAA⁺, permitiendo el desarrollo de nuevas estrategias diagnósticas que puedan ser usadas para prevenir el fenómeno de adherencia en el colon humano y/o bovino.

El propósito de este trabajo fue establecer si el sistema AtoS-AtoC participa en el efecto de inducción que provocan los ácidos grasos de cadena corta sobre la expresión de *iha*, usando como modelo de estudio una cepa STEC LEE⁻ (LAA⁺) serotipo O91:H21. Para esto, el sistema AtoS-AtoC se ubicó en medio del eje ácidos grasos-*iha*, evaluando de manera sistemática las relaciones ácidos grasos-sistema y sistema-*iha*. En la cepa silvestre, la exposición a ácidos grasos no modificó la expresión de *iha*. Esta última no se vio modificada incluso tras la activación del sistema AtoS-AtoC, descartando la participación de este sistema en la regulación de *iha*. Pese a esto, en el presente trabajo se muestra que la presencia de ácidos grasos impide el normal funcionamiento del sistema AtoS-AtoC y se demuestra que en la cepa silvestre existen dos alelos distintos para el gen *iha*.

ABSTRACT

Participation of AtoS-AtoC system in the expression induced by short-chain fatty acids of the virulence factor *iha* in a strain of *E. coli* STEC LEE⁻

Each year are reported more than 2 million cases of acute diarrhea in children under 5 years old. In this group, it is estimated that acute diarrhea causes between 0.8-2 million deaths annually. Although, there are more than 20 enteropathogens that cause acute diarrhea, the most common agents are viruses together with diarrheagenic *Escherichia coli*. In the latter group, Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) represents one of the more studied pathotypes. STEC is a zoonotic pathogen that causes diarrhea episodes, hemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome (SHU), the most severe extra intestinal clinical pattern caused for this pathotype. The STEC O157:H7 serotype is a referential serotype and produces more severe infections, is capable to generate all the clinical symptoms mentioned above. There are more than 400 serogroups of STECs involved in human infections. STEC strains are characterized by their ability to produce Shiga-toxins, proteins that mediate the systemic complications of infection, and are capable to induce characteristic lesions in the human intestinal epithelium, a process mediated by LEE pathogenicity island (from Locus of Enterocyte Effacement). Although the presence of LEE island is considered necessary for the virulence of STEC, recent studies have revealed the existence of STEC strains lacking LEE (LEE⁻), such as serotypes O113:H21 and O91:H21 responsible for outbreaks with clinical patterns indistinguishable from the produced by O157:H7 serotype. From this perspective, LEE⁻ serotypes represent a group of epidemiologically emergent pathogens.

Previous studies in our group, identify a new pathogenicity island present only in LEE⁻ strains, named Adherence and Autoaggregation Locus (LAA). This island codes, among other genes, the adhesin Iha and the two-component system AtoS-AtoC. Recent works show that the expression of the Iha adhesin is modified by the presence of short chain fatty acids. In *E. coli*, the utilization of these fatty acids is carried out by the enzymes encoded within the operon *atoDAEB*, whose expression is in turn under the control of the AtoS-AtoC system. However, is unknown if this last system participates in the effect that fatty acids causes on the expression of *iha*, a mechanism still unknown. In particular, understanding this mechanism would contribute to known the gene regulation of this adhesin and, in addition, would contribute to elucidate the general mechanism of pathogenicity of STEC LEE⁻ (and LAA⁺), to allow the development of new diagnostic strategies that it could be used for prevent the of adhesion in the human and/or bovine colon. The purpose of this work was to establish if the AtoS-AtoC system participates in the induction effect caused by short-chain fatty acids on the expression of *iha*, using a strain STEC LEE⁻ (LAA⁺) serotype O91:H21 as a study model. With this purpose, the AtoS-AtoC system was placed in the center of the axis: fatty acids-*iha*, to evaluate systematically the relationships between fatty acid-system and system-*iha*. In the wild-type strain, the exposure to fatty acids did not change the expression of *iha*. Further, is not modified even after the activation of the AtoS-AtoC system, discarding the participation of this system in the regulation of *iha*. Despite this, this work shows that the presence of fatty acids prevents the normal function of the AtoS-AtoC system and demonstrate that in the wild-type strain exists two different copies of the *iha* gene.

1. INTRODUCCIÓN

Cada año se producen más de dos millones de casos de diarrea aguda en niños menores de cinco años, constituyendo anualmente la segunda causa de muerte más común (0,8-2 millones) después de las infecciones respiratorias en este grupo etario (Kirk, *et al.* 2015). Si bien el 80% de tales muertes ocurren principalmente en África y en el sudeste de Asia, existen poblaciones de América Latina (países en vías de desarrollo) en los cuales tales casos aún representan una causa importante de morbilidad infantil, constituyendo un problema de salud pública (Troeger, *et al.* 2018).

Existen más de 20 enteropatógenos causantes de estos cuadros de diarrea aguda, dentro de los cuales los agentes más comunes son Rotavirus y las bacterias del grupo *Escherichia coli* diarreogénicas (ECD) (Kirk, *et al.* 2015). En base al cuadro clínico y la presencia de factores de virulencia específicos determinantes del mecanismo de colonización intestinal, las cepas de *E. coli* diarreogénicas se clasifican en seis patotipos uno de los cuales, y el único de origen zoonótico, corresponde a *E. coli* productor de Shiga-toxina (STEC) (Nataro & Kaper 1998).

Patogénesis de la infección por STEC

STEC es el agente causante de colitis hemorrágica y síndrome hemolítico urémico (SHU), el cuadro clínico extraintestinal más grave causado por este patotipo. Existen más de 400 serogrupos de STEC implicados en infecciones humanas siendo el miembro más virulento de este patotipo el serotipo O157:H7, el cual es capaz de generar ambos cuadros clínicos además de casos esporádicos de diarrea. Las cepas STEC se caracterizan por producir una o más Shiga-toxinas (Stx) y además por poseer la habilidad de inducir lesiones características en el epitelio intestinal humano (Nataro & Kaper 1998).

La toxina Stx es una citotoxina formada por 2 sub-unidades principales: A y B (O'Brien, *et al.* 1992). La subunidad B se estructura como un pentámero que se une al receptor de glicolípidos Gb3 presente en la superficie de las células epiteliales, mientras que la subunidad A posee actividad RNA N-glicosidasa sobre el rRNA 28S, inhibiendo la síntesis proteica e induciendo apoptosis (Endo, *et al.* 1988; Lingwood, *et al.* 1987). En *E. coli* existen 2 tipos principales de Stx: Stx₁ y Stx₂, las cuales difieren en la respuesta inmunológica que desencadenan en el hospedero, sus efectos citotóxicos (Jacewicz, *et al.* 1999) y sus vías de translocación a través del epitelio intestinal (Hurley, *et al.* 1999). Además, las cepas STEC pueden producir uno o ambos tipos de Stx, sin embargo, en aislados clínicos de *E. coli* O157:H7 provenientes de pacientes con SHU se ha observado una mayor producción de Stx₂ (Thomas, *et al.* 1993). Los tejidos que expresan Gb3 varían en el organismo por lo que la distribución de las células blanco definen el desarrollo del daño asociado a la citotoxina (Pruimboom-Brees, *et al.* 2000). Es así como en el endotelio glomerular renal humano, el cual presenta altos niveles de Gb3, la presencia de Stx puede causar una falla renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica de tipo micro angiopática, todas características clínicas típicas de SHU (Karmali, *et al.* 1983).

A pesar que la producción de Stx es responsable de la mayor parte de las características y secuelas de la infección grave por STEC, el proceso de infección implica la colonización del intestino del organismo hospedero (Phillips, *et al.* 2000). Es así que el proceso de patogénesis involucra una amplia gama de interacciones entre la bacteria y factores del hospedero involucrados en el proceso de colonización (Farfán, *et al.* 2008). Este último proceso es mediado en gran parte por proteínas codificadas en genes albergados en la isla de patogenicidad LEE (del inglés *Locus of Enterocyte Effacement*).

Factores de virulencia y mecanismo de colonización de STEC

El grupo de *E. coli* diarreogénicas (ECD) es un grupo heterogéneo en cuanto al mecanismo que utilizan para adherirse y colonizar el colon humano. El mecanismo de adhesión descrito de STEC corresponde al utilizado por el subgrupo de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y se caracteriza por requerir la presencia de la isla de patogenicidad LEE (Nataro & Kaper 1998).

Las islas de patogenicidad (PAI por sus siglas en inglés) son segmentos de DNA genómico flanqueados por directos repetidos, asociadas generalmente a genes de tRNA. Estas islas poseen un contenido G+C característico y elementos implicados en la movilidad génica (IS, transposasas e integrasas) (Hacker & Carniel 2001). Estas PAI tienen genes que codifican factores de virulencia y su presencia determina la patogenicidad de un organismo particular (Dobrindt, *et al.* 2004). La isla LEE, por ejemplo, contiene alrededor de 41 genes agrupados en 5 operones principales (Elliott, *et al.* 1998). El gen *eae* localizado en este locus codifica la proteína intimina, una adhesina no fimbrial y principal factor involucrado en la adherencia de estas bacterias a las células epiteliales intestinales. El primer gen codificado en LEE corresponde a *ler*, cuyo producto actúa como un factor transcripcional maestro de la isla completa (Müller, *et al.* 2009). La isla LEE también codifica un sistema de secreción de tipo III (T3SS) involucrado en la traslocación de diferentes proteínas hacia el citoplasma del enterocito. Dentro de estas proteínas se encuentra el receptor translocado de intimina (Tir por sus siglas en inglés), cuyo dominio central interactúa con la proteína intimina para formar una unión de tipo estrecha entre la bacteria y la célula eucariota.

Fuera de la isla LEE existen varias proteínas implicadas en la transducción de señales necesarias para el mecanismo de colonización, el cual altera la arquitectura y fisiología de las células epiteliales, tales como EspF_u (que junto a Tir recluta al factor promotor de la nucleación de actina, N-WASP) e IRSp53 (importante regulador de la reorganización del citoesqueleto de actina) (Deibel, *et al.* 1998; Weiss, *et al.* 2009). Como resultado del proceso de colonización, se produce una lesión en el enterocito producto del reordenamiento de su citoesqueleto, generando una estructura en forma de pedestal en la interfase de adhesión bacteria-célula (Frankel & Phillips 2008). Esta lesión, denominada de “adherencia y borrado” o tipo A/E (por sus siglas en inglés), daña la microvellosidad intestinal causando diarrea e inflamación. Este tipo de lesión no produce disentería y SHU (Paton, *et al.* 1999), sin embargo, la mayoría de los serotipos implicados en estas patologías, como O157:H7, O26:H11, O103:H21, poseen la isla LEE por lo que la presencia de esta PAI es considerada un importante factor de riesgo (Ethelberg, *et al.* 2004). A pesar de lo anterior, en los últimos años se ha observado un claro aumento en la frecuencia de brotes de SHU provocado por los serotipos LEE⁻: O91:H21, O113:H21 y O174:H21, sin embargo, se desconoce el mecanismo de colonización asociado a estos últimos (Lindgren, *et al.* 1993; Paton, *et al.* 1999). Los serotipos LEE⁻ son capaces de generar cuadros clínicos indistinguibles de los producidos por aquellas cepas que poseen LEE (LEE⁺), como las del serotipo O157:H7. Desde esta perspectiva, los serotipos LEE⁻ asociados representan un grupo de patógenos epidemiológicamente emergente.

Locus de Adherencia y Autoagregación: una nueva PAI presente en cepas STEC LEE⁻

En nuestro laboratorio, previo a esta investigación, se realizaron análisis comparativos entre cepas STEC LEE^{+/-} mediante Blastn. El resultado de estos análisis sugirió que existe una nueva PAI, presente únicamente en cepas STEC LEE⁻, denominada Locus de adherencia y autoagregación (LAA) (Montero, *et al.* 2017). LAA es una región de 86 kb flanqueada por directos repetidos de 23 pb, los cuales corresponden a una duplicación del extremo 3' del locus codificante del tRNA de fenilalanina *pheV*, locus en el cual se encuentra inserta LAA. Esta isla tiene un contenido de G+C del 48% y alberga 80 ORFs teóricos organizados en 4 módulos (**Figura 1**). De estos ORFs, algunos codifican proteínas cuya función en virulencia ha sido previamente reportada, como lo son las adhesinas Iha (ORF20) y Ag43 (ORF67), participando además esta última en procesos de autoagregación y formación de biopelículas (Tarr, *et al.* 2000; Van der Woude & Henderson 2008).

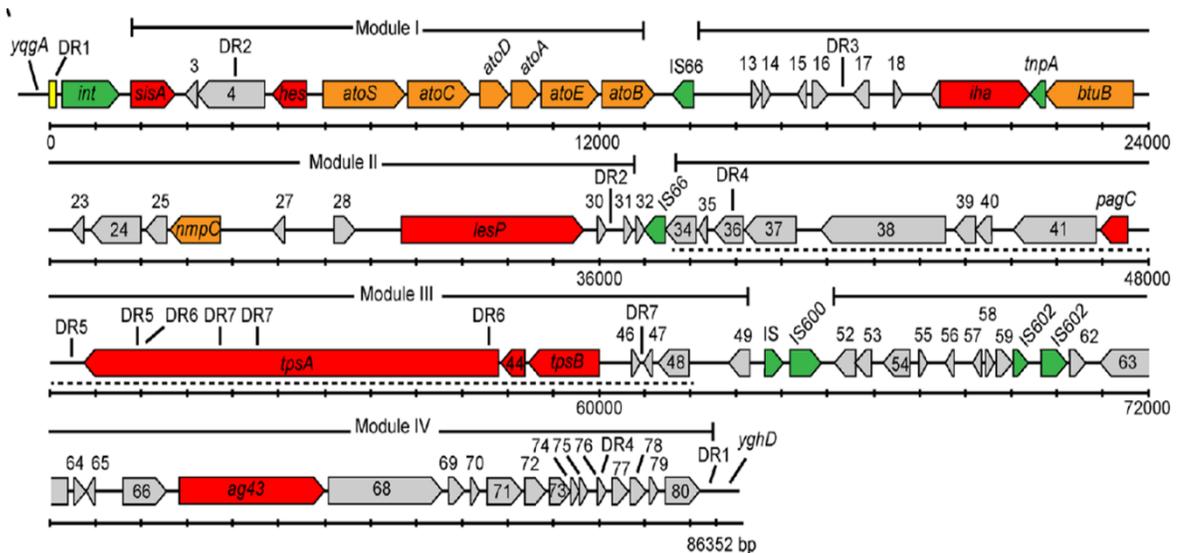


Figura 1. Esquema de la isla LAA. Los genes de función desconocida se muestran en gris. Imagen modificada de Montero *et al.* 2017.

Iha: un factor de virulencia codificado en LAA

Dentro de los genes codificados en LAA se encuentra el gen *iha*, codificante de la proteína homónima. Iha es una adhesina homóloga a IgrA, una proteína de membrana externa regulada por hierro presente en *Vibrio cholerae* (Johnson, *et al.* 2005). Iha ha sido descrita como un factor de virulencia capaz de otorgar un fenotipo adherente a cepas que carecen de mecanismos de adherencia conocidos (Tarr, *et al.* 2000). En *E.coli*, *iha* es regulado a nivel transcripcional por el regulador de respuesta a hierro Fur y por una serie de polimorfismos de nucleótido simple (SNP, por sus siglas en inglés) ubicados río arriba de la caja de unión al regulador, elementos que en conjunto modifican la actividad transcripcional de *iha* (Rashid, *et al.* 2006). En el año 2009, Herold *et al.*, y trabajando en una cepa LEE⁻ serotipo O113:H21, informaron la presencia de un alelo de *iha* adicional al alelo cromosomal antes descrito: un alelo residente en el megaplásmido de virulencia pO113 (Herold, *et al.* 2009). Pese a esto, se desconoce la regulación de este alelo y si éste se encuentra presente en cepas de otros serotipos STEC. Herold *et al.*, también informan que la expresión de *iha* se ve modificada por la presencia de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, por sus siglas en inglés). Es así como la suplementación del medio control con una mezcla de SCFAs, usando concentraciones similares a las encontradas en el colon, incrementan la expresión del alelo cromosomal de *iha* (Herold, *et al.* 2009).

SCFAs: origen, utilización y su rol como metabolitos implicados en patogenicidad

Los SCFAs son ácidos alifáticos monocarboxílicos no sustituidos totalmente saturados, con un largo de cadena menor o igual a cinco átomos de carbono (Cook & Sellin 1998). Estos SCFAs abundan en el intestino humano como resultado de la actividad metabólica de una parte de la microbiota presente (Cummings & Macfarlane 1991). A nivel intestinal, la mezcla de los SCFAs acetato, propionato y butirato constituye alrededor del 95% de los SCFAs totales, distribuida en una razón molar de 60:20:20 respectivamente (den Besten, *et al.* 2013). Sin embargo, tanto la abundancia como composición de la mezcla total de SCFAs se ve fuertemente influida por el tipo de dieta del hospedero, así como por la composición particular de su microbiota intestinal (Roy, *et al.* 2006; Topping & Clifton 2001). A nivel celular, los SCFAs se generan como productos finales de un conjunto de reacciones fermentativas, propiciadas en parte por la baja disponibilidad de oxígeno que exhibe el lumen intestinal (Hooper, *et al.* 2002). En este ambiente anaerobio, los carbohidratos no asimilables por el hospedero son degradados y oxidados parcialmente por una parte de la microbiota presente, siendo liberados al medio extracelular. Las especies del género *Bacteroides* transforman mono y oligosacáridos en CO₂, H₂ y ácidos grasos de largo de cadena intermedia. Estos últimos, son utilizados a su vez por especies del género *Clostridium*, produciendo butirato y propionato (Fischbach & Sonnenburg 2011). El acetato es producido en su totalidad por el grupo de organismos acetogénicos también presente, los cuales son capaces de utilizar el CO₂ como fuente de carbono (Rey, *et al.* 2010). Esta distribución heterogénea de microorganismos intestinales genera una distribución espacial de la mezcla acetato-butirato-propionato prácticamente única por hospedero (Cummings 1981). Los SCFAs así producidos sirven de fuente de carbono para gran parte de los géneros de la familia *Enterobacteriaceae* y además contribuyen al funcionamiento normal del intestino (Hijova & Chmelarova 2007).

Las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae*, son capaces de utilizar una amplia gama de ácidos grasos como fuente de carbono. Esta utilización la realizan principalmente mediante el empleo de dos sistemas: el regulón *fad* y el operón *atoDAEB* (Clark & Cronan 2005). El regulón *fad* participa esencialmente en la utilización de ácidos grasos de cadena larga y es el principal encargado de la realización del ciclo de β -oxidación en bacterias (Tojo, *et al.* 2011). Por su parte, el operón *atoDAEB* ha sido descrito como operón necesario para la utilización de SCFAs. En *E. coli*, el operón *atoDAEB* permite la utilización de butirato y de acetoacetato, y su expresión es regulada a nivel transcripcional por el sistema de dos componentes AtoS-AtoC (Clark & Cronan 2005).

Existe evidencia que sugiere que los SCFAs poseen un rol como metabolitos implicados en procesos de patogenicidad bacteriana (Sun & O’Riordan 2013). Nakanishi *et al.*, utilizando mutantes sitio específicas de Lrp (regulador transcripcional global que modula, entre otras cosas, la síntesis de pili), reportaron que en cepas de STEC serotipo O157:H7, el butirato es capaz de unirse al sitio de unión a ligando descrito en Lrp activando la expresión de genes de virulencia presentes en la isla LEE. La expresión de estos genes es necesaria para la generación de lesiones A/E y ocurre mediante un mecanismo que involucra a Ler, regulador maestro de LEE (Nakanishi, *et al.* 2009). Pese a esto, la influencia de los SCFAs en virulencia no necesariamente se correlaciona con la presencia de la isla LEE, puesto que como ya se mencionó, la presencia de una mezcla de SCFAs promueve la expresión del alelo cromosomal de *iha* en una cepa LEE⁻ serotipo O113:H21 (Herold, *et al.* 2009).

Sistema AtoS-AtoC: un sistema de dos componentes codificado en la isla LAA

Las PAIs frecuentemente contienen genes codificantes de reguladores transcripcionales, capaces de regular la expresión de factores de virulencia codificados dentro de la misma isla (Dobrindt, *et al.* 2004). Las principales clases de reguladores transcripcionales codificados en PAIs son los pertenecientes a la familia AraC y los sistemas reguladores de dos componentes. Este es el caso de la isla LAA, la cual contiene genes que codifican una proteína de la familia AraC y el sistema de dos componentes AtoS-AtoC. Del universo de cepas STEC LEE⁻ analizadas, la mayor parte de las que se encuentran asociadas a casos de SHU poseen el primer módulo de la isla LAA, el cual contiene el operón codificante del sistema AtoS-AtoC (Montero, *et al.* 2017).

Los sistemas de transducción de señales de dos componentes (SDC) le permiten a la bacteria adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes, modulando la expresión de genes específicos (Stock, *et al.* 2000). Un SDC típico se encuentra formado por un sensor con actividad histidina kinasa (SHK por sus siglas en inglés) y un regulador de respuesta asociado (RR por sus siglas en inglés) (Hoch 2000). Bajo el estímulo apropiado, el sensor dimérico se autofosforila en un residuo conservado de histidina. La interacción del sensor fosforilado con el regulador de respuesta (RR), resulta en una transferencia del grupo fosforilo a un residuo conservado de aspartato presente en un dominio específico del RR denominado caja H (Hoch 2000). Esta transferencia activa a RR permitiéndole actuar, en la mayoría de los casos, como un regulador transcripcional.

El sistema AtoS-AtoC es uno de los 29 SDC caracterizados en *E. coli* (Oshima, *et al.* 2002). Este sistema responde vía AtoS (SHK) a la presencia periplasmática de acetoacetato, un derivado de SCFA (Jenkins & Nunn 1987). AtoS una vez activo promueve vía AtoC (RR) la expresión del operón *atoDAEB*, el cual codifica las enzimas necesarias para la utilización de SCFAs (Kyriakidis & Tiligada 2009). Estas enzimas también permiten la utilización del activador acetoacetato (**Figura 2**).

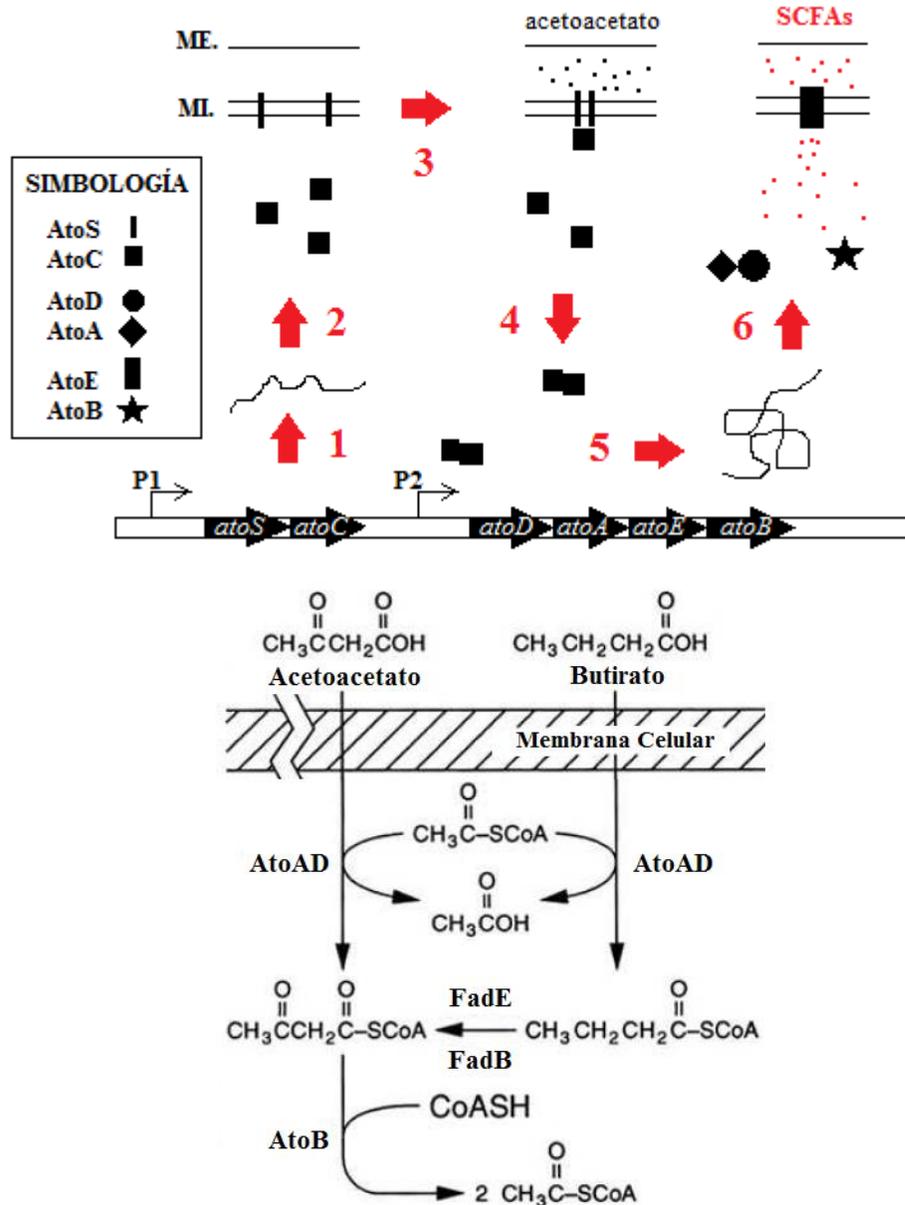


Figura 2. Organización y función del sistema AtoS-AtoC.

La transcripción del operón *atoSC* produce un bicistrón (1) que se traduce generando el sistema AtoS-AtoC (2). La presencia de acetoacetato (3), provoca la dimerización del sensor (AtoS) activando al regulador de respuesta (AtoC), provocando también su dimerización (4). AtoC en forma de dímero se une al promotor del operón *atoDAEB* (P2), permitiendo su expresión (5). La transcripción de este último operón genera un policistrón, cuyos productos de traducción permiten la utilización de SCFAs (6). Estas enzimas catalizan tanto la utilización de SCFAs (ej.: butirato), como la utilización del activador acetoacetato como fuente de carbono (imagen inferior). P1: promotor operón *atoSC*; P2: promotor operón *atoDAEB*; ME.: membrana externa; MI.: membrana interna; FadE y FadB: enzimas codificadas en el regulón *fad*. Imagen inferior modificada de Clark & Cronan 2005.

En resumen, los SCFAs han mostrado ser metabolitos implicados en virulencia en un amplio espectro de microorganismos (Sun & O’Riordan 2013). En cepas STEC LEE⁻, los SCFAs promueven la expresión del factor de virulencia *iha* (Herold, *et al.* 2009). Tanto *iha* como el SDC AtoS-AtoC se encuentran codificados en LAA (Montero, *et al.* 2017). El sistema AtoS-AtoC regula al operón *atoDAEB* (también presente en LAA), el cual promueve la utilización de SCFAs (Jenkins & Nunn 1987). Pese a la evidencia presentada, se desconoce cuál es el mecanismo por el cual los SCFAs modifican la expresión de *iha*. Puesto que el operón *atoDAEB* metaboliza los SCFAs y este operón a su vez es regulado por el sistema AtoS-AtoC, es posible que este último sistema participe en la regulación que ejercen los SCFAs sobre *iha*, regulando a la vez su expresión. Dado que la duplicación alélica informada por Herold, *et al.*, podía ser una característica compartida entre cepas LEE⁻, en el presente trabajo se estudiaron ambos alelos de *iha* (Herold, *et al.* 2009).

HIPÓTESIS

El sistema AtoS-AtoC participa en la inducción que ejercen los SCFAs sobre la expresión de los alelos de *iha*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación del sistema AtoS-AtoC en el eje SCFAs-*iha*, evaluando bajo distintas condiciones, la actividad transcripcional de ambos alelos de *iha*, usando como modelo de estudio una cepa STEC LEE⁻ (LAA⁺) serotipo O91:H21.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar si el sistema AtoS-AtoC es activado por SCFAs.
- Evaluar si la activación del sistema AtoS-AtoC modifica el efecto de inducción que tienen los SCFAs sobre *iha*.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 MÉTODOS GENERALES

2.1.1 Condiciones de cultivo y medios de cultivo

Los cultivos líquidos se realizaron siempre utilizando como base medio LB; 171 mM de NaCl (10 g/L), 5,0 g/L de extracto de levadura y 10 g/L de triptona disueltos en agua destilada. Los medios suplementados se prepararon disolviendo el suplemento requerido en medio LB estéril, utilizando las siguientes concentraciones finales; ampicilina: 100 µg/mL, kanamicina: 50 µg/mL, cloranfenicol: 30 µg/mL, X-gal en DMSO: 50 µg/mL, IPTG: 100 µM, ácido toluico en etanol absoluto: 2,0 mM.

Para los cultivos en medio sólido se utilizaron placas de Petri preparadas con agar-LB o agar-LB suplementado al 1,5% (m/v) e incubadas a 30 o 37°C durante 12–16 h. Las cepas obtenidas en este trabajo fueron conservadas en medio LB-glicerol estéril al 30% (m/v) y guardadas en duplicado a -20 y -80°C. La **Tabla I** resume las cepas utilizadas, así como sus principales características.

2.1.2 Electroforesis en geles de agarosa

Los geles se prepararon disolviendo la masa necesaria de agarosa en amortiguador TAE. La composición del amortiguador fue: 0,50 mM EDTA, 10 mM ácido acético, 20 mM Tris pH 8,0, conservado a temperatura ambiente (RT) hasta el momento de su uso. Las corridas electroforéticas se realizaron siempre a voltaje constante en el intervalo 80-100V, usando TAE como amortiguador de corrida. Los geles se cargaron con la muestra diluida en amortiguador de carga 6X. La composición del amortiguador fue: 60 mM EDTA, 60% glicerol (m/v), 0,03% (m/v) azul de bromofenol, 0,25% (m/v) xileno-cianol, 10 mM Tris-HCl pH 7,6, conservado a -20°C hasta el momento de su uso (concentración 6X).

Una vez finalizada la corrida electroforética, y con la finalidad de visualizar el DNA y/o RNA resuelto, el gel fue sumergido en 0,5 µg/mL bromuro de etidio durante 15-20 min. Finalmente, éste fue revelado por exposición a luz UV y fotografiado.

Tabla I. Cepas bacterianas utilizadas en este trabajo¹.

Cepa	Genotipo	Fuente o referencia
DH5α	$\Delta(\text{argF-lac})169, \phi 80\text{dlacZ58(M15)}, \Delta\text{phoA8}, \text{glnX44(AS)}, \lambda, \text{deoR481}, \text{rfbC1}, \text{gyrA96(NalR)}, \text{recA1}, \text{endA1}, \text{thiE1}, \text{hsdR17}$	Meselson & Yuan 1968
BW25141/pKD4	$\Delta(\text{araD-araB})567, \Delta\text{lacZ4787}>::\text{rrnB-3}, \Delta(\text{phoB-phoR})580, \lambda, \text{galU95}, \Delta\text{uidA3}>::\text{pir}+, \text{recA1}, \text{endA9}(\text{del-ins})::\text{FRT}, \text{rph-1}, \Delta(\text{rhaD-rhaB})568, \text{hsdR514}, \text{bla}, \text{aph}$	Datsenko & Wanner 2000
GM2163/pKD46	$\text{araC14}, \text{leuB6(Am)}, \text{fhuA13}, \text{lacY1}, \text{tsx-78}, \text{glnX44(AS)}, \text{galK2(Oc)}, \text{galT22}, \lambda, \text{mcrA0}, \text{dcm-6}, \text{hisG4(Oc)}, \text{rfbC1}, \text{rpsL136}(\text{strR}), \text{dam-13}::\text{Tn9}, \text{xylA5}, \text{mtl-1}, \text{thiE1}, \text{mcrB9999}, \text{hsdR2}, \text{bla}, \text{gam-bet-exo}$	Marinus & Morris 1973
DH5α/pTZ57R/T ^{atoSC}	$\Delta(\text{argF-lac})169, \phi 80\text{dlacZ58(M15)}, \Delta\text{phoA8}, \text{glnX44(AS)}, \lambda, \text{deoR481}, \text{rfbC1}, \text{gyrA96(NalR)}, \text{recA1}, \text{endA1}, \text{thiE1}, \text{hsdR17}, \text{atoSC}, \text{lacZa}, \text{lacI}$	Este trabajo
DH5α/pVB1 ^{atoSC}	$\Delta(\text{argF-lac})169, \phi 80\text{dlacZ58(M15)}, \Delta\text{phoA8}, \text{glnX44(AS)}, \lambda, \text{deoR481}, \text{rfbC1}, \text{gyrA96(NalR)}, \text{recA1}, \text{endA1}, \text{thiE1}, \text{hsdR17}, \text{atoSC}, \text{xylS}, \text{trfA}$	Este trabajo
WT	$\text{stx1}, \text{stx2}, \text{iha}^p, \text{iha}^c, \text{atoSC}, \text{atoDAEB}$	Stock de laboratorio
WT/pKD46	$\text{stx1}, \text{stx2}, \text{iha}^p, \text{iha}^c, \text{atoSC}, \text{atoDAEB}, \text{bla}, \text{gam-bet-exo}$	Este trabajo
$\Delta(\text{atoSC})::\text{kan}$	$\text{stx1}, \text{stx2}, \text{iha}^p, \text{iha}^c, \text{atoSC}(\text{del-ins})::\text{aph}, \text{atoDAEB}$	Este trabajo
$\Delta(\text{atoSC})::\text{kan/pCP20}$	$\text{stx1}, \text{stx2}, \text{iha}^p, \text{iha}^c, \text{atoSC}(\text{del-ins})::\text{aph}, \text{atoDAEB}, \text{bla}, \text{cat}, \text{flp}$	Este trabajo
$\Delta(\text{atoSC})::\text{FRT}$	$\text{stx1}, \text{stx2}, \text{iha}^p, \text{iha}^c, \text{atoSC}(\text{del-ins})::\text{FRT}, \text{atoDAEB}$	Este trabajo
$\Delta(\text{atoSC})::\text{FRT/pVB1}$	$\text{stx1}, \text{stx2}, \text{iha}^p, \text{iha}^c, \text{atoSC}(\text{del-ins})::\text{FRT}, \text{atoDAEB}, \text{xylS}, \text{trfA}$	Este trabajo
$\Delta(\text{atoSC})::\text{FRT/pVB1}^{\text{atoSC}}$	$\text{stx1}, \text{stx2}, \text{iha}^p, \text{iha}^c, \text{atoSC}(\text{del-ins})::\text{FRT}, \text{atoDAEB}, \text{atoSC}, \text{xylS}, \text{trfA}$	Este trabajo

¹ Todas pertenecientes a la especie *E. coli*. *iha*^p: alelo plasmidial de *iha*. *iha*^c: alelo cromosomal de *iha*.

2.1.3 Transformación y preparación de células electrocompetentes

Las células electrocompetentes se prepararon inoculando al 1% (v/v) un volumen determinado de medio LB con un pre-inóculo de la cepa a transformar. El inóculo así preparado se cultivó a 37°C (30°C para la cepa WT/pKD46) con agitación permanente hasta una OD_{600nm} final de 0,4 ± 0,1. Al alcanzar la OD_{600nm} deseada, el cultivo se centrifugó a 4°C durante 10 min a 6000 rpm, para posteriormente realizar 3 lavados con agua milliQ estéril fría, resuspendiendo el sedimento obtenido en volúmenes decrecientes de agua. Luego del último lavado, las bacterias se resuspendieron en un volumen tal de agua que permitió concentrarlas 200 veces (por cada 10 mL de cultivo inicial, se conseguían 50 µL de bacterias electrocompetentes). Finalmente, se alicuotaron 50 µL de la suspensión bacteriana obtenida en tubos tipo Eppendorf de 1,7 mL y éstos fueron conservados en hielo hasta el momento de su uso.

La transformación se realizó incubando en hielo durante 30 min un tubo de células electrocompetentes con 50-100 ng de DNA plasmidial previamente dializado contra agua milliQ. Una vez finalizada tal incubación, las células fueron sometidas a una diferencia de potencial eléctrico de ~1,8 kV utilizando un equipo electroporador marca Eppendorf modelo 2510. Inmediatamente después de electroporar, las células fueron recuperadas en 1 mL de medio LB, cultivándolas con agitación permanente a 37°C durante 1 h (30°C para la cepa WT/pKD46). Finalmente, el cultivo fue concentrado por centrifugación (a RT durante 3 min a 13000 rpm) resuspendiendo el sedimento obtenido en 100 µL de sobrenadante. Este último volumen fue sembrado en placas de agar-LB conteniendo el suplemento respectivo. Las placas resultantes se incubaron a 37°C (30°C para la cepa WT/pKD46) durante 12-24 h.

2.1.4 Transformación y preparación de células quimiocompetentes

Las células quimiocompetentes se prepararon mediante una adaptación del método descrito por Inoue *et al.* (Inoue, *et al.* 1990). Esto se realizó inoculando al 1% (v/v) un volumen determinado de medio LB con un pre-inóculo de la cepa a transformar. El medio resultante fue incubado con agitación (180-250 rpm) a 37°C hasta alcanzar una OD_{600nm} ~ 0,3. Una vez alcanzada la OD_{600nm} deseada, el cultivo se incubó en hielo durante 10 min. Una vez finalizada la incubación, las células se colectaron por centrifugación a 4°C durante 10 min a 3000 rpm. El sobrenadante obtenido fue eliminado y el sedimento resuspendido suavemente en idéntico volumen de amortiguador de Inoue previamente enfriado. La composición del amortiguador fue; 55 mM MnCl₂, 75 mM CaCl₂, 250 mM KCl y 10 mM PIPES pH 6,7, conservado a 4°C hasta el momento de su uso. En la **Tabla II** se enlistan los reactivos químicos utilizados en la presente Memoria, así como su procedencia. Al cabo de 10 min de incubación en hielo, se realizaron 2 lavados, resuspendiendo el sedimento obtenido en volúmenes decrecientes de amortiguador de Inoue. Luego del último lavado, las bacterias se resuspendieron en un volumen tal de amortiguador que permitió concentrarlas 10 veces (por cada 2 mL de cultivo inicial se conseguían 200 µL de bacterias quimiocompetentes). La suspensión resultante fue incubada en hielo durante 30 min antes de agregar 70 µL de DMSO por mL de suspensión, mezclando suavemente e incubando la mezcla resultante en hielo durante 10 min. Finalmente, se alicuotaron 200 µL de la suspensión bacteriana obtenida en tubos Eppendorf de 1,7 mL y éstos fueron conservados a -80°C hasta el momento de su uso.

La transformación se realizó incubando en hielo durante 30 min un tubo de células quimiocompetentes con 50-100 ng de DNA plasmidial. Una vez finalizada esta incubación, las células fueron expuestas sin agitación a una temperatura de 42°C durante 45 s, para posteriormente ser incubadas en hielo durante 2 min. Al cabo de este periodo, las células fueron recuperadas en 1 mL de medio LB, cultivándolas con agitación permanente a 37°C durante 1 h.

Finalmente, el cultivo fue concentrado por centrifugación (a RT durante 3 min a 13000 rpm), resuspendiendo el sedimento obtenido en 100 μ L de sobrenadante. Este último volumen fue sembrado en placas de agar-LB conteniendo el suplemento respectivo. Las placas resultantes se incubaron a 37°C (30°C para la cepa $\Delta(atoSC)::kan$) durante 12-24 h.

Tabla II. Reactivos químicos utilizados en este trabajo.

Nombre	Procedencia	Nombre	Procedencia
Acetato de sodio	Merck Química Chilena Soc. Ltda.	Etanol	Merck Química Chilena Soc. Ltda.
Acetoacetato de litio	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU)	Fenol ácido	Winkler Química Ltda.
Ácido acético	Merck Química Chilena Soc. Ltda.	Glicerol	Merck Química Chilena Soc. Ltda.
Ácido m-toluico	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU)	IPTG	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU)
Ampicilina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU)	Isopropanol	Merck Química Chilena Soc. Ltda.
Azul de bromofenol	Merck Química Chilena Soc. Ltda.	Kanamicina	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU)
Bromuro de etidio	Merck Química Chilena Soc. Ltda.	L-arabinosa	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU)
Butirato de sodio	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU)	Metanol	Merck Química Chilena Soc. Ltda.
Cloranfenicol	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU)	MOPS	Merck Química Chilena Soc. Ltda.
Cloroformo	Merck Química Chilena Soc. Ltda.	PIPES	Merck Química Chilena Soc. Ltda.
Cloruro de calcio	Merck Química Chilena Soc. Ltda.	Propionato de sodio	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU)
Cloruro de manganeso	Merck Química Chilena Soc. Ltda.	SDS	Merck Química Chilena Soc. Ltda.
Cloruro de sodio	Merck Química Chilena Soc. Ltda.	SYBR Green	Agilent Genomics
Cloruro de potasio	Merck Química Chilena Soc. Ltda.	Tris	Merck Química Chilena Soc. Ltda.
DEPC	Winkler Química Ltda.	Tritón X-100	Merck Química Chilena Soc. Ltda.
DMSO	Winkler Química Ltda.	X-gal	Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU)
EDTA	Merck Química Chilena Soc. Ltda.	β -mercaptoetanol	Merck Química Chilena Soc. Ltda.

2.2 CLONAMIENTOS Y GENERACIÓN DE MUTANTES

2.2.1 Extracción de DNA genómico y plasmidial

La extracción de DNA genómico se realizó mediante distintos métodos, atendiendo tanto al uso futuro de tales muestras como al soporte físico de la matriz (tipo de cultivo). Las muestras provenientes de cultivo en medio sólido se obtuvieron picando directamente la colonia aislada en placas de agar-LB y/o agar-LB suplementado y resuspendidas en 200 μ L de Tritón X-100 0,5% (v/v). La mezcla resultante se agitó con vórtex durante 15 s y se incubó a 100°C durante 5 min. Este último paso se repitió en dos ocasiones. Finalmente, se centrifugó a RT durante 8 min a 8000 rpm. El sobrenadante así obtenido se conservó a -20°C hasta el momento de su uso. Las muestras provenientes de cultivo en medio líquido se obtuvieron generando una dilución 1:40 del medio de cultivo en agua destilada estéril, para posteriormente ser hervida a 99°C durante 10 min. La solución así obtenida se conservó a -20°C hasta el momento de su uso.

La obtención de DNA plasmidial se realizó utilizando el kit comercial Wizard® Plus SV Minipreps (Promega) o el kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante correspondiente. Los plásmidos así obtenidos se conservaron a -20°C hasta el momento de su uso. La **Tabla III** resume los plásmidos utilizados en el presente trabajo, así como sus principales características.

Tabla III. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características	Fuente o referencia
pKD4	<i>oriR6Kγ, bla, aph</i>	Datsenko & Wanner 2000
pKD46	<i>oriR101 (repA101ts), bla, gam-bet-exo¹ (paraB/araC)</i>	Datsenko & Wanner 2000
pCP20	<i>oriR101 (repA101ts), bla, cat, flp¹ (pλ/ci857)</i>	Cherepanov & Wackernagel 1995
pTZ57R/T	<i>ori_{pMB1}, oriF1, pT7, bla, lacZα</i>	Thermo Fisher Scientific
pTZ57R/T ^{atoSC}	<i>ori_{pMB1}, oriF1, pT7, bla, lacZα::atoSC</i>	Este trabajo
pVB1	<i>oriRK2 (trfA), oriT, bla, MCS (pm/xylS)</i>	Dualsystems Biotech
pVB1 ^{atoSC}	<i>oriRK2 (trfA), oriT, bla, atoS-atoC¹ (pm/xylS)</i>	Este trabajo

¹ Inducible.

2.2.2 Herramientas bioinformáticas

La secuencia de referencia utilizada en la presente Memoria se obtuvo a partir de la secuencia parcial de la cepa O91:H21 2009C-3740 reportada por Lindsey *et al.*, obtenida de un caso clínico humano en USA y depositada en NCBI (código de acceso: JASQ000000000.1) (Lindsey, *et al.* 2014). Para el caso particular del alelo plasmidial de *iha*, se utilizó la secuencia presente en el plásmido de virulencia pO113, disponible en la misma base de datos (código de acceso: AY258503.2). El diseño de partidores se realizó utilizando el programa Vector NTI Advance™ 11.0. Tanto para el diseño de clonamientos como para el diseño de generación de mutantes se utilizaron las herramientas de libre acceso; ORF Finder, NebCutter Versión 2.0, PlasMapper y el programa Serial Cloner Versión 2.6.1. La búsqueda de terminadores de la transcripción se realizó usando el algoritmo ARNold (Naville, *et al.* 2011). La comparación de secuencia entre ambos alelos de *iha* se realizó utilizando la herramienta BLAST.

2.2.3 PCR, PCR de colonia y RT-PCR convencional

Las reacciones de PCR se realizaron siempre en un volumen final de 25 µL. La composición de la mezcla de reacción fue; 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 400 nM de cada partidor y 0,625 U de DNA polimerasa GoTaq® G2 flexi (Promega) disueltos en agua grado biología molecular, utilizando el amortiguador correspondiente. Como templado se utilizó 0,5 µL de DNA plasmidial para el caso de vectores puros, 0,5 µL de cDNA para el caso de RT-PCR convencional, o 1 µL de DNA genómico para el caso de PCR de colonia. Para el RT-PCR convencional, y como control experimental, se utilizó la expresión asociada al gen *rrsH* (Herold, *et al.* 2009). Tanto los partidores utilizados como los programas de cada reacción de amplificación se detallan en la **Tabla IV** y **V**, respectivamente.

Tabla IV. Partidores utilizados en este trabajo.

Partidor	Secuencia [5'--- 3']	Complementariedad/ Uso	Fuente o referencia
16SF	CCT ACG GGA GGC AGC AG	ORF <i>rrsH</i> . Detección del transcrito del gen control <i>rrsH</i> .	Stock de laboratorio
16SR	CCC CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT	ORF <i>rrsH</i> . Detección del transcrito del gen control <i>rrsH</i> .	Stock de laboratorio
atof1	CAT ATG AAT TAT ATA AAG TGG ATT TAC CCA CGC	ORF <i>atoS</i> . Inserción del sitio NdeI . Clonamiento operón <i>atoSC</i> .	Este trabajo
atof4	ATA CCG TAT TCC TGG AGT TTA TAC ATC AAT GTG TAG GCT GGA GCT GCT TC	ORF <i>aph</i> flanqueante. Inserción <u>región 3' del ORF de <i>atoC</i></u> . Mutagénesis.	Este trabajo
atof5	CAA TCA GAA ATG GAA GTT TGG G	Promotor <i>atoS</i> . Confirmación de mutagénesis.	Este trabajo
atof6	GGA TGA TGA AGA TAA TGT TCG CCG	ORF <i>atoC</i> . Detección del transcrito del operón <i>atoSC</i> .	Este trabajo
atof7	GCC AAT GGC TTA TAT GCG TG	ORF <i>atoE</i> . Detección del transcrito del operón <i>atoDAEB</i> .	Este trabajo
ator1	GGA TCC TCA TAC AGT CTG ATT TCC CT	ORF <i>atoS</i> . Generación sonda control ensayo restricción <i>ihA</i> (con atof1).	Este trabajo
ator2	GGA TCC TTA TAC ATC CGC CGG	ORF <i>atoC</i> . Inserción del sitio BamHI . Clonamiento operón <i>atoSC</i> .	Este trabajo
ator4	TGT ATA CAG GAC AAT ATT AGT GGA TCT CAG CAT ATG AAT ATC CTC CTT AG	ORF <i>aph</i> flanqueante. Inserción <u>región 5' UTR de <i>atoS</i></u> . Mutagénesis.	Este trabajo
ator5	CTT GAC CAT TGA CGA TGA GC	ORF <i>atoD</i> . Confirmación de mutagénesis.	Este trabajo
ator6	CGT CAG GGT GAA TAT CGG CA	ORF <i>atoC</i> . Detección del transcrito del operón <i>atoSC</i> .	Este trabajo
ator7	GGT GTC TTT GTT CGC AAC ATTG	ORF <i>atoE</i> . Detección del transcrito del operón <i>atoDAEB</i> .	Este trabajo
FRT-fur	ACA ATA CCG CCC TAA AGA AAG C	ORF <i>fur</i> . Detección del transcrito de <i>fur</i> .	Stock de laboratorio
FRT-rpoA	GCG CTC ATC TTC TTC CGA AT	ORF <i>rpoA</i> . Detección del transcrito del gen calibrador <i>rpoA</i> .	Stock de laboratorio
ihaf2	GCT GAA TGC TGC TGT GAA TAA TG	ORF <i>ihA</i> . Detección del transcrito del alelo plasmidial de <i>ihA</i> .	Este trabajo
ihar1	TCC CGT CTG GAA GTA ATC ACC	ORF <i>ihA</i> . Detección del transcrito del alelo plasmidial de <i>ihA</i> .	Este trabajo
ihA-RT-for	TTT CAG CCA GCA GCA TGG CA	ORF <i>ihA</i> . Detección del transcrito del alelo cromosomal de <i>ihA</i> .	Stock de laboratorio
ihA-RT-rev	ACA TCC ACA CCC TCC ACA GC	ORF <i>ihA</i> . Detección del transcrito del alelo cromosomal de <i>ihA</i> .	Stock de laboratorio
k1	CAG TCA TAG CCG AAT AGC CT	ORF <i>aph</i> . Confirmación de mutagénesis.	Datsenko & Wanner 2000
k2	CGG TGC CCT GAA TGA ACT GC	ORF <i>aph</i> . Confirmación de mutagénesis.	Datsenko & Wanner 2000
kt	CGG CCA CAG TCG ATG AAT CC	ORF <i>aph</i> . Confirmación de mutagénesis.	Datsenko y Wanner 2000
M13F	GTA AAA CGA CGG CCA GT	ORF <i>lacZa</i> . Confirmación de insertos en pTZ57R/T.	Thermo Fisher Scientific
M13R	GCG GAT AAC AAT TTC ACA CAG G	ORF <i>lacZa</i> . Confirmación de insertos en pTZ57R/T.	Thermo Fisher Scientific
pVB1F	GAT AGG GAT AAG TCC AGC CT	Promotor pVB1. Confirmación de insertos en pVB1.	Stock de laboratorio
pVB1R	CGG TGG ATG ACC TTT TGA AT	Terminador pVB1. Confirmación de insertos en pVB1.	Stock de laboratorio
RRT-fur	GCT GTG TCA GTT CAA ATA CGG A	ORF <i>fur</i> . Detección del transcrito de <i>fur</i> .	Stock de laboratorio
RRT-rpoA	CGC GGT CGT GGT TAT GTG	ORF <i>rpoA</i> . Detección del transcrito del gen calibrador <i>rpoA</i> .	Stock de laboratorio

Tabla V. Programas de termociclado utilizados en este trabajo.

Nombre	Detalle del programa		
	Temperatura [°C]	Tiempo	N° de ciclos
PCR1	95	2 min	1
	95	30 s	30
	55	30 s	
	72	2 min	
	72	2 min	1
PCR2	95	5 min	1
	95	45 s	5
	50	30 s	
	72	4 min	
	95	45 s	25
	55	30 s	
	72	4 min	
72	5 min	1	
PCR3	95	5 min	1
	95	30 s	30
	50	30 s	
	72	4 min	
	72	5 min	1
PCR4	25	10 min	1
	42	60 min	1
	70	10 min	1
PCR5	95	5 min	1
	95	30 s	30
	53	30 s	
	72	30 s	
	72	5 min	1
PCR6	95	10 min	1
	95	30 s	40
	55	15 s	
	72	15 s	
	Curva de Fusión		
	95	1 min	1
	55	30 s	
	95	30 s	

2.2.4 Generación de mutantes

La cepa mutante con una delección específica en el operón *atoSC*: $\Delta(\textit{atoSC})::\text{FRT}$, fue generada utilizando el método basado en el sistema de recombinación Red del fago Lambda (Datsenko & Wanner 2000). El *cassette* de resistencia a kanamicina fue amplificado usando como templado el plásmido pKD4, mediante la utilización del programa PCR1 y los partidores *atof4-ator4* (plásmido purificado desde la cepa BW25141/pKD4). El producto de PCR así obtenido, fue resuelto y purificado a partir de un gel de agarosa 1,2% (m/v), utilizando el kit comercial E.Z.N.A® Gel Extraction (Omega). El producto purificado, fue dializado contra agua milliQ y almacenado a -20°C hasta el momento de su uso.

La obtención de la cepa mutante se realizó mediante la generación sucesiva de las cepas; WT/pKD46, $\Delta(\textit{atoSC})::\textit{kan}$, $\Delta(\textit{atoSC})::\textit{kan}/\text{pCP20}$ y $\Delta(\textit{atoSC})::\text{FRT}$. La cepa WT/pKD46 se generó transformando células quimiocompetentes de la cepa silvestre con el plásmido pKD46, el cual codifica el sistema de recombinación Red del fago λ bajo el control del promotor de arabinosa (plásmido a su vez purificado desde la cepa GM2163/pKD46). La transformación se realizó como se describe en la sección 2.1.4. La colonia transformante deseada fue aislada de placas agar-LB-ampicilina, previamente cultivadas a 30°C durante toda la noche.

La cepa $\Delta(\textit{atoSC})::\textit{kan}$ se generó transformando células electrocompetentes de la cepa antes obtenida, con el producto de PCR mencionado al comienzo. La inducción del vector pKD46 se realizó al momento de preparar las células electrocompetentes, incubando en agitación un inóculo de la cepa WT/pKD46 en medio LB-ampicilina suplementado con 10 mM de L-arabinosa, a 30°C y detenido a una $\text{OD}_{600\text{nm}}$ final de 0,4. La transformación se realizó como se describe en la sección 2.1.3. La colonia mutante deseada fue aislada de placas agar-LB-kanamicina, previamente cultivadas a 37°C durante toda la noche.

La cepa $\Delta(atoSC)::kan/pCP20$ se generó transformando células quimiocompetentes de colonias Amp^S de la cepa antes obtenida con el plásmido auxiliar pCP20, el cual codifica la recombinasa Flp de *Saccharomyces cerevisiae* bajo el control del promotor λ (Cherepanov & Wackernagel 1995). La transformación se realizó como se describe en la sección **2.1.4**. La inducción del vector pCP20 se realizó incubando la cepa transformante en placas de agar-LB a 42°C durante 1,5 h, para posteriormente ser incubadas toda la noche a 37°C. La colonia mutante deseada $\Delta(atoSC)::FRT$ fue aislada de placas agar-LB, previamente cultivadas a 37°C durante toda la noche. Todas las cepas fueron confirmadas mediante PCR, usando el programa PCR3. Las reacciones realizadas y sus resultados se muestran en la sección **3.1.1**.

2.2.5 Clonamiento del operón *atoSC*

Con la finalidad de complementar el operón *atoSC* en la cepa mutante $\Delta(\textit{atoSC})::\text{FRT}$, este operón fue amplificado desde la cepa WT utilizando el programa PCR2 y los partidores *atof1-ator2*, logrando la inserción de los sitios *NdeI-BamHI* en su secuencia. El producto de amplificación obtenido fue resuelto y purificado en geles de agarosa 1% (m/v) amortiguador TAE, usando el kit comercial E.Z.N.A® Gel Extraction (Omega). Este producto se insertó en el vector de clonamiento comercial pTZ57R/T® (**Figura 3**) mediante ligación tipo TA, generando el plásmido pTZ57R/T^{*atoSC*}. Para efecto de la ligación, el producto de PCR purificado fue previamente adenilado *in vitro*, utilizando la propiedad intrínseca 3' adenilante de la polimerasa GoTaq® G2 flexi (Promega). La reacción de adenilación se realizó en un volumen final de 10 μL y su composición fue: 0,2 mM dATP, 1,5 mM MgCl_2 , 5 μL del producto de PCR purificado y 5 U de enzima, diluidos en el amortiguador correspondiente. La mezcla de ligación resultante se utilizó para transformar células quimiocompetentes de la cepa DH5 α , generando la cepa DH5 α /pTZ57R/T^{*atoSC*}. La transformación se realizó como se describe en la sección 2.1.4. La colonia transformante deseada fue aislada desde placas agar-LB-ampicilina-X-gal, previamente cultivadas a 37°C, y conservada a -80°C hasta el momento de su uso. La construcción fue confirmada mediante PCR de colonia, utilizando el programa PCR3 y los partidores M13F-M13R.

Para el clonamiento del operón *atoSC* en la cepa mutante, se utilizó el vector de expresión pVB1 (**Figura 3**). La construcción del plásmido pVB1^{*atoSC*} se inició realizando una digestión doble con *NdeI-BamHI* de los plásmidos pTZ57R/T^{*atoSC*} y pVB1. La digestión del vector pTZ57R/T^{*atoSC*} liberó dos fragmentos similares en tamaño (~3 kb), por lo que previo a la reacción de ligación la mezcla de digestión fue dializada contra agua milliQ y nuevamente digerida, utilizando los sitios *HindIII-KpnI* presentes en pTZ57R/T. Esto se realizó con la finalidad de digerir el fragmento del vector pTZ57R/T permitiendo la purificación del fragmento *atoSC*.

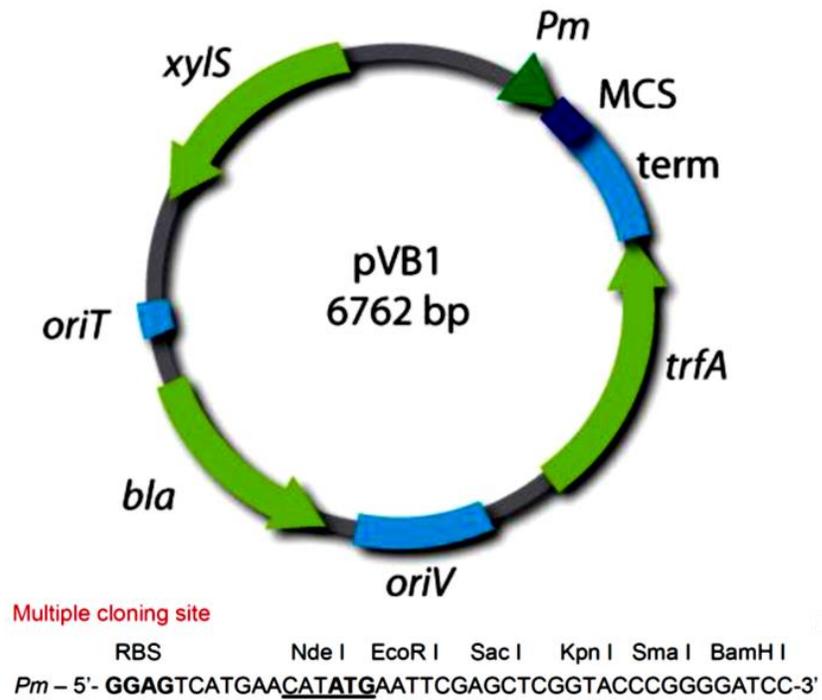
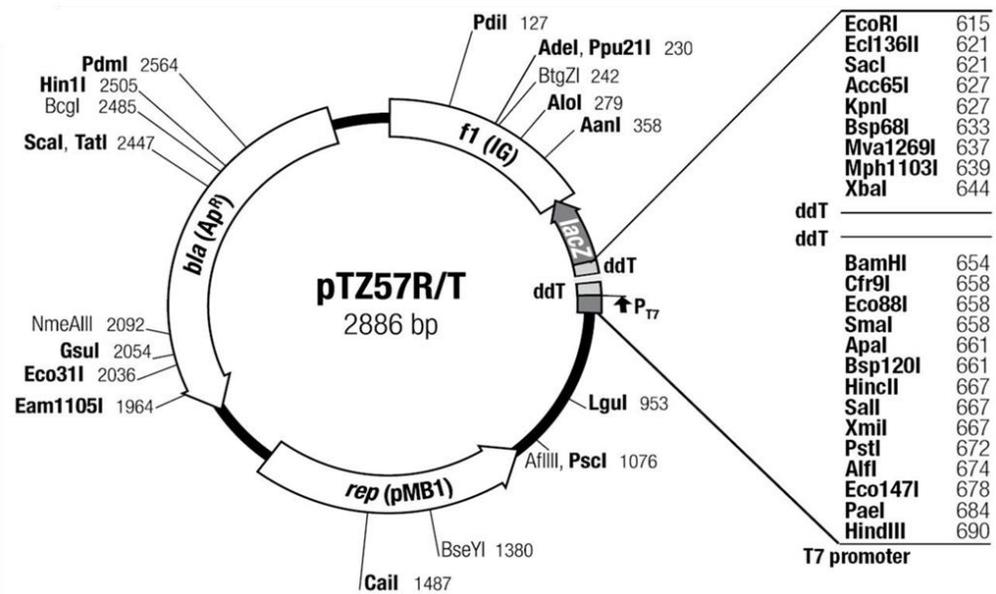


Figura 3. Plásmidos utilizados en el clonamiento del operón *atoSC*. Los sitios de múltiple clonamiento se detallan en cada plásmido.

El plásmido pBV1^{atoSC}, se obtuvo mediante la ligación *in vitro* del fragmento purificado de pTZ57R/T^{atoSC} (aquel que contenía los ORFs del operón *atoSC*) con el plásmido pVB1 lineal obtenido en paralelo, previamente purificado en geles de agarosa 1% (m/v) amortiguador TAE, usando el kit comercial E.Z.N.A® Gel Extraction (Omega). La mezcla de ligación resultante se utilizó para transformar células quimiocompetentes de la cepa DH5 α , generando la cepa DH5 α /pVB1^{atoSC}. La colonia transformante deseada fue aislada desde placas agar-LB-ampicilina, previamente cultivadas a 37°C, y conservada a -80°C hasta el momento de su uso. La construcción fue confirmada mediante PCR de colonia utilizando el programa PCR3 y los partidores pVB1F-pVB1R. La complementación de la cepa mutante Δ (*atoSC*)::FRT, se realizó transformando células quimiocompetentes de esta cepa con el plásmido pVB1^{atoSC}, previamente purificado desde la cepa DH5 α /pVB1^{atoSC}. La colonia transformante deseada fue aislada desde placas agar-LB-ampicilina, previamente cultivadas a 37°C, y conservada a -80°C hasta el momento de su uso. Ambas transformaciones se realizaron como se describe en la sección **2.1.4** usando, para el caso de la cepa DH5 α , el volumen total de la mezcla de ligación. La confirmación de la cepa mutante complementada se realizó mediante RT-PCR convencional, evaluando la expresión asociada a los operones *atoSC* y *atoDAEB* tras la inducción del vector pVB1^{atoSC} con 2 mM de ácido toluico, amplificando los genes constituyentes respectivos *atoC* y *atoE* (Kyriakidis & Tiligada 2009). Los resultados se presentan en la sección **3.1.3**.

Las reacciones de digestión se realizaron siempre utilizando 10 U de enzima a 37°C durante 1-5 h en el amortiguador correspondiente, mientras que para las reacciones de ligación se utilizó siempre una razón molar vector-inserto de 1:3, 5 U de DNA ligasa del fago T4 (Thermo Fisher Scientific) y 100 ng de vector como mínimo, a 4°C durante toda la noche en el amortiguador correspondiente.

2.3 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA

2.3.1 Ensayo de incubación con SCFAs

El contenido de SCFAs en el colon fue emulado utilizando una mezcla de 95 mM acetato de sodio, 60 mM propionato de sodio y 17 mM butirato de sodio (Herold, *et al.* 2009). El ensayo de incubación se realizó como sigue. A partir de un cultivo O.N. de la cepa a ensayar se prepararon inóculos al 1% (v/v) de 5 mL de medio LB y se cultivaron a una OD_{600nm} final de $0,25 \pm 0,05$ a 37°C con agitación permanente. Una vez alcanzada la OD_{600nm} deseada, los cultivos fueron centrifugados a 4°C durante 15 min a 6000 rpm. Una vez descartado el sobrenadante, el sedimento fue resuspendido en idéntico volumen de medio LB-MOPS 100 mM pH 6,7 carente de NaCl, para el caso de los ensayos con SCFAs, y en idéntico volumen de medio LB-MOPS 100 mM pH 6,7 con NaCl, para el caso de los ensayos sin SCFAs, con la finalidad de asegurar que tanto el pH como la osmolaridad del medio resultante fueran equivalentes. Los cultivos así obtenidos fueron suplementados con SCFAs y/o acetoacetato de litio 10 mM, dependiendo de la condición evaluada, y cultivados en agitación a 37°C durante 3 h a 180 rpm. Si bien la exposición a SCFAs retrasó la proliferación celular, todos los cultivos ensayados se encontraban en la misma fase de crecimiento al momento de finalizar el ensayo.

2.3.2 Purificación de RNA

La purificación de RNA bacteriano se realizó a partir de 1-5 mL de cultivo proveniente del ensayo de incubación con SCFAs. A éste se le agregaron 250 μ L (por cada 1 mL de cultivo ensayado) de una solución estabilizadora de 5% (v/v) fenol ácido y 95% (v/v) etanol absoluto y fue incubado en hielo durante 15 min, para posteriormente ser centrifugado a 4°C durante 15 min a 6000 rpm. Una vez finalizada la centrifugación se desechó el sobrenadante. El sedimento así obtenido fue resuspendido en 20 μ L de amortiguador TE (por cada 1 mL de cultivo ensayado), suplementado en el momento con Triton X-100 0,5% (v/v) y 140 mM β -mercaptoetanol para posteriormente ser incubado a RT durante 5 min con la finalidad de promover la lisis celular.

La composición del amortiguador TE fue: 1,0 mM EDTA y 10 mM Tris pH 7,4, y fue conservado a 4°C hasta el momento de su uso. La extracción se inició agregando 500 µL de reactivo Trizol® (Thermo Fisher Scientific) por cada 1 mL de cultivo ensayado. Al cabo de 5 min de incubación a RT se inició la etapa de separación de fases. Para esto, las muestras fueron incubadas durante 3 min con 100 µL de cloroformo. La mezcla resultante fue centrifugada, a 4°C durante 15 min a 12000 rpm, para finalmente recuperar la fase acuosa de las fases resultantes. Los ácidos nucleicos totales fueron precipitados incubando la fase acuosa con 250 µL de isopropanol frío durante 10 min a RT. El precipitado fue recuperado por centrifugación, a 4°C durante 13 min a 13000 rpm, y posteriormente lavado con 500 µL de una solución de etanol al 75% (v/v). La mezcla resultante fue centrifugada a 4°C durante 8 min a 9000 rpm. Finalmente, el precipitado fue secado a RT y resuspendido en 20-30 µL de agua tratada con DEPC.

El RNA así obtenido fue cuantificado usando un equipo lector de microplacas multifuncional modelo Synergy (Bio Tek, USA) y posteriormente resuelto en geles de agarosa 1% (m/v) amortiguador TAE, en los cuales se observaron dos bandas distintivas correspondientes a los RNAs ribosomales 16S y 23S, revelando la integridad del RNA obtenido (Farnsworth, *et al.* 2004). En todos los procedimientos de purificación se obtuvieron rendimientos superiores a los 20 µg de ácidos nucleicos totales por cada 1,5 mL de cultivo ensayado. El RNA así obtenido se conservó a -80°C hasta el momento de su uso.

2.3.3 Obtención de cDNA

Para eliminar el posible DNA contaminante, las muestras de RNA fueron sometidas a un tratamiento con DNAsa. El tratamiento se realizó a partir de 4 µg de ácidos nucleicos totales por condición, utilizando el kit comercial TURBO DNA-free™ (Ambion) siguiendo las instrucciones del fabricante con las siguientes modificaciones: se utilizaron 3 U de DNAsa por reacción y el tratamiento se prolongó durante 45-60 min. La reacción de retrotranscripción se inició con 3,5 µL del producto de digestión con DNAsa (~1 µg de RNA total), tanto para la reacción de la muestra experimental como para la reacción del control de retrotranscripción carente de transcriptasa reversa, en un volumen final de 20 µL usando 3 µg de partidores al azar, 500 µM de dNTPs y 200 U de transcriptasa reversa RevertAid® (Thermo Fisher Scientific) diluidos en el amortiguador correspondiente. La reacción de retrotranscripción se realizó a 42°C y se extendió durante 1 h utilizando el programa PCR4. La mezcla final de reacción se conservó a -20°C hasta el momento de su uso.

2.3.4 Evaluación de la expresión génica mediante qRT-PCR

La abundancia relativa de mRNAs particulares presentes en cada condición en estudio fue evaluada mediante qRT-PCR, teniendo en consideración las sugerencias presentadas en la guía MIQE (Bustin, *et al.* 2009). Para esto, el cDNA obtenido fue cuantificado y dializado en agua milliQ estéril durante 15-30 min, utilizando membranas de 0,025 µm de poro (Merck Millipore). La cuantificación se realizó en duplicado usando un equipo lector de microplacas multifuncional modelo Synergy (Bio Tek, USA). El cDNA dializado se conservó a -20°C hasta el momento de su amplificación. Las curvas de amplificación se obtuvieron utilizando 200 ng de templado y 600 nM de cada partidador usando el kit comercial fluorescente Brilliant II SYBR® Green qPCR Master Mix (Equipo AriaMX de Agilent Genomics). Como gen calibrador se utilizó la expresión asociada al gen *rpoA* (Sharma & Bearson 2013). La expresión asociada a los operones *atoSC* y *atoDAEB* fue evaluada amplificando los genes constituyentes respectivos *atoC* y *atoE* (Kyriakidis & Tiligada 2009). Cada muestra fue amplificada en duplicado utilizando el programa PCR6.

La especificidad de los productos así obtenidos fue evaluada tanto por el análisis de las curvas de fusión como mediante su resolución en geles de agarosa 3% (m/v) amortiguador TAE. Los valores de Ct fueron obtenidos usando el programa Agilent AriaMx Versión 1.0. Se consideraron como válidas aquellas curvas en las cuales tanto el ΔC_t (NT) como el ΔC_t (NRT) ≥ 5 . La comparación de los niveles de expresión de un mismo gen bajo distintas condiciones experimentales se realizó sólo cuando el $\Delta C_{tN} \leq 1$ (Bustin, *et al.* 2009). La evaluación de la cantidad relativa de los diversos mRNAs se realizó mediante la aproximación matemática de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak & Schmittgen 2001). El análisis estadístico de los valores así obtenidos se realizó de manera individual e independiente, comparando cada condición experimental con su respectiva condición control aplicando la prueba *t* de Student, previo contraste de normalidad de los datos mediante el test Shapiro-Wilk. Ambas pruebas se aplicaron usando el programa Sigma Plot Versión 12.0, estableciéndose los siguientes valores de corte de significancia; $p < 0,001$, $p < 0,005$, $p < 0,05$ (siempre señalados en las figuras). El cálculo de eficiencia de amplificación para cada pareja de partidores se realizó de manera experimental, generando curvas de calibración usando la aproximación matemática revisada en Higuchi *et al.* (Higuchi, *et al.* 1993). Los valores así obtenidos se resumen en la **Tabla VI**.

Tabla VI. Parámetros de amplificación en tiempo real.

Gen	Sensibilidad ¹	Eficiencia ² [%]	Coefficiente de Correlación [R ²]
<i>iha</i> , alelo cromosomal	2,76	115	0,991
<i>iha</i> , alelo plasmidial	3,29	100	0,994
<i>atoC</i>	3,32	100	0,992
<i>atoE</i>	3,34	99,5	0,994
<i>fur</i>	3,33	99,5	0,995
<i>rpoA</i>	2,96	109	0,997

¹ Entendida como la diferencia de Cts existente entre cada dilución seriada.

² Asignando el valor de 100% a la máxima eficiencia teórica posible.

2.3.5 Ensayo de restricción de *iha*

Para confirmar la identidad de los amplicones obtenidos para cada alelo de *iha* se realizó un ensayo de restricción (**Figura 4**). El ensayo se realizó sometiendo cada amplicón a tres reacciones de digestión. El amplicón proveniente del alelo cromosomal de *iha* (AC), fue ensayado usando las enzimas *HpaII*, *AluI* y *HaeIII*. El amplicón proveniente del alelo plasmidial (AP), fue ensayado usando las enzimas *HpaII*, *NaeI* y *BspMI*. Puesto que se espera que las enzimas *HaeIII* y *BspMI* no digieran el amplicón correspondiente, se generó una sonda (S) que tenía ambos sitios, con el fin de ser utilizada como sustrato control positivo de actividad endonucleasa en los ensayos de *HaeIII* y *BspMI*.

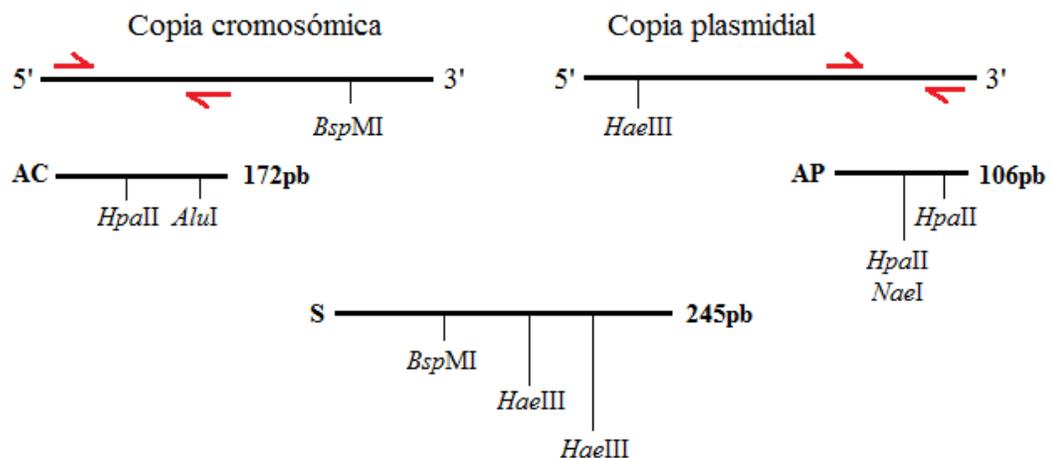


Figura 4. Diseño del ensayo de restricción de *iha*.

La figura muestra la orientación de los sitios de corte presentes en los amplicones provenientes tanto del alelo cromosomal (AC) como del alelo plasmidial (AP) de *iha*. Los partidores usados en cada amplificación se muestran en rojo. S: sonda sustrato usada como control positivo de actividad endonucleasa para las enzimas *HaeIII* y *BspMI*.

Esta sonda se generó a partir de la amplificación del ORF de *atoS* utilizando el programa PCR2 y los partidores atof1-ator1. El producto de amplificación (~1,7 kb) fue resuelto y purificado en geles de agarosa 1,2% (m/v) amortiguador TAE, para posteriormente ser dializado contra agua milliQ y digerido en dos etapas utilizando los sitios *HaeII* y *HpaII* presentes en su secuencia. El producto de digestión (~250 pb) fue purificado utilizando el kit comercial E.Z.N.A® Gel Extraction (Omega), y guardado a -20°C hasta el momento de su uso. Las mezclas de digestión, pertenecientes al ensayo de restricción como tal, fueron resueltas en geles de agarosa 3% (m/v) amortiguador TAE y visualizadas mediante tinción con bromuro de etidio. Cada reacción se inició con 30 ng de DNA sustrato y 5-10 U de enzima o su equivalente (para el caso de las enzimas de acción rápida). Para el caso de la enzima *BspMI*, el medio de reacción fue suplementado con oligonucleótidos provistos por el fabricante (Thermo Fisher Scientific) a una concentración final de 500 nM. Los resultados del ensayo se presentan en la sección **3.2.1**.

3. RESULTADOS

3.1 EVALUAR SI EL SISTEMA AtoS-AtoC ES ACTIVADO POR SCFAS

3.1.1 Tanto el activador acetoacetato como el sistema AtoS-AtoC son necesarios para la expresión del operón *atoDAEB*

Jenkins & Nunn informan que la presencia de acetoacetato activa al sistema AtoS-AtoC, el cual una vez activo promueve la expresión del operón *atoDAEB* (Jenkins & Nunn 1987). A pesar de esto, se desconoce el efecto que tiene la presencia de acetoacetato sobre la expresión del operón *atoSC*, operón codificante del sistema AtoS-AtoC. Con la finalidad de caracterizar la activación del sistema AtoS-AtoC, se evaluó el efecto que tenía la presencia del activador acetoacetato sobre la expresión de ambos operones. La investigación de este efecto se realizó a nivel transcripcional, determinando la expresión de los genes constituyentes *atoC* (operón *atoSC*) y *atoE* (operón *atoDAEB*) en presencia y ausencia del activador acetoacetato. Para probar que en la cepa silvestre la expresión del operón *atoDAEB* era causada por la activación del sistema AtoS-AtoC, en este trabajo se generó la cepa mutante isogénica $\Delta(\textit{atoSC})::\textit{FRT}$ la cual carece del operón codificante del sistema AtoS-AtoC (**Figura 5**). El experimento se realizó mediante RT-PCR convencional, determinando la expresión de los genes *atoC* y *atoE* tanto en la cepa silvestre como en la cepa mutante (**Figura 6**). En la cepa silvestre (columnas 1 y 2), el gen *atoC* se expresa constitutivamente a diferencia del gen *atoE*, el cual requiere la presencia del activador acetoacetato para su expresión. Esto prueba que la presencia del activador es una condición necesaria para la expresión del operón *atoDAEB* y además sugiere que la presencia del activador no influye en la actividad transcripcional del operón *atoSC*. En la cepa mutante (columnas 3 y 4), no existe expresión asociada a ninguno de los genes.

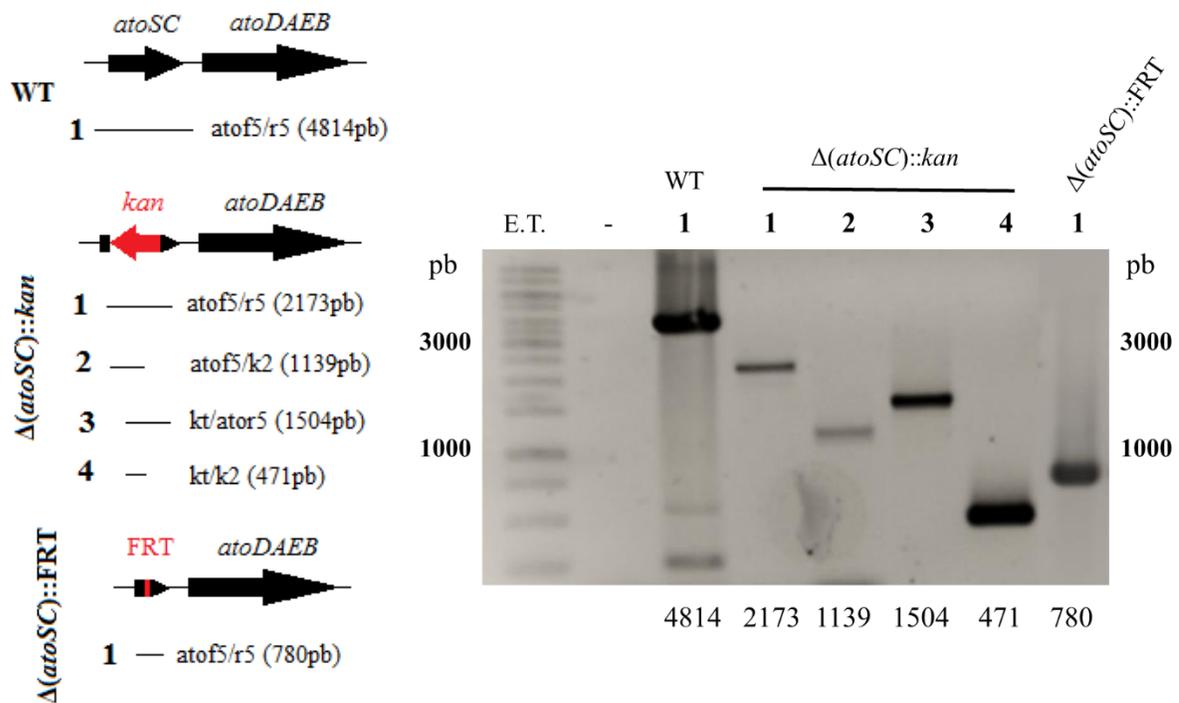


Figura 5. Confirmación del método de generación de mutantes mediante PCR de colonia.

La figura muestra tanto la cepa como la pareja de partidores utilizada en cada reacción de amplificación. En el gel, los números señalan una de las parejas de partidores definidas a lado izquierdo. En la parte inferior, se indica el tamaño molecular del producto de amplificación esperado. E.T.: estándar de tamaño molecular; -: control de amplificación, blanco de templado.

En esta cepa, la no detección del transcrito de *atoC* prueba la correcta remoción del operón *atoSC* mientras que la no detección del transcrito de *atoE* en presencia del activador acetoacetato, prueba que la expresión del operón *atoDAEB* observada en la cepa silvestre ocurre de manera AtoS-AtoC dependiente. Para demostrar que los amplicones observados indicaban expresión y no solo presencia de los genes evaluados, se intentó amplificar el RNA purificado para cada condición (marcado como RNA, **Figura 6**), obteniendo siempre resultados negativos. La no visualización de amplicones en este control, indica que la amplificación de los blancos experimentales (marcado como cDNA, **Figura 6**) se produce a partir de cDNA y no de gDNA contaminante residual, demostrando que lo observado es la expresión asociada a cada gen.

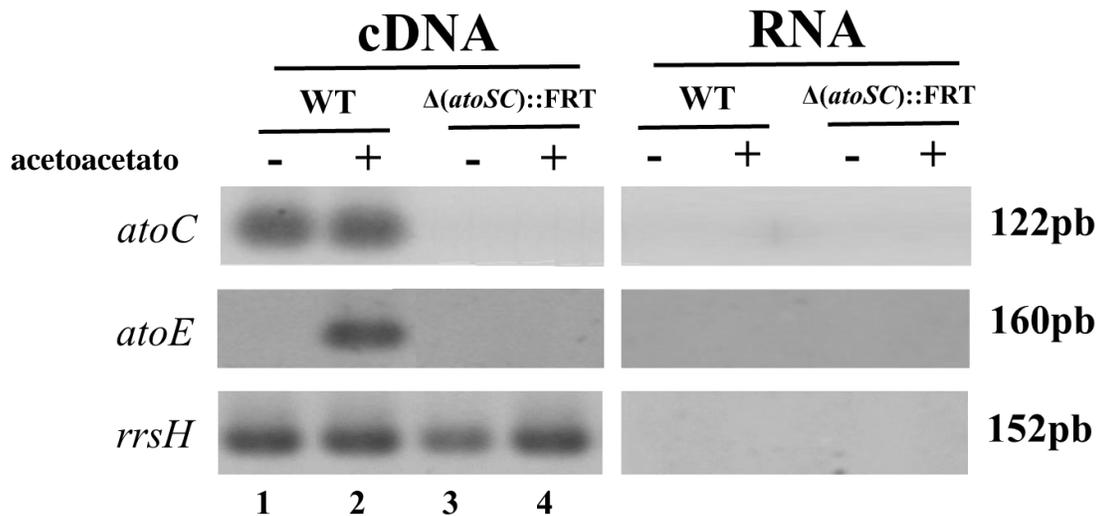


Figura 6. Efecto del activador acetoacetato sobre la expresión de los operones *atoSC* y *atoDAEB*.

Actividad transcripcional de los genes *atoC* y *atoE*, obtenida para las cepas silvestre y mutante, en presencia (+) o ausencia (-) del activador acetoacetato. Los números inferiores son únicamente para facilitar la referencia a una columna determinada a lo largo del texto. RNA: control de retrotranscripción; *rrsH*: gen control de carga/expresión.

Con el fin de obtener una determinación cuantitativa del efecto del activador acetoacetato sobre la expresión del operón *atoDAEB*, se investigó en la cepa silvestre la actividad transcripcional del gen *atoE* esta vez utilizando qRT-PCR. Dado que esta última técnica ofrece más sensibilidad en la determinación que la de tipo convencional, también se evaluó la expresión del operón *atoSC*, determinando la actividad del gen *atoC*. La actividad transcripcional de ambos genes se evaluó en presencia y ausencia del activador acetoacetato, obteniéndose una actividad transcripcional relativa para cada uno (**Figura 7**). Usando esta técnica se logró determinar que la exposición de la cepa silvestre al activador acetoacetato sobreexpresa el gen *atoE* más de 1200 veces (**Figura 7A**), sin modificar la expresión del gen *atoC* (**Figura 7B**). El mismo experimento se realizó en la cepa mutante $\Delta(\textit{atoSC})::\text{FRT}$, midiendo la actividad transcripcional del gen *atoE* sin observar cambios en su expresión (**Figura 7C**). Esto prueba una vez más, que la expresión del operón *atoDAEB* provocada por el activador acetoacetato en la cepa silvestre ocurre de manera AtoS-AtoC dependiente. Estas determinaciones son coherentes y a su vez complementarias a las determinaciones previamente obtenidas usando RT-PCR convencional (**Figura 6**). En conjunto, estos resultados demuestran que en la cepa silvestre se requiere tanto del sistema AtoS-AtoC como del activador acetoacetato para promover la expresión del operón *atoDAEB*. Puesto que la finalidad última de esta serie de experimentos era caracterizar la activación del sistema AtoS-AtoC, en los futuros experimentos se utilizará la expresión observada para el gen *atoE* usando el activador acetoacetato en la cepa silvestre, como un indicativo de activación del sistema AtoS-AtoC (**Figura 7A**).

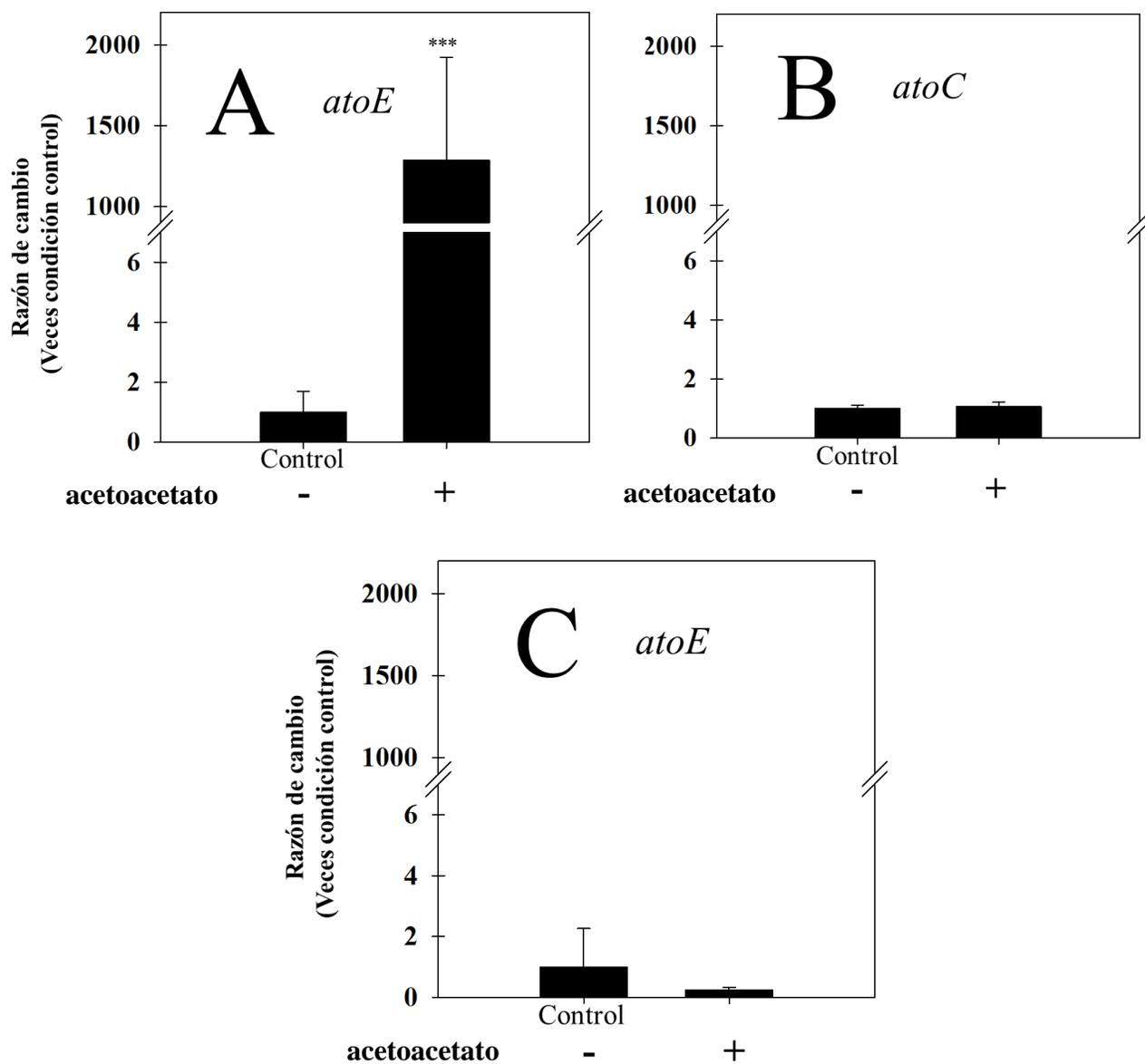


Figura 7. Efecto del activador acetoacetato sobre la expresión de los operones *atoSC* y *atoDAEB*.

Actividad transcripcional relativa obtenida para los genes *atoC* y *atoE* en presencia (+) o ausencia (-) del activador acetoacetato. En A y B el experimento se realiza usando la cepa silvestre. En C el experimento se realiza utilizando la cepa mutante $\Delta(\textit{atoSC})::\textit{FRT}$. ***: $p < 0,001$.

3.1.2 La remoción del operón *atoSC* promueve la expresión del operón *atoDAEB*

Kyriakidis & Tiligada describen que en *E. coli* el operón *atoDAEB* se encuentra contiguo al operón *atoSC*, ubicándose este último en el mismo sentido río arriba del operón *atoDAEB* (Kyriakidis & Tiligada 2009). Puesto que se desconocía si la remoción del operón *atoSC* tenía algún efecto sobre la expresión del operón *atoDAEB*, este evento se examinó como un control para futuros experimentos que hicieran uso de la cepa mutante. Dada la disposición de ambos operones, existía la posibilidad que la delección del operón *atoSC* generara un efecto polar sobre la expresión del operón *atoDAEB*. Si bien usando RT-PCR convencional no se observó expresión asociada al gen *atoE* en la cepa mutante (**Figura 6**), sugiriendo que no existe efecto de este tipo, esta hipótesis fue nuevamente investigada esta vez usando qRT-PCR con el propósito de obtener una determinación más sensible y cuantitativa de la expresión de *atoE* (**Figura 8**). Para investigar esto, se comparó la actividad transcripcional del gen *atoE* en la cepa mutante $\Delta(\textit{atoSC})::\textit{FRT}$ con la actividad del mismo gen en la cepa silvestre (**Figura 8A**). Como control, se realizó el mismo experimento comparando la expresión asociada al gen *atoC* (**Figura 8B**). Como se esperaba, la razón de cambio del mensajero de *atoC* tiende a ser cero (0,002 veces la condición control), confirmando que la remoción del operón *atoSC* se realizó de manera correcta. Si bien en el resultado anterior se demostró que la presencia del sistema AtoS-AtoC no es condición suficiente para la expresión del operón *atoDAEB* (puesto que además requiere la presencia del activador acetoacetato), la sola remoción del operón codificante del sistema AtoS-AtoC sobreexpresó el gen *atoE* en más de 30 veces (**Figura 8A**). Esto sugiere que la delección del operón *atoSC* genera un efecto polar sobre el operón *atoDAEB*. Si esto es cierto, se espera que la actividad transcripcional del operón *atoDAEB* después de la remoción del operón *atoSC* sea similar a la actividad transcripcional que tenía el operón *atoSC* antes de su remoción (considerando que en la cepa silvestre el operón *atoDAEB* no se expresa en ausencia del activador acetoacetato). Para investigar esta idea, se comparó la actividad transcripcional del gen *atoE* en la cepa mutante $\Delta(\textit{atoSC})::\textit{FRT}$ con la actividad transcripcional del gen *atoC* en la cepa silvestre, determinando la actividad relativa entre ambos mediante qRT-PCR (**Figura 8C**).

Esta comparación mostró una tasa de cambio prácticamente igual a uno (1,23 veces condición control), implicando que ambas actividades son similares. Este resultado apoya la hipótesis de la delección polar.

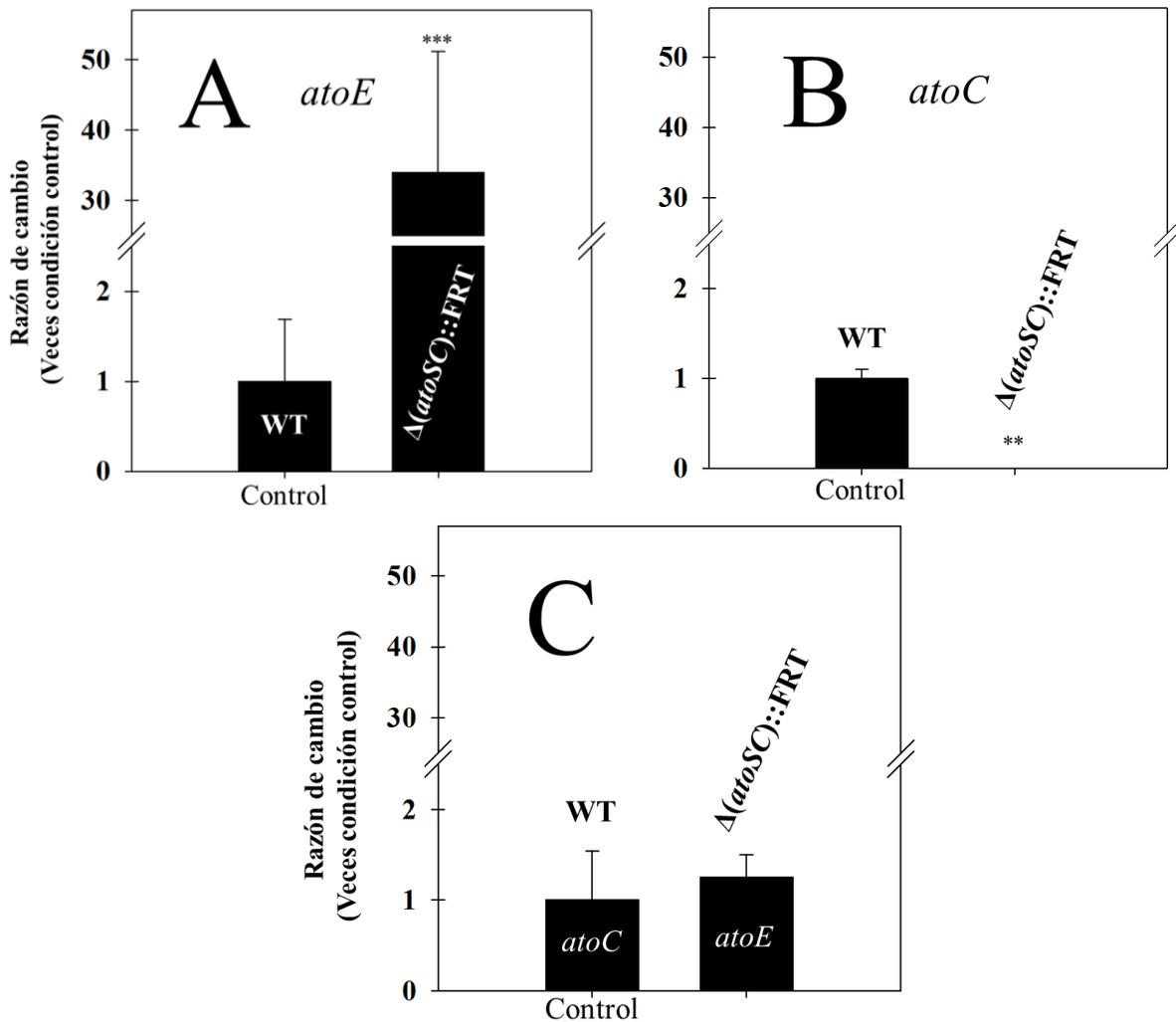


Figura 8. Efecto de la remoción del operón *atoSC* sobre la expresión del operón *atoDAEB*.

Actividad transcripcional relativa obtenida para los genes *atoC* y *atoE* determinada en las cepas silvestre y mutante $\Delta(\textit{atoSC})::\textit{FRT}$. En A y B se grafica la actividad del gen que se señala en la cepa mutante como veces la actividad del gen correspondiente en la cepa silvestre. En C se grafica la actividad del gen *atoE* en la cepa mutante $\Delta(\textit{atoSC})::\textit{FRT}$ como veces la actividad del gen *atoC* en la cepa silvestre. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

3.1.3 El operón *atoSC* recombinante se expresa en ausencia de inductor generando un sistema AtoS-AtoC funcional

Para poder discernir si la sobreexpresión de *atoDAEB* provocada por la delección $\Delta(\textit{atoSC})::\text{FRT}$ se debía a la falta de la secuencia del operón *atoSC* o más bien a la carencia de las proteínas del sistema AtoS-AtoC, se evaluó qué efecto tenía sobre la expresión de *atoE* complementar el sistema AtoS-AtoC en la cepa mutante. Para realizar esto, la cepa mutante fue transformada con el vector plasmidial pVB1^{*atoSC*}, generando la cepa mutante complementada $\Delta(\textit{atoSC})::\text{FRT}/\text{pVB1}^{\textit{atoSC}}$. El vector pVB1^{*atoSC*} posee el operón *atoSC* bajo el control de un promotor inducible por ácido toluico, suministrando un sistema AtoS-AtoC recombinante en la cepa mutante. Como etapa previa al experimento, la cepa complementada fue caracterizada, evaluando el efecto que tenía la presencia del inductor ácido toluico sobre la expresión de los operones *atoSC* y *atoDAEB*. Esto se realizó mediante RT-PCR convencional, determinando la expresión de los genes *atoC* y *atoE* en presencia y ausencia del inductor ácido toluico (**Figura 9**). Puesto que se espera que la activación del sistema recombinante proceda de manera similar a la del sistema silvestre, esto es promoviendo la expresión de *atoE* en presencia del activador acetoacetato, ambas determinaciones se realizaron en presencia de dicho activador. En la cepa complementada, tanto *atoC* como *atoE* se expresaron en ausencia del inductor ácido toluico (columna 2), sugiriendo que existe expresión constitutiva basal de *atoC* desde el vector plasmidial, explicando a su vez la expresión del gen *atoE*. Sin embargo, y contrario a lo esperado, la presencia del inductor ácido toluico impide la expresión de *atoE* en la cepa complementada (*atoE* en columna 3).

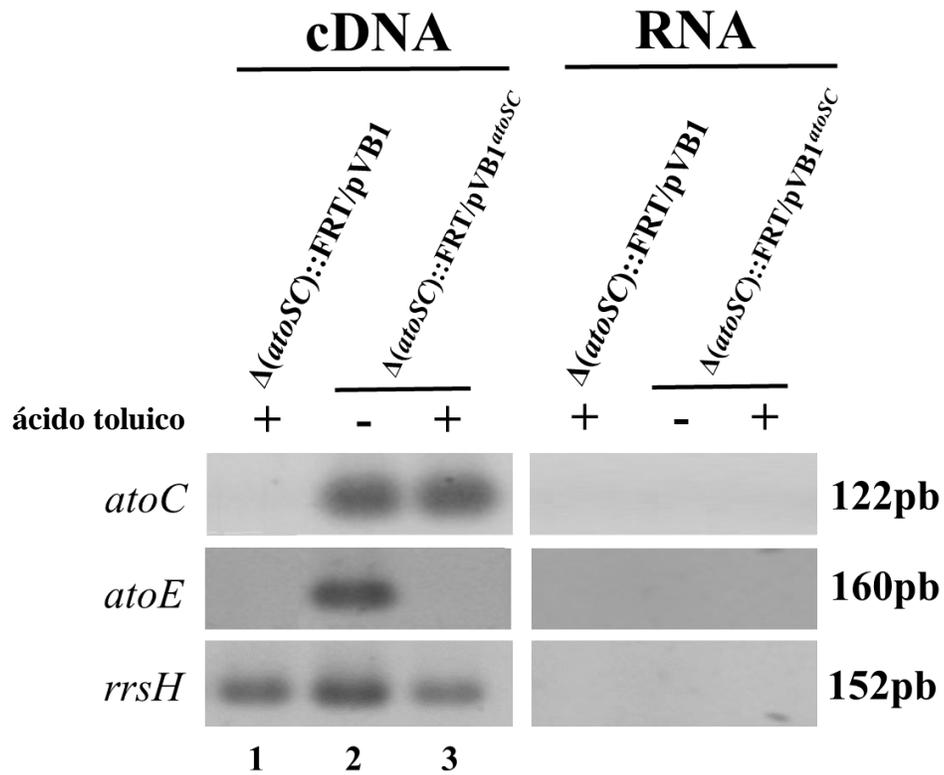


Figura 9. Efecto del inductor ácido toluico sobre la expresión de los operones *atoSC* y *atoDAEB*.

Actividad transcripcional absoluta de los genes *atoC* y *atoE*, obtenida para las cepas complementada y mutante $\Delta(atoSC)::FRT$ transformada con el plásmido pVB1 vacío, en presencia (+) o ausencia (-) del inductor ácido toluico. Todos los experimentos se realizaron en presencia del activador acetoacetato. Los números inferiores son únicamente para facilitar la referencia a una columna determinada a lo largo del texto. RNA: control de retrotranscripción; *rrsH*: gen control de carga/expresión.

Con el fin de obtener una determinación cuantitativa del efecto que tenía la presencia del inductor ácido toluico sobre la expresión del operón *atoSC* recombinante, se determinó la actividad transcripcional del gen *atoC* en la cepa complementada $\Delta(\textit{atoSC})::\text{FRT}/\text{pVB1}^{\textit{atoSC}}$ mediante qRT-PCR (**Figura 10**). En esta cepa, el inductor ácido toluico permite la sobreexpresión de *atoC* alrededor de 8 veces (**Figura 10A**). Con la finalidad de saber cómo era la expresión basal del gen recombinante respecto a la del gen silvestre, se comparó la actividad transcripcional del gen *atoC* en la cepa complementada (con y sin inductor) contra los obtenidos para el mismo gen en la cepa silvestre. En ausencia del inductor ácido toluico, el gen *atoC* recombinante se expresa 5 veces más que el gen silvestre (**Figura 10B**), mientras que en presencia del inductor ácido toluico el gen *atoC* recombinante se expresa 30 veces más que el gen silvestre (**Figura 10C**). Para verificar si tal sobreexpresión se correspondía con la activación del sistema AtoS-AtoC, también se evaluó la expresión del gen *atoE* en la cepa complementada (**Figura 11**). En ausencia del inductor, la exposición al activador acetoacetato sobreexpresa 900 veces el gen *atoE* (**Figura 11A**), mientras que en presencia del inductor, la exposición al activador acetoacetato sobreexpresa 4 veces el gen *atoE* (**Figura 11B**). Estas determinaciones resultaron ser coherentes con lo observado previamente para *atoE* usando la cepa complementada (**Figura 9**). Estos resultados muestran que en la cepa complementada, la presencia del inductor ácido toluico impide la activación del sistema AtoS-AtoC, teniendo como parámetro de dicha activación la sobreexpresión del gen *atoE* que provoca la presencia del activador en la cepa silvestre (alrededor de 1200 veces). Para discernir si este impedimento era causado por la sobreexpresión del gen *atoC* o más bien por la sola presencia del inductor ácido toluico, se investigó cuál era el efecto que tenía la presencia del inductor sobre la activación del sistema AtoS-AtoC silvestre. Esto se realizó comparando la actividad transcripcional del gen *atoE* en la cepa silvestre tanto en presencia como en ausencia del activador acetoacetato, siempre en presencia del inductor ácido toluico (**Figura 11C**). La comparación mostró que la presencia del activador acetocetato sobreexpresa el gen *atoE* más de 1000 veces, evidenciando que el sistema AtoS-AtoC silvestre puede ser activado en presencia del inductor ácido toluico.

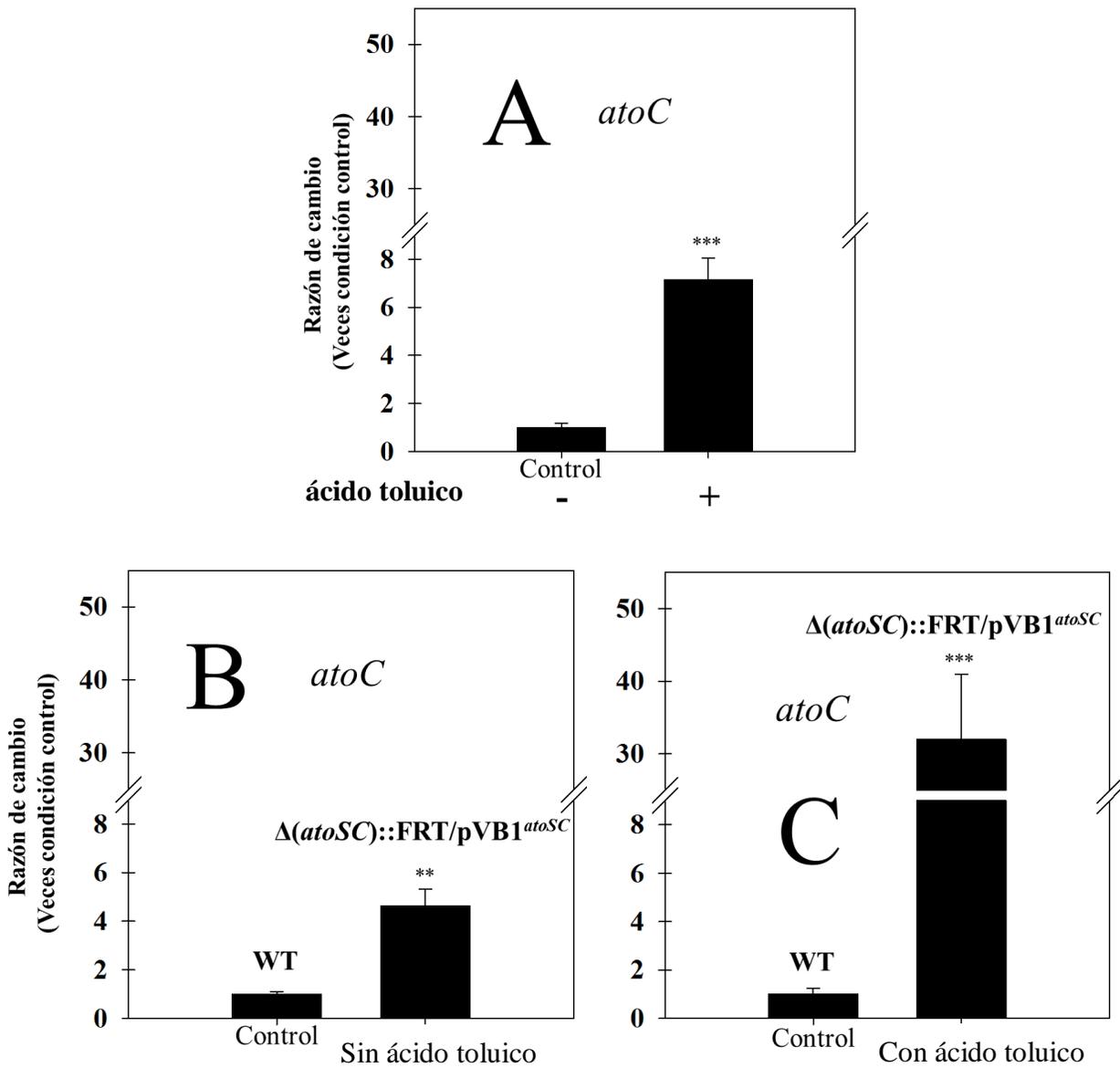


Figura 10. Expresión del operón *atoSC* recombinante.

En A se muestra la actividad transcripcional relativa obtenida para el gen *atoC* recombinante en presencia (+) o ausencia (-) del inductor ácido toluico, **usando la cepa complementada** $\Delta(\textit{atoSC})::\textit{FRT}/\textit{pVB1}^{\textit{atoSC}}$. Los gráficos inferiores muestran la actividad transcripcional relativa del gen *atoC* recombinante como veces la del gen silvestre, incubando la cepa complementada en ausencia (B) o presencia (C) del inductor ácido toluico. **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$.

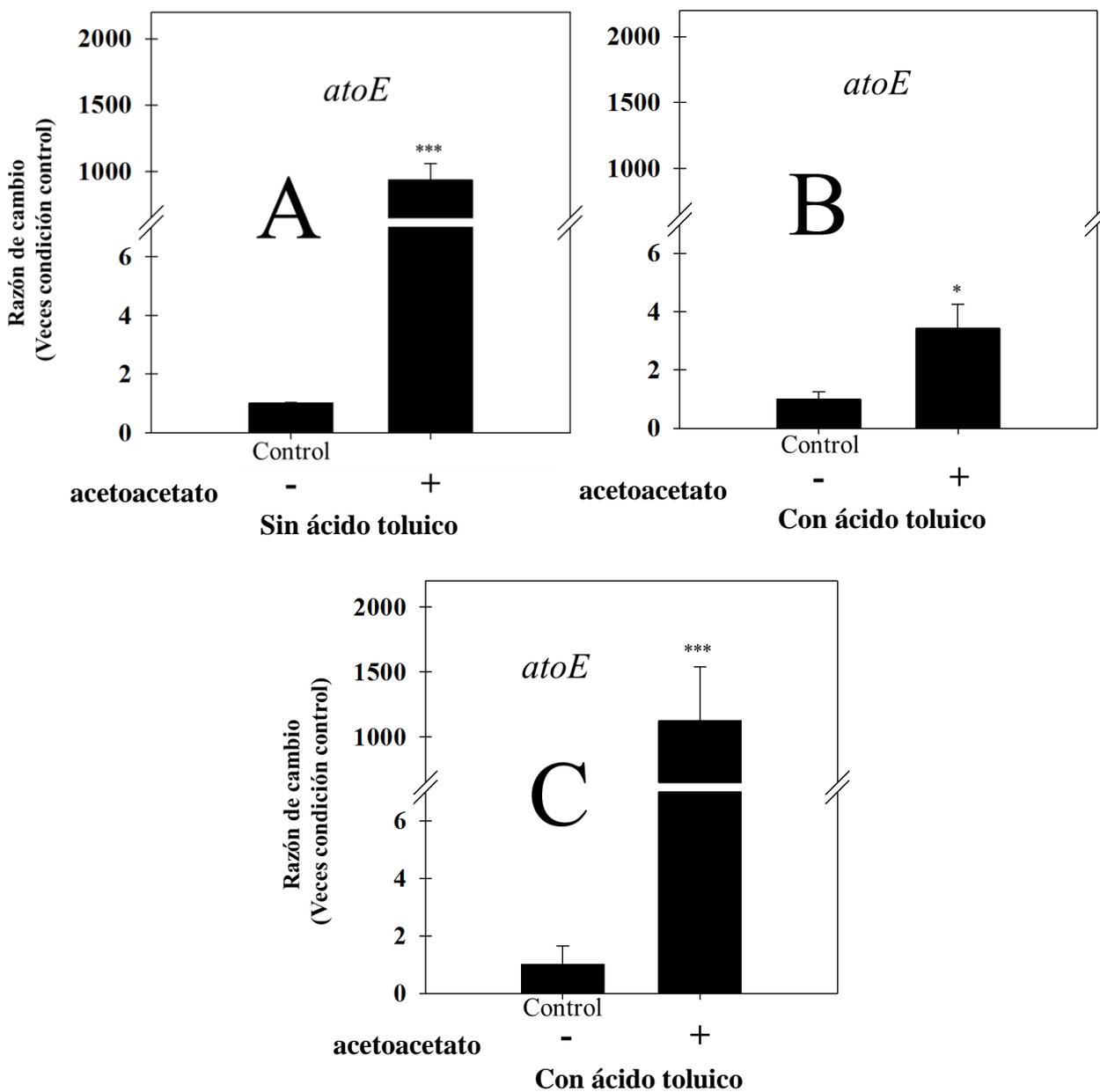


Figura 11. Activación del sistema AtoS-AtoC recombinante.

Los gráficos superiores muestran la activación del sistema AtoS-AtoC recombinante en ausencia (A) o presencia (B) del inductor ácido toluico, **usando la cepa complementada** $\Delta(atoSC)::FRT/pVB1^{atoSC}$. En C se muestra el efecto del inductor sobre la activación del sistema AtoS-AtoC silvestre (**cepa silvestre**). -: ausencia; +: presencia. *: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$.

Esto sugiere que el impedimento observado en la activación del sistema usando la cepa complementada (**Figura 11B**) se debe a la sobreexpresión del operón *atoSC* recombinante más que a la sola presencia del inductor ácido toluico. Estas determinaciones en conjunto muestran que el operón *atoSC* recombinante se expresa en ausencia de inductor ácido toluico, generando un sistema AtoS-AtoC funcional que puede ser activado por acetoacetato. Es por esta razón que los ensayos posteriores que hicieron uso de la cepa complementada, se realizaron siempre en ausencia del inductor ácido toluico.

3.1.4 La complementación de la cepa mutante $\Delta(atoSC)::FRT$ revierte la sobreexpresión del operón *atoDAEB* provocada por la delección

Puesto que en la cepa complementada, el operón *atoSC* recombinante se expresa en ausencia de inductor ácido toluico generando un sistema AtoS-AtoC activable por acetoacetato, se utilizó esta cepa para discernir si la sobreexpresión de *atoDAEB* provocada por la delección se debía a la falta de la secuencia del operón *atoSC* o más bien a la carencia de las proteínas del sistema AtoS-AtoC (**Figura 12**). Con este fin, se comparó la actividad transcripcional del gen *atoE* en la cepa complementada $\Delta(atoSC)::FRT/pVB1^{atoSC}$, sin activador y sin inductor, con la actividad del mismo gen en la cepa mutante $\Delta(atoSC)::FRT$ (**Figura 12A**). El experimento mostró que la actividad del gen *atoE* en la cepa complementada es aproximadamente 0,05 veces la que exhibe en la cepa mutante. Para saber cómo era la actividad de este gen respecto a la que tenía antes de la remoción del operón *atoSC*, se comparó la actividad transcripcional del gen *atoE* entre las cepas complementada $\Delta(atoSC)::FRT/pVB1^{atoSC}$ y silvestre (**Figura 12B**). Esta comparación arrojó que la actividad del gen *atoE* en la cepa complementada $\Delta(atoSC)::FRT/pVB1^{atoSC}$ es igual a la que poseía en la cepa silvestre. En conjunto estos experimentos revelan que el sistema AtoS-AtoC sin activar es capaz de revertir la sobreexpresión del operón *atoDAEB* provocada por la delección $\Delta(atoSC)::FRT$. Estas observaciones no pueden deberse a un efecto propio del evento de transformación, puesto que la transformación de la cepa mutante con el plásmido pVB1 vacío no modificó la actividad transcripcional del gen *atoE* (**Figura 12C**). Dado que los experimentos se realizaron siempre en ausencia del activador acetoacetato, estos resultados sugieren que en la cepa silvestre el sistema AtoS-AtoC, posee alguna participación en la regulación de la expresión del operón *atoDAEB* incluso sin ser activado.

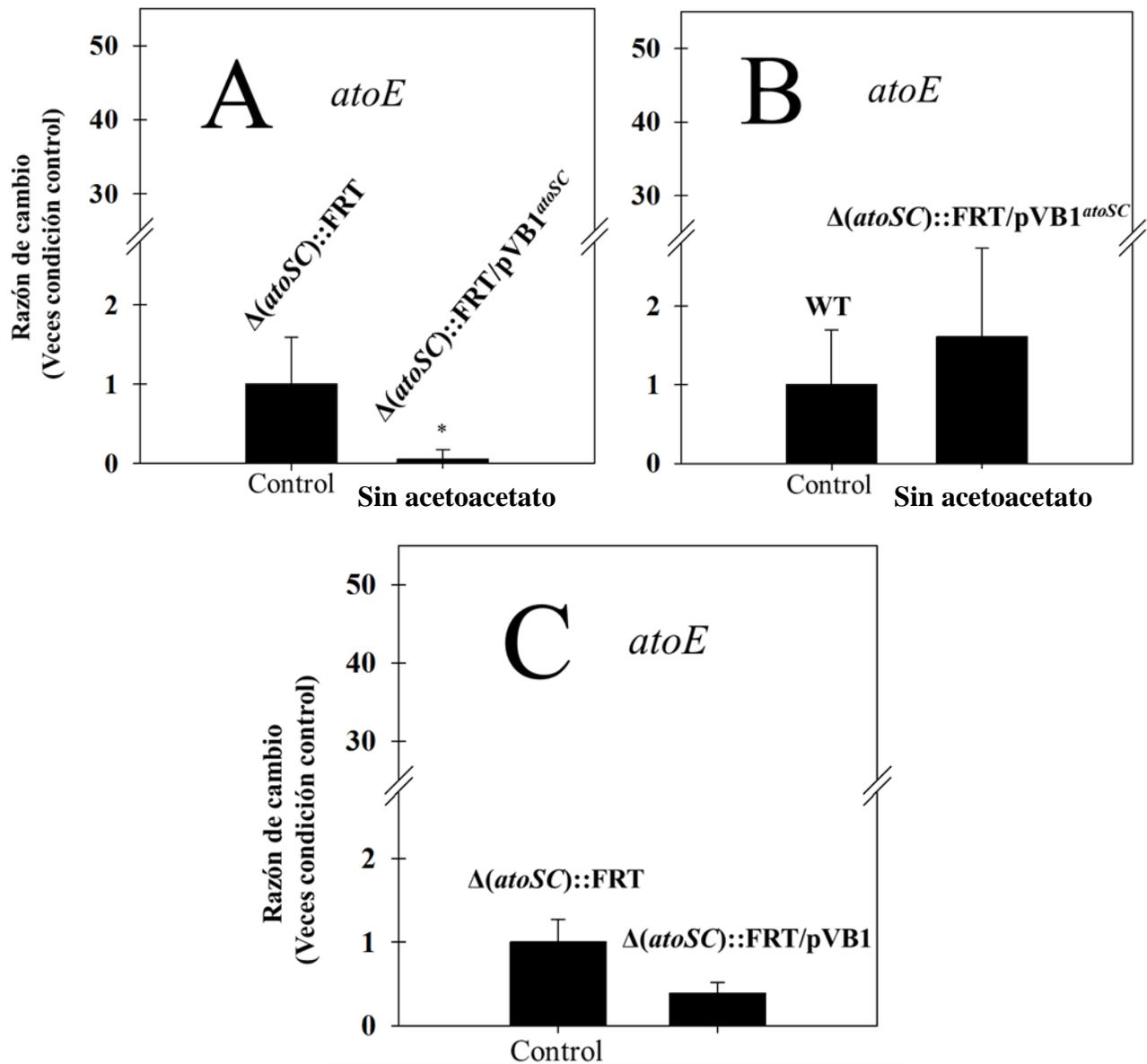


Figura 12. Efecto del sistema AtoS-AtoC sin activar sobre la expresión del operón *atoDAEB* en la cepa mutante.

Se muestra la actividad transcripcional relativa del gen *atoE*, obtenida tras la comparación de su expresión en la cepa complementada contra la cepa mutante (A) y la silvestre (B). En C se grafica el control de transformación del experimento. A y B: cepa complementada sin inductor ácido toluico/activador acetoacetato. *: $p < 0,05$.

3.1.5 Los SCFAs no activan el sistema AtoS-AtoC

A nivel intestinal, la mezcla de SCFAs acetato-propionato-butirato constituye alrededor del 95% de SCFAs totales distribuida en una razón molar de 60:20:20 respectivamente (den Besten, *et al.* 2013). Para emular este ambiente, las cepas en estudio fueron incubadas utilizando una mezcla de acetato-propionato-butirato a las concentraciones usadas por Herold *et al.* (Herold, *et al.* 2009). Por su parte, Clark y Cronan informan que las enzimas codificadas por el operón *atoDAEB* son capaces de metabolizar tanto el activador acetoacetato como el SCFA butirato (Clark & Cronan 2005). Sin embargo, se desconoce si la presencia de este último tiene algún efecto sobre la expresión del operón *atoDAEB*. Puesto que el butirato es un constituyente de la mezcla de SCFAs utilizada, se evaluó la posibilidad de que esta mezcla pudiese actuar de manera análoga al activador acetoacetato, esto es, promoviendo la expresión del operón *atoDAEB* de manera AtoS-AtoC dependiente. Como una primera aproximación, y puesto que también se desconocía el efecto que podía tener la mezcla de SCFAs sobre la expresión del operón *atoSC*, se evaluó si los SCFAs modificaban la expresión tanto del operon *atoSC* como del operón *atoDAEB* (**Figura 13**). Esto se realizó usando RT-PCR convencional, determinando la expresión de los genes constituyentes respectivos *atoC* y *atoE* en presencia y ausencia de SCFAs (imagen superior, **Figura 13**). En la cepa silvestre, la exposición a SCFAs no modificó la expresión de ninguno de los genes evaluados. El mismo experimento se realizó tanto en la cepa mutante $\Delta(\textit{atoSC})::\textit{FRT}$ como en la cepa complementada $\Delta(\textit{atoSC})::\textit{FRT}/\textit{pVB1}^{\textit{atoSC}}$, obteniendo iguales resultados. Con el fin de obtener una determinación cuantitativa del efecto de los SCFAs sobre la expresión de ambos operones, se investigó en la cepa silvestre la actividad transcripcional de los genes *atoC* y *atoE*, esta vez utilizando qRT-PCR (gráficos inferiores, **Figura 13**). Usando esta técnica, se confirmó que la actividad transcripcional de ambos genes no se ve modificada por la presencia de SCFAs. Estos resultados en conjunto sugieren que los SCFAs no modifican la expresión de ninguno de los operones, descartando la posibilidad que los SCFAs activen el sistema AtoS-AtoC.

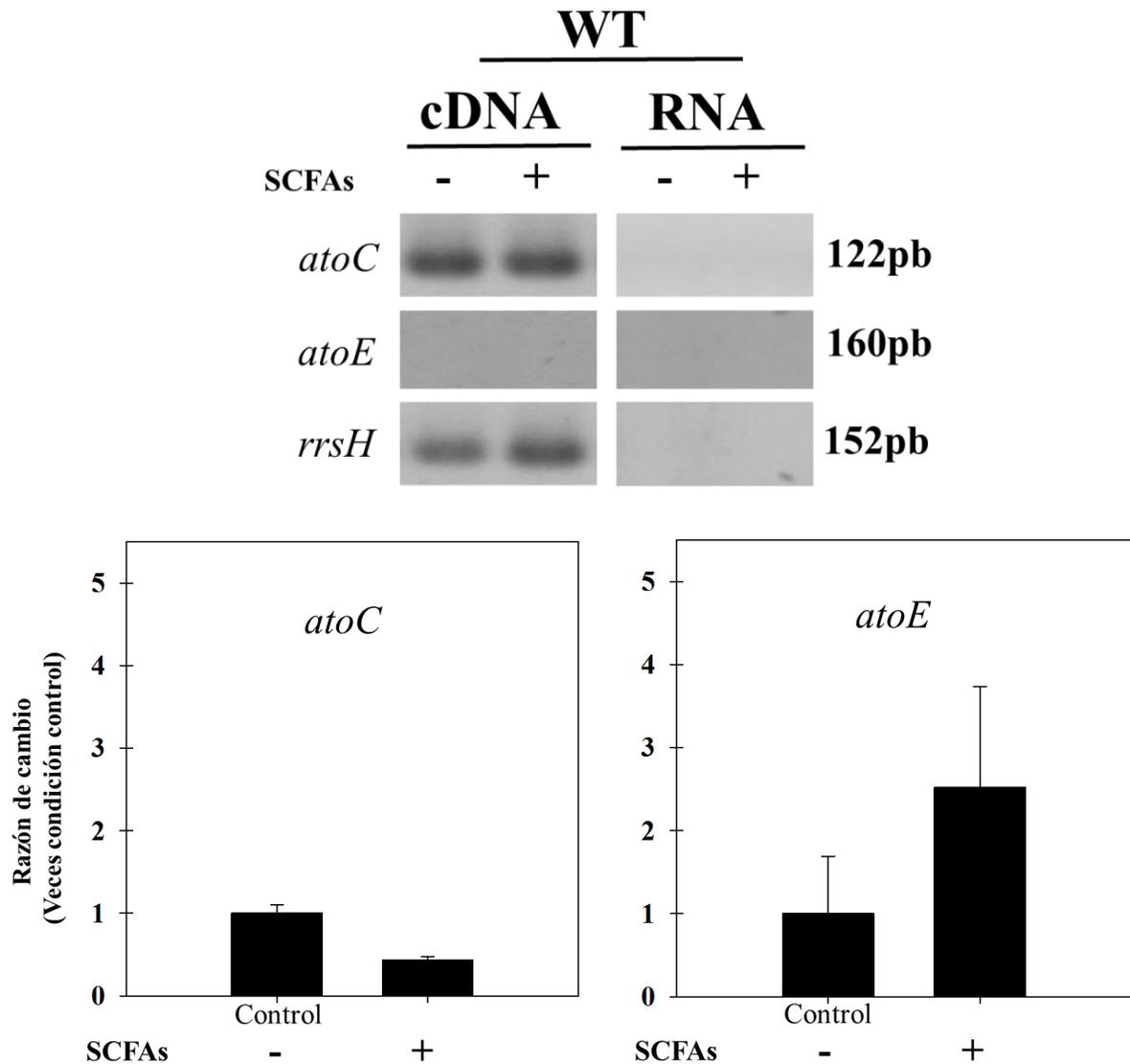


Figura 13. Efecto de los SCFAs sobre la expresión de los operones *atoSC* y *atoDAEB*.

La imagen superior muestra la actividad transcripcional de los genes *atoC* y *atoE* en presencia (+) o ausencia (-) de SCFAs, determinada usando RT-PCR convencional. Los gráficos inferiores muestran el mismo experimento, esta vez determinando la actividad transcripcional relativa para cada gen mediante qRT-PCR. Todas las determinaciones se realizaron usando la cepa silvestre. RNA: control de retrotranscripción.

3.1.6 Los SCFAs impiden la activación del sistema AtoS-AtoC

Pese a que se demostró que la presencia de SCFAs no modifica la actividad transcripcional ni del operón *atoSC* ni del operón *atoDAEB*, este resultado no descarta la posibilidad de que la presencia de SCFAs afecte la normal activación del sistema AtoS-AtoC. Este es un control necesario puesto que existe evidencia que vincula la osmolaridad con el sistema AtoS-AtoC. Al respecto, Zhou *et al.* informaron previamente que la cepa mutante $\Delta(\textit{atoSC})::\text{FRT}$ exhibe una clara susceptibilidad a condiciones específicas de osmolaridad (Zhou, *et al.* 2003). Además, Oshima *et al.* informaron que la remoción del SDC implicado en osmolaridad OmpR-EnvZ modifica la expresión del sistema AtoS-AtoC (Oshima, *et al.* 2002). Para evaluar si las sales utilizadas para emular la mezcla colónica de SCFAs afectaba la función del sistema AtoS-AtoC, se investigó en la cepa silvestre si el sistema podía ser activado en presencia de la mezcla de SCFAs utilizada en el experimento anterior (**Figura 14**). Esto se realizó promoviendo la expresión del operón *atoDAEB* con el activador acetoacetato, tanto en presencia como en ausencia de SCFAs, determinando la expresión de *atoE* mediante RT-PCR convencional (imagen superior, **Figura 14**). El experimento mostró que en la cepa silvestre, la presencia de SCFAs impide la expresión de *atoE* promovida por el activador acetoacetato. Con el fin de obtener una determinación cuantitativa del efecto de los SCFAs sobre la función del sistema AtoS-AtoC, se determinó en la misma cepa la actividad transcripcional relativa del gen *atoE* usando esta vez qRT-PCR (gráficos inferiores, **Figura 14**). Así se logró determinar que en presencia de SCFAs el activador acetoacetato no tiene ningún efecto en la actividad transcripcional de *atoE* (gráfico derecho, **Figura 14**). El mismo experimento se realizó en la cepa complementada $\Delta(\textit{atoSC})::\text{FRT}/\text{pVB1}^{\textit{atoSC}}$ obteniéndose iguales resultados. Estos resultados muestran que en la cepa silvestre, la presencia de SCFAs impide la activación del sistema AtoS-AtoC, entendiendo dicha activación como la sobreexpresión de *atoE* que provoca la presencia del activador en ausencia de SCFAs (gráfico izquierdo, **Figura 14**).

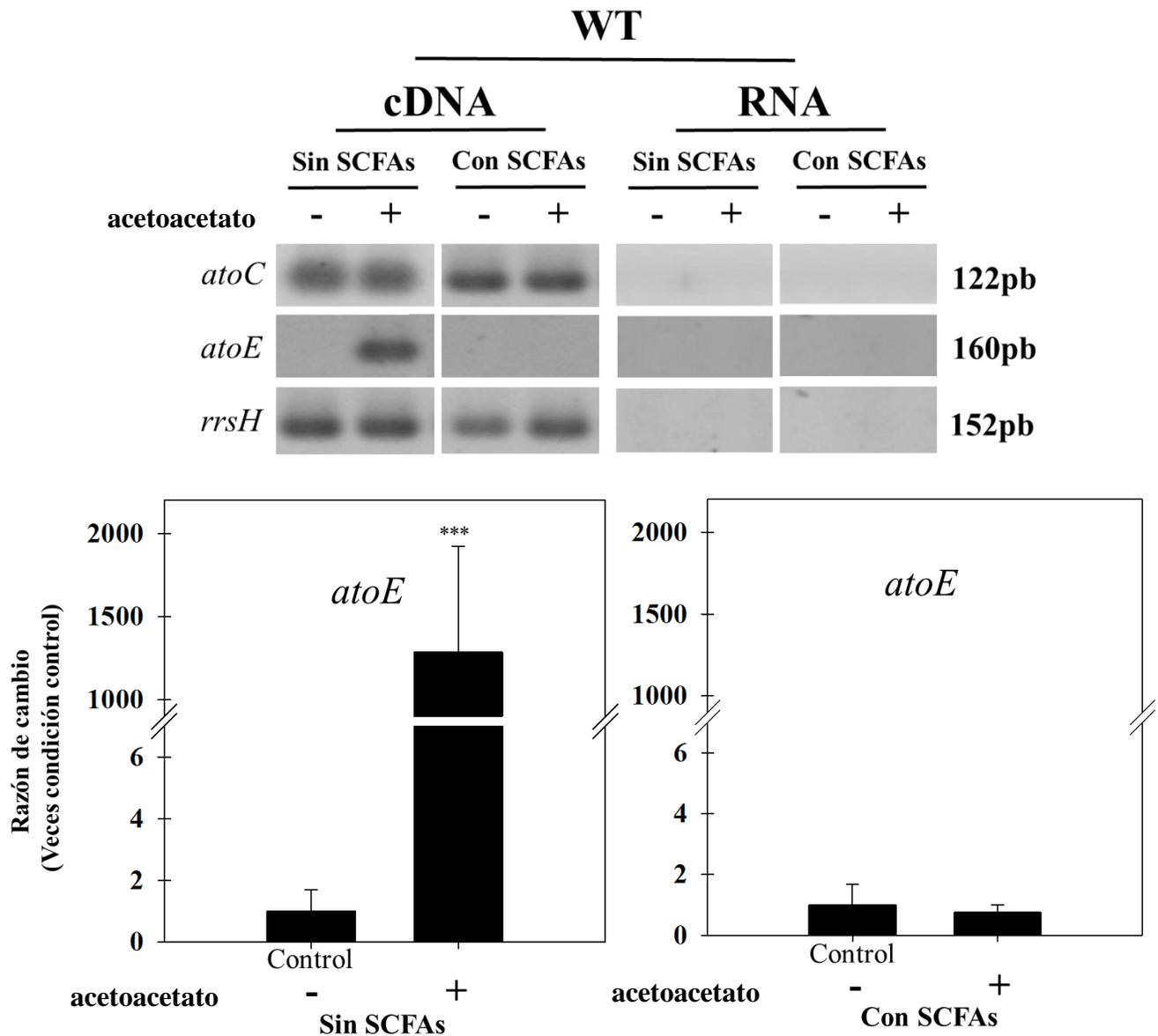


Figura 14. Efecto de los SCFAs sobre la activación del sistema AtoS-AtoC.

La imagen superior muestra la actividad transcripcional absoluta del gen *atoE* como indicadora de activación del sistema AtoS-AtoC en presencia (+) o ausencia (-) de SCFAs, determinada usando RT-PCR convencional. Los gráficos inferiores muestran el mismo experimento esta vez determinando la actividad transcripcional relativa de *atoE* para cada condición mediante qRT-PCR. Todas las determinaciones se realizaron utilizando la cepa silvestre. RNA: control de retrotranscripción. ***: $p < 0,001$.

3.1.7 Los SCFAs disminuyen la tasa de proliferación celular

Para poder discernir si el efecto provocado por la presencia de SCFAs sobre la activación del sistema AtoS-AtoC se debía a un efecto específico sobre este sistema o más bien se debía a un efecto generalizado sobre la cepa silvestre, se realizaron curvas de crecimiento en presencia y ausencia de SCFAs. Puesto que en presencia de SCFAs el sistema AtoS-AtoC recombinante exhibe el mismo comportamiento que el silvestre (no mostrado) y que la cepa mutante posee una expresión desregulada del operón *atoDAEB*, también se incluyeron en este experimento las cepas mutante $\Delta(\textit{atoSC})::\text{FRT}$ y complementada $\Delta(\textit{atoSC})::\text{FRT}/\text{pVB1}^{\textit{atoSC}}$ (**Figura 15**). En ausencia de SCFAs todas las cepas poseen la misma tasa de crecimiento, probando que tanto la remoción del operón *atoSC* como su posterior complementación no modifican la tasa de proliferación (**Figura 15A**). Sin embargo, la presencia de SCFAs disminuye la tasa de proliferación de todas las cepas estudiadas (**Figura 15B**). Esto sugiere que el efecto provocado por la presencia de SCFAs sobre la función del sistema AtoS-AtoC responde más bien a un efecto de tipo generalizado en la cepa silvestre más que específico sobre el sistema AtoS-AtoC. A modo de controles se realizó el mismo experimento, esta vez en presencia tanto del activador acetoacetato (**Figura 15C**) como del inductor ácido toluico (**Figura 15D**) por separado. El experimento mostró que la tasa de proliferación de las cepas estudiadas no se ve afectada ni por la presencia del activador ni por la presencia del inductor.

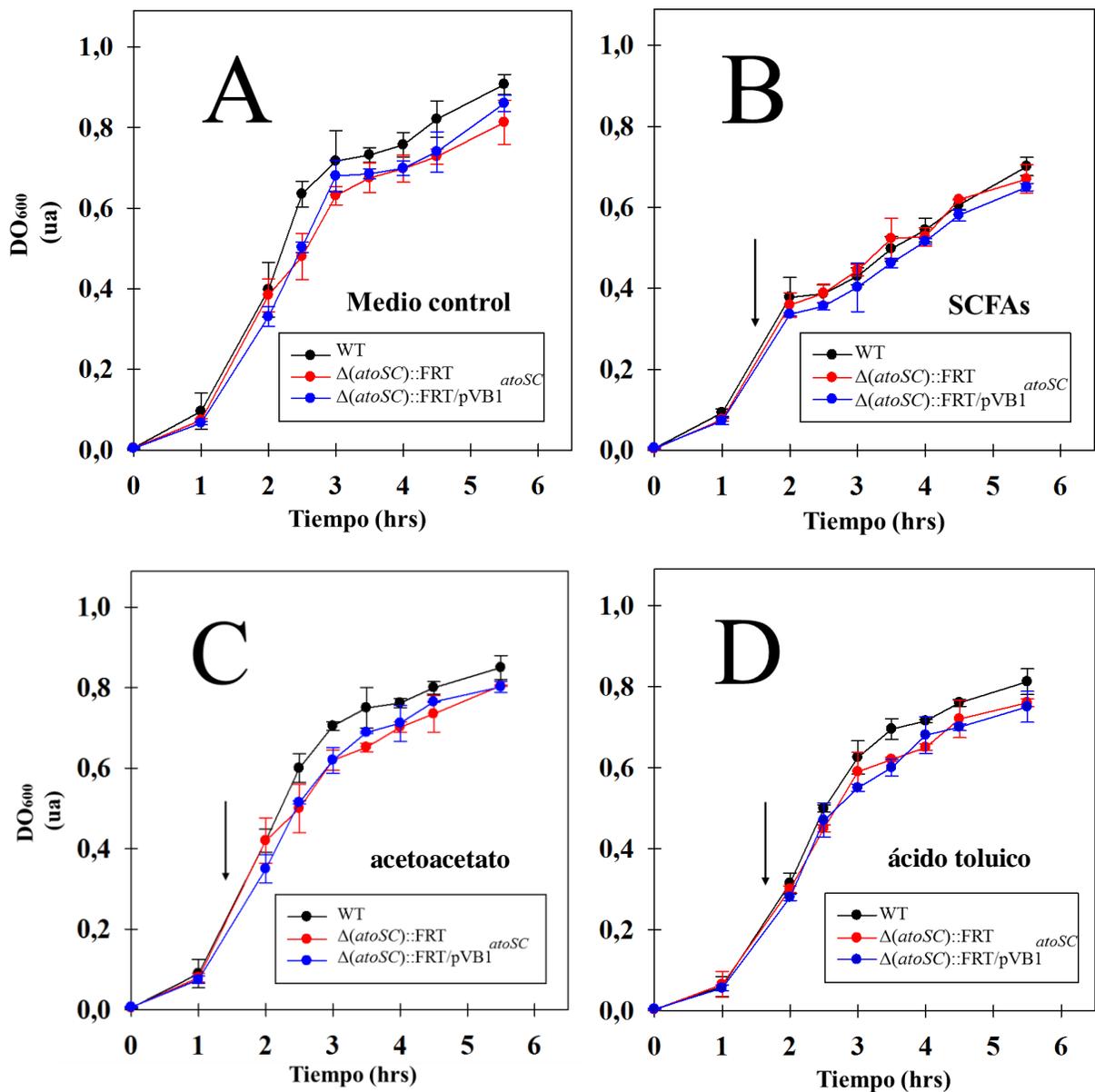


Figura 15. Curvas de crecimiento de las cepas utilizadas en este trabajo.

En A se compara la tasa de proliferación de cada cepa en estudio creciendo en medio control. En B, C y D, se compara la tasa de proliferación de cada cepa creciendo en medio control suplementado con: SCFAs (B), el activador acetoacetato (C) y el inductor ácido toluico (D). En cada gráfico el color de la curva indica la cepa (en leyenda). La flecha negra indica el momento en el que se añade el suplemento. Barras de error: promedio aritmético \pm desviación estándar de tres determinaciones independientes. ua: unidad arbitraria de absorbancia.

3.2 EVALUAR SI LA ACTIVACIÓN DEL SISTEMA AtoS-AtoC MODIFICA EL EFECTO QUE TIENEN LOS SCFAs SOBRE *iha*

3.2.1 En la cepa silvestre existen dos alelos para el gen *iha*

En el año 2006 Rashid *et al.* informaron la presencia de múltiples SNPs presentes en la zona promotora de *iha* capaces de modular su expresión (Rashid, *et al.* 2006). Tres años más tarde Herold *et al.*, trabajando en una cepa LEE⁻ serotipo O113:H21, informaron de la presencia de un gen *iha* adicional al alelo cromosomal, ubicado en el megaplásmido de virulencia pO113 (Herold, *et al.* 2009). Con esta información se investigó que tan similares en secuencia eran ambos alelos. Como secuencias de referencia se utilizaron para el alelo cromosomal, la secuencia parcial obtenida para una cepa STEC serotipo O91:H21 y para el alelo plasmidial la secuencia del gen *iha* presente en el plásmido de virulencia pO113, ambas secuencias obtenidas desde la base de datos NCBI. Usando estas secuencias se realizó un alineamiento entre las zonas promotoras de ambos alelos, obteniéndose un porcentaje de identidad del 93%. Un análisis posterior mostró que, del total de sustituciones, al menos tres coinciden en posición con la ubicación de los SNPs mencionados. Considerando que ninguno de estos SNPs se ubica en la caja descrita de Fur, la presencia de éstos podría afectar la unión de reguladores no descritos en el promotor de algún alelo, regulando a su vez la actividad transcripcional de *iha*. Puesto que era posible que tal duplicación alélica fuese una característica compartida con otras cepas LEE⁻, en este trabajo se investigó tanto la presencia como la actividad transcripcional de ambos alelos. Con la finalidad de lograr la detección específica de cada uno de los alelos de *iha* se generaron dos parejas de partidores. A pesar de las diferencias de secuencia que exhiben los alelos en su zona promotora, ambas parejas de partidores resultaron ser muy similares, puesto que el alineamiento de los ORFs de ambos alelos de *iha* mostró un porcentaje de identidad del 96%. Usando estas parejas por separado se amplificó DNA purificado desde la cepa silvestre, obteniéndose dos amplicones característicos de 172 pb para el alelo cromosomal (AC) y de 106 pb para el alelo plasmidial (AP).

Dada la similitud entre cada pareja de partidores, y con la finalidad de asegurar la identidad del producto obtenido para cada reacción de amplificación, se realizó un ensayo de restricción (**Figura 16**). Este ensayo se realizó sometiendo el amplicon previamente obtenido para cada alelo de *iha* a una serie de reacciones de digestión. Con esta finalidad se escogieron tres sitios de corte para cada alelo: dos presentes (en azul, **Figura 16**) y uno ausente (en rojo, **Figura 16**), utilizando para la búsqueda de estos sitios las secuencias de referencia previamente mencionadas. Para el caso de las reacciones que hacían uso de sitios ausentes se utilizó como control positivo de actividad endonucleasa una sonda específicamente diseñada (S), la cual posee los sitios de reconocimiento no esperados *HaeIII* (para el alelo cromosomal) y *BspMI* (para el alelo plasmidial). De las seis reacciones realizadas cinco resultaron de la manera prevista, confirmando así la identidad de los amplicones obtenidos (sitio no esperado en AC indicado en asterisco, **Figura 16**).

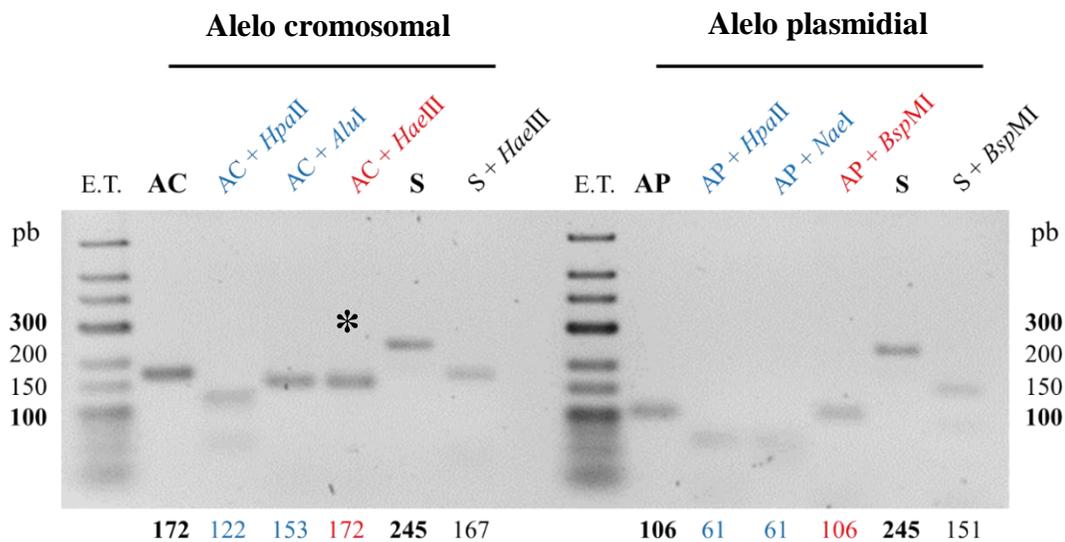


Figura 16. Ensayo de restricción de *iha*.

En la figura se señala el amplicón sustrato y la enzima utilizada en cada reacción de digestión. En la figura, el sustrato antecede a cada serie de reacciones y aparece marcado como AC, AP o S. En la parte inferior se muestra el tamaño molecular del producto de digestión de mayor tamaño esperado. E.T.: estándar de tamaño molecular. Gel representativo de dos experimentos independientes.

Con la finalidad de asegurar la especificidad en cada una de las reacciones de amplificación de *iha*, se compararon las curvas de fusión de los productos de amplificación obtenidos tras el uso de ambas parejas de partidores (una para cada alelo de *iha*). Estos productos se obtuvieron amplificando con cada pareja de partidores, el cDNA obtenido para seis condiciones experimentales diferentes (**Figura 17**). Todas las curvas de fusión generadas mostraron un único máximo. Puesto que una curva de fusión posee tantos máximos como productos de amplificación generados, el experimento reveló que las reacciones de amplificación de ambos alelos de *iha* proceden de manera específica.

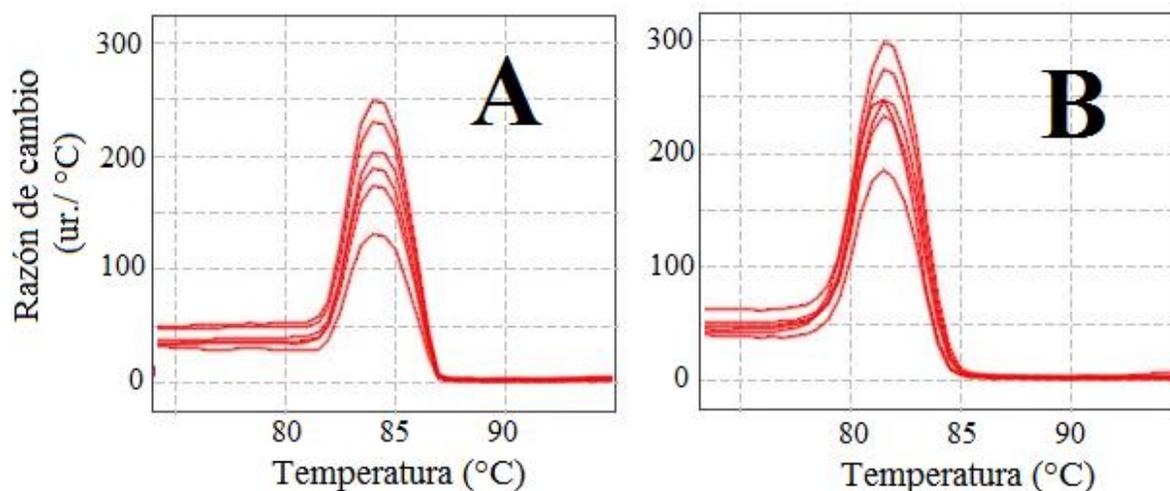


Figura 17. Curvas de fusión de los productos de amplificación de *iha*.

La imagen muestra curvas de fusión de productos de reacción obtenidos tras la amplificación del alelo cromosomal (A) y del alelo plasmidial (B) de *iha*. Cada curva se generó usando como templado el cDNA obtenido para una condición experimental particular escogida al azar (ej.: ausencia de inductor, presencia de activador, etc...). En ambas imágenes se grafica la función primera derivada de la curva de fusión correspondiente. ur.: unidad relativa de fluorescencia.

Para demostrar que la presencia de ambos alelos responde a la presencia de dos genes diferentes y no a una simple duplicación de secuencia, se evaluó la expresión de ambos genes en la cepa silvestre utilizando para esto las parejas de partidores antes mencionadas. Si ambos genes existen en la cepa silvestre, es altamente probable que exhiban actividades transcripcionales diferentes (dada la ubicación plasmidial de uno de ellos). Para evaluar esto, se determinó en la cepa silvestre la actividad transcripcional relativa existente entre ambos alelos usando qRT-PCR (**Figura 18**). En esta cepa, la actividad transcripcional del alelo plasmidial de *iha* es 120 veces superior a la del alelo cromosomal. Este experimento, en conjunto con los anteriores, prueba que en la cepa silvestre existen dos genes *iha*, los cuales pueden ser amplificados de manera específica permitiendo la detección discriminante tanto de su presencia como de su expresión.

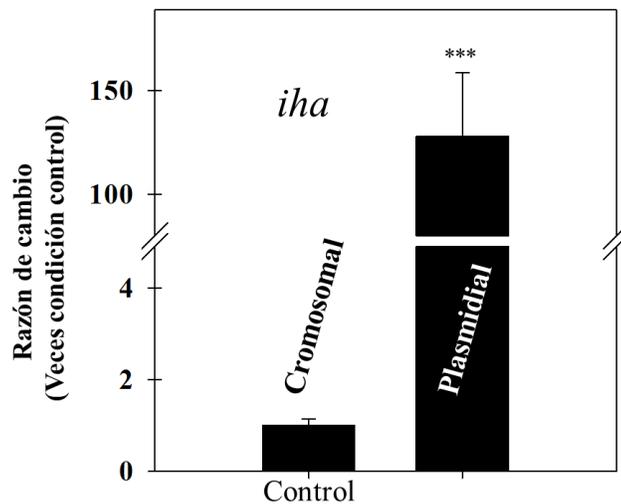


Figura 18. Actividad transcripcional relativa entre ambos alelos de *iha*.

El gráfico muestra la actividad transcripcional del alelo plasmidial de *iha* como veces la actividad transcripcional del alelo cromosomal. Ambas determinaciones se realizaron en la cepa silvestre.

***: $p < 0,001$.

3.2.2 Los SCFAs no modifican la expresión de *iha*

Herold *et al.*, informan que la presencia de SCFAs modifica la actividad transcripcional del alelo cromosomal de *iha* (Herold, *et al.* 2009). Puesto que la hipótesis central de este trabajo requiere saber si el sistema AtoS-AtoC tiene alguna participación en esta observación, se investigó cómo respondían a la presencia de SCFAs ambos alelos de *iha*, como una manera de caracterizar a nivel transcripcional el efecto informado por Herold *et al.*, replicando su experimento en nuestra cepa de trabajo. Con este fin, se estudió en la cepa silvestre cuál era el efecto de los SCFAs sobre la expresión de *iha* (**Figura 19**). Esto se realizó determinando en la cepa silvestre la actividad transcripcional absoluta tanto del alelo cromosomal de *iha* (*iha^c*) como del alelo plasmidial (*iha^p*), en presencia y ausencia de SCFAs mediante RT-PCR convencional (imagen superior, **Figura 19**). La suplementación del medio control con SCFAs no modificó la actividad transcripcional de ninguno de los alelos. Adicionalmente, el experimento mostró que, si bien ambos genes se expresan de manera constitutiva en la cepa silvestre, éstos no lo hacen con el mismo grado de actividad, observación que es coherente con el resultado anterior (**Figura 18**). Con el fin de obtener una determinación cuantitativa del efecto de los SCFAs sobre la expresión de *iha*, se determinó en la cepa silvestre la actividad transcripcional relativa para cada alelo utilizando esta vez qRT-PCR (gráficos inferiores, **Figura 19**). Este experimento mostró que la presencia de SCFAs no modifica la expresión de ninguna de los alelos. Estas observaciones permiten concluir que en la cepa silvestre estudiada y a las concentraciones de trabajo utilizadas, la presencia de la mezcla de SCFAs no modifica la actividad transcripcional de ninguna de los alelos de *iha*.

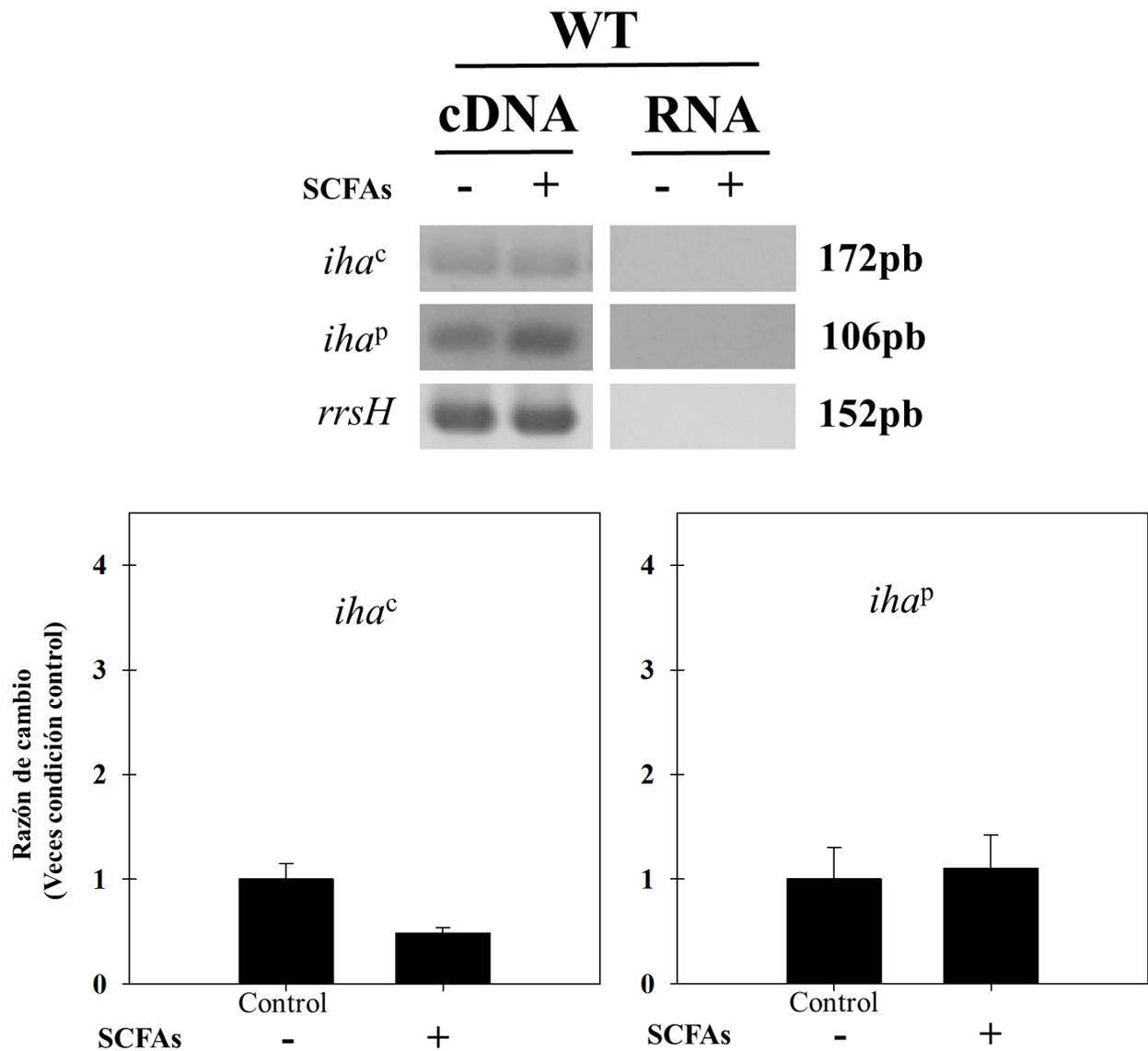


Figura 19. Efecto de los SCFAs sobre la expresión de *iha*.

La imagen superior muestra la actividad transcripcional absoluta de cada alelo de *iha* en presencia (+) o ausencia (-) de SCFAs, determinada usando RT-PCR convencional. Los gráficos inferiores muestran el mismo experimento esta vez determinando la actividad transcripcional relativa para cada gen mediante qRT-PCR. Todas las determinaciones se realizaron usando la cepa silvestre. RNA: control de retrotranscripción.

3.2.3 El sistema AtoS-AtoC no participa regulando la expresión de *iha*

Pese a que no se pudo replicar el efecto de activación previamente descrito para los SCFAs sobre la actividad transcripcional de *iha*, en este trabajo se evaluó si el sistema AtoS-AtoC participaba regulando la expresión de este gen. Con este fin, se investigó si la expresión de algún alelo de *iha* se veía modificada por la activación del sistema AtoS-AtoC (**Figura 20**). Esto requería conocer previamente dos cosas: i) el efecto que tenía por sí mismo la remoción del operón *atoSC* sobre la actividad transcripcional de *iha* y, ii) el efecto que tenía la sola presencia del activador acetoacetato sobre la actividad transcripcional de *iha*. Para investigar lo primero, se determinó la actividad transcripcional relativa de ambos alelos mediante qRT-PCR, comparando para un mismo gen su actividad obtenida en la cepa mutante $\Delta(\textit{atoSC})::\textit{FRT}$ con su actividad obtenida en la cepa silvestre. Esta comparación mostró que la delección del operón *atoSC* no modifica la actividad transcripcional de ninguna de los alelos de *iha*. La **Figura 20A** muestra el resultado obtenido para el alelo cromosomal de *iha*. Usando la misma técnica, y con la finalidad de saber si la sola presencia del activador acetoacetato modificaba la expresión de alguno de los alelos, se investigó la actividad transcripcional relativa de ambos alelos en la cepa mutante $\Delta(\textit{atoSC})::\textit{FRT}$, determinando la actividad de cada alelo tanto en presencia como en ausencia del activador acetoacetato. Esta comparación mostró que la presencia del activador no modifica la actividad transcripcional de ningún alelo de *iha*. La **Figura 20B** muestra el resultado obtenido para el alelo cromosomal de *iha*. Finalmente, y con el objetivo de evaluar si el sistema AtoS-AtoC participaba en la regulación transcripcional de *iha*, se investigó si la activación de este sistema modificaba la actividad transcripcional de algún alelo (**Figura 20 C y D**). Esto se realizó comparando la actividad de *iha* obtenida en la cepa mutante $\Delta(\textit{atoSC})::\textit{FRT}$ contra la obtenida en la cepa silvestre, siempre en presencia del activador acetoacetato. En presencia de dicho activador, la actividad transcripcional de *iha* obtenida en la cepa mutante $\Delta(\textit{atoSC})::\textit{FRT}$ es igual a la obtenida en la cepa silvestre para ambos alelos. Estos resultados en conjunto, permiten concluir que el sistema AtoS-AtoC no participa regulando la actividad transcripcional de ninguno de los alelos del gen *iha*.

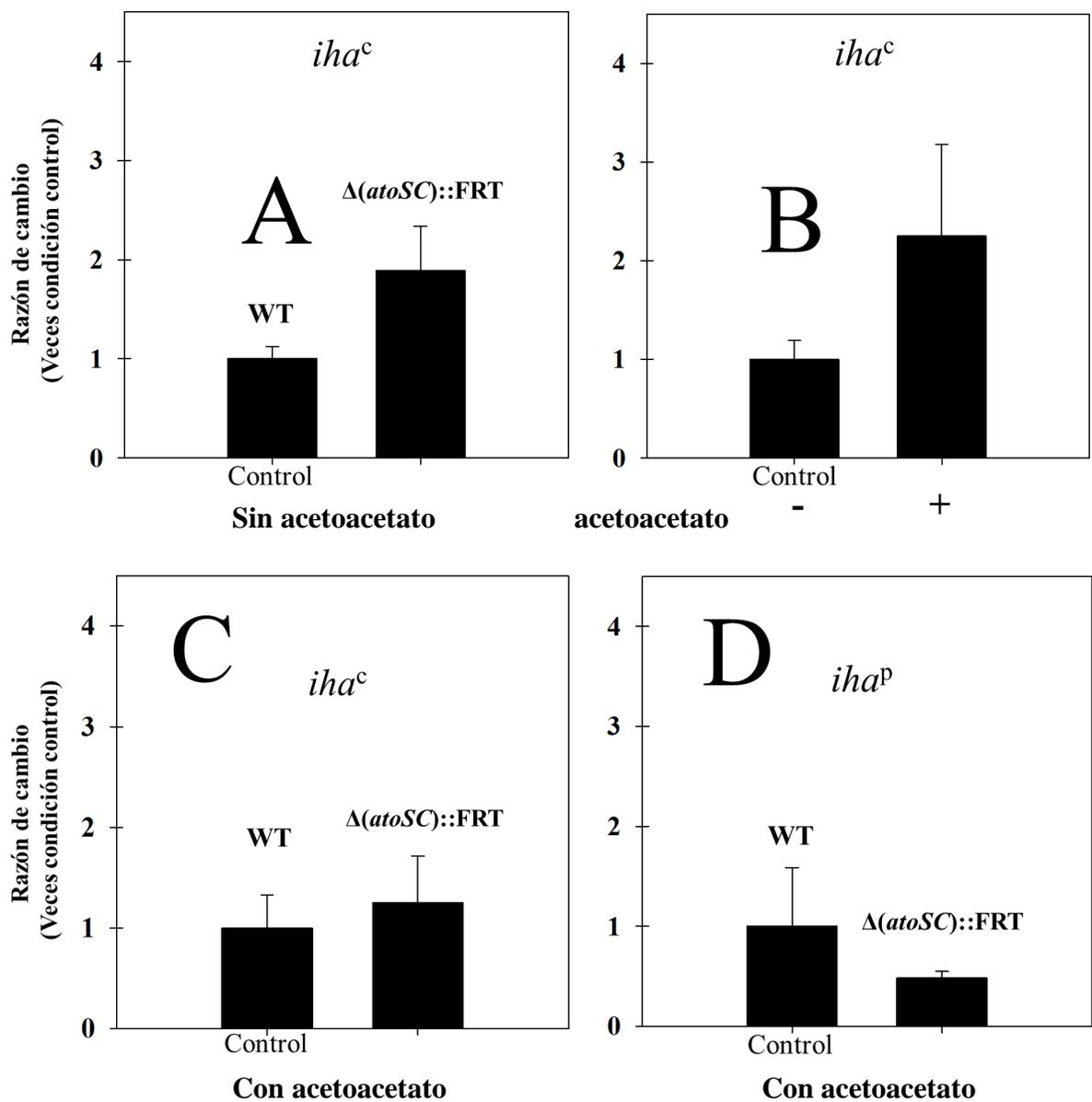


Figura 20. Participación del sistema AtoS-AtoC en la regulación de la expresión de *iha*.

En A se muestra el efecto que tiene la delección del operón *atoSC* sobre la expresión del alelo cromosomal de *iha*. En B se muestra el efecto que tiene la presencia del activador acetoacetato sobre la expresión del alelo cromosomal de *iha*, utilizando la cepa mutante $\Delta(atoSC)::FRT$. Los gráficos inferiores replican el experimento A, esta vez en presencia del activador acetoacetato. -: ausencia; +: presencia.

4. DISCUSIÓN

Los sistemas de transducción de señales de dos componentes (SDC) le permiten a la bacteria adaptarse a las condiciones ambientales cambiantes, modulando la transcripción de genes específicos (Stock, *et al.* 2000). El sistema AtoS-AtoC es un SDC que responde a la presencia periplasmática del activador químico acetoacetato (Jenkins & Nunn 1987). En presencia de acetoacetato el sistema AtoS-AtoC se activa promoviendo la expresión del operón *atoDAEB*, operón que codifica las enzimas necesarias para la utilización de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) (Kyriakidis & Tiligada 2009).

Se ha descrito que la presencia de SCFAs a nivel intestinal se encuentra relacionada con procesos bacterianos implicados en patogenicidad (Sun & O’Riordan 2013). Es así como en cepas STEC serotipo O157:H7 por ejemplo, el SCFA butirato es capaz de unirse al sitio de unión a ligando de Lrp (regulador transcripcional global que regula, entre otras cosas, la síntesis de pili), activando la expresión de genes de virulencia presentes en la isla LEE que son necesarios para la generación de lesiones A/E (Nakanishi, *et al.* 2009). De hecho, en la cepa STEC LEE⁻ 98NK2 serotipo O113:H21, concentraciones de SCFAs similares a las encontradas en el colon promueven la expresión del gen *iha* (Herold, *et al.* 2009).

El gen *iha* codifica una adhesina que participa en procesos de autoagregación y formación de biopelículas, siendo descrita como un importante factor de virulencia, capaz de otorgar un fenotipo adherente a cepas que carecen de mecanismos de adherencia (Tarr, *et al.* 2000; Van der Woude & Henderson 2008).

Análisis previos realizados en nuestro laboratorio muestran que en STEC existe una nueva isla de patogenicidad (PAI) denominada isla LAA, la cual se encuentra presente únicamente en cepas STEC LEE⁻ (Montero, *et al.* 2017). Esta nueva PAI alberga al operón *atoSC* el cual codifica el SDC AtoS-AtoC y al gen *iha* el cual codifica la adhesina homónima.

Con estos antecedentes, este trabajo tuvo como objetivo principal determinar si el sistema AtoS-AtoC participa en la regulación que ejercen los SCFAs sobre la expresión del gen *iha*. Para esto se determinó primeramente si la presencia de SCFAs activaba al sistema AtoS-AtoC y posteriormente, si la activación de este sistema modificaba el efecto que tenían los SCFAs sobre la expresión de *iha*. Esto se realizó usando como modelo de estudio una cepa STEC LAA⁺ serotipo O91:H21, cultivando ésta con una mezcla de SCFAs que emula la presencia de SCFAs en el colon humano (Herold, *et al.* 2009). La participación del sistema AtoS-AtoC fue investigada utilizando la mutante isogénica $\Delta(atoSC)::FRT$ y el activador previamente descrito, acetoacetato (Jenkins & Nunn 1987).

Mediante el uso de RT-PCR se pudo determinar que, en el modelo de estudio utilizado, el sistema AtoS-AtoC responde al activador acetoacetato promoviendo más de 1.200 veces la expresión del operón *atoDAEB* (presentado en la sección 3.1.1). Puesto que la activación del sistema AtoS-AtoC es una condición previa necesaria para la expresión del operón *atoDAEB*, la actividad transcripcional de este último operón puede ser utilizada como un indicativo de activación del sistema (Jenkins & Nunn 1987). La presencia del activador acetoacetato no modificó la expresión del operón *atoSC* (codificante del SDC) sugiriendo que no existe un mecanismo de tipo autorregulatorio por parte del sistema sobre su mismo operón, característica previamente reportada para otros SDC presentes en *E. coli* como; PhoPQ, PhoBR, VanRS, CpxRA y CusRS (Ray & Igoshin 2010).

En la cepa estudiada, la remoción de los ORF de los genes constituyentes del operón *atoSC* provocó la sobreexpresión del operón *atoDAEB* en más de 30 veces, sugiriendo que la delección provoca un efecto polar sobre la expresión del operón *atoDAEB* (presentado en la sección 3.1.2). Esta idea se fundamenta principalmente en la similitud que existe entre las actividades transcripcionales del operón *atoSC* en la cepa silvestre y la del operón *atoDAEB* en la cepa mutante.

Pese a que la no detección del transcrito de *atoDAEB* en la condición control implica la existencia de un mecanismo de término de la transcripción para el operón *atoSC*, mediante análisis bioinformáticos no se encontraron terminadores de la transcripción de tipo rho-independientes en la región intergénica presente entre ambos operones. Los resultados presentados no permiten discernir el origen del efecto polar. Se requieren futuros estudios para determinar si este efecto se debe a la remoción *per se* de los ORFs del operón *atoSC* o si más bien se debe a la falta de las proteínas constituyentes del sistema AtoS-AtoC.

En este estudio se muestra que la presencia del sistema AtoS-AtoC en ausencia del activador acetoacetato es capaz de revertir la sobreexpresión del operón *atoDAEB* causada por la delección $\Delta(\textit{atoSC})::\text{FRT}$ (presentado en la sección 3.1.4). Este resultado sugiere que el sistema tiene alguna participación en la regulación a nivel transcripcional del operón *atoDAEB*, incluso en ausencia del activador acetoacetato. Esta observación es coherente, y podría ser explicada en parte, con la capacidad que tiene AtoC de unirse al promotor del operón *atoDAEB*, incluso en ausencia de activación (Matta, *et al.* 2007). Se requieren de nuevos estudios para revelar la mecánica asociada a la regulación transcripcional del operon *atoDAEB*.

En la cepa mutante complementada $\Delta(\textit{atoSC})::\text{FRT}/\text{pVB1}^{\textit{atoSC}}$, la sobreexpresión del operón *atoSC* recombinante provocada por la presencia del inductor ácido toluico impide la activación del sistema AtoS-AtoC, esto es, en presencia del activador acetocetato no se observa expresión asociada al operón *atoDAEB* (presentado en la sección 3.1.3). Puesto que la presencia del inductor ácido toluico por una parte, promueve la expresión del sistema AtoS-AtoC recombinante y por otra, no impide la activación del sistema silvestre por acetoacetato, es plausible sugerir que la sobreexpresión de *atoSC* genera un concomitante aumento en masa del regulador AtoC capaz de afectar la función del sistema, induciendo su propia degradación mediante la generación de cuerpos de inclusión (Villaverde & Carrió 2003).

En la cepa silvestre, la presencia de SCFAs no solo no activa el sistema AtoS-AtoC, sino que además impide la activación del sistema mediada por el activador acetoacetato (presentado en las secciones 3.1.5 y 3.1.6, respectivamente). La idea de que la mezcla de SCFAs aquí utilizada pudiese activar el sistema AtoS-AtoC (de forma análoga a acetoacetato), proviene principalmente de la presencia del SCFA butirato en la mezcla. En *E. coli*, el operón *atoDAEB* permite la utilización tanto del activador acetoacetato como del SCFA butirato (Clark & Cronan 2005). Pese a que no se puede concluir que el butirato no active el sistema AtoS-AtoC (al no ser el único constituyente de la mezcla), es probable que esto sea cierto, puesto que la utilización de butirato requiere la expresión coordinada del operón *fadBA*, a diferencia del activador acetoacetato, cuya metabolización solo requiere de la expresión del operón *atoDAEB* (Fischbach & Sonnenburg 2011).

Por otro lado, el impedimento en la activación del sistema AtoS-AtoC provocado por los SCFAs pareciera responder a un efecto de tipo generalizado en la cepa silvestre, puesto que la presencia de SCFAs disminuye la tasa de crecimiento de todas las cepas estudiadas (presentado en la sección 3.1.7). Este resultado es coherente con lo informado previamente por Herold *et al.*, estudiando la cepa STEC LEE⁻ 98NK2 serotipo O113:H21 (Herold, *et al.* 2009). En el estudio mencionado, la presencia de SCFAs a las concentraciones colónicas aquí utilizadas no solo retrasa el crecimiento, sino que además sobreexpresa el alelo cromosomal del gen *iha*. El mismo trabajo no especifica; i) la composición exacta de sales totales presentes en el medio suplementado con SCFAs, ii) la función matemática exacta del cálculo de error de la función $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y iii) la naturaleza del error graficado en sus figuras. En lo que respecta al primer punto, existe evidencia vinculante entre la osmolaridad y el sistema AtoS-AtoC. Así Oshima *et al.*, informaron que la mutación $\Delta(ompR-envZ)$ modifica la expresión del operón *atoSC* (Oshima, *et al.* 2002). De manera adicional, se ha reportado que la cepa mutante $\Delta(atoSC)$ exhibe una clara susceptibilidad a condiciones específicas de osmolaridad, viéndose modificado su crecimiento por el cloruro de sodio pero no por cloruro de potasio (Zhou, *et al.* 2003).

Pese a que en este trabajo la cepa mutante estudiada $\Delta(atoSC)::FRT$, no presentó diferencias en su tasa de proliferación respecto a la cepa silvestre, los detalles mecánicos no resueltos detrás de las evidencias antes presentadas (Oshima, *et al.* 2002; Zhou, *et al.* 2003) podrían dar cuenta del efecto que tienen los SCFAs sobre la tasa de crecimiento y sobre la funcionalidad del sistema AtoS-AtoC (presentado en las secciones **3.1.6** y **3.1.7**). Al respecto, Dong *et al.* informaron que el principal factor sigma involucrado en osmolaridad (σ^S) compite con el factor sigma requerido para promover la transcripción del operón *atoDAEB* (σ^N) (Altendorf, *et al.* 2009; Dong, *et al.* 2011). Esto podría explicar la incapacidad del activador acetoacetato de activar el sistema AtoS-AtoC en presencia de SCFAs. Derimir tal situación requiere de futuros estudios que contemplen la osmolaridad como variable controlada del diseño experimental.

En el presente trabajo no se pudo replicar el efecto previamente descrito de activación sobre la expresión de *iha* que causa la presencia de los SCFAs (informado por Herold, *et al.* 2009, y presentado aquí en la sección **3.2.2**). Puesto que ambos trabajos hacen uso de cepas STEC cuyo crecimiento se ve afectado por la presencia de SCFAs, es probable que tales discrepancias respondan a diferencias de tipo metodológicas pertinentes a la técnica de qRT-PCR. Durante la realización de este trabajo, se evaluó la factibilidad que tenía el gen *rrsH* de ser usado como gen calibrador para los ensayos de amplificación en tiempo real (gen utilizado por Herold *et al.*, con el mismo fin), sin lograr ajustarse a los parámetros establecidos por la guía MIQUE, guía que entre cosas, pretende instaurar consensos sobre el uso del qRT-PCR como herramienta de estudio de la expresión génica (Bustin, *et al.* 2009). Al respecto, existen múltiples formas de obtener el valor de cambio en la expresión génica utilizando una única función matemática. La misma premisa aplica al cálculo de error asociado, y por ende, a lo que se informa como diferencia en la actividad transcripcional de un gen. Estas posibilidades podrían justificar las discrepancias observadas para el gen *iha*.

Pese a lo anterior, en este trabajo se demuestra la existencia de dos alelos para el gen *iha* en la cepa silvestre (presentado en la sección 3.2.1). Ambos alelos pueden ser detectados de manera específica y discriminante y de seguro, dado el cociente de actividad transcripcional existente entre ambos, responden a genes funcionales independientes. Este resultado es coherente con trabajos previos (Rashid, *et al.* 2006; Herold, *et al.* 2009) y sugiere que la duplicación alélica del gen *iha* no es un evento infrecuente en cepas LEE⁻. Además, la elevada actividad transcripcional relativa entre ambos alelos es razonable con la idea de la disposición plasmidial de una de ellas. Se conoce que el megaplásmido de virulencia pO113 (presente en cepas LEE⁻) difiere significativamente del plásmido pO157 (presente en cepas LEE⁺). De hecho, los genes codificantes de las adhesinas *iha* y *subA/B* son exclusivos de pO113 (ausentes en pO157) (Newton, *et al.* 2009). Se precisan nuevos estudios que permitan entender cuál es el significado biológico, si existe, de dicha duplicación.

La idea central de este trabajo fue investigar si el sistema AtoS-AtoC participa en la activación que provocan, a nivel transcripcional, los SCFAs sobre *iha* (Herold, *et al.* 2009). Esto supuso ubicar al sistema AtoS-AtoC en medio del eje SCFA-*iha* (hipótesis de trabajo), estudiando de manera sistemática las relaciones SCFAs-sistema y sistema-*iha* (objetivos). Pese a que el efecto de activación que producen los SCFAs sobre *iha* no pudo ser replicado en nuestro modelo de estudio, se observó que los SCFAs no activaban al sistema AtoS-AtoC y adicionalmente, que la activación de este sistema, mediante el uso del activador acetoacetato, no modificaba la actividad transcripcional de ninguna de los alelos de *iha*. Estos resultados permiten rechazar la hipótesis de trabajo planteada.

5. CONCLUSIONES

- **Los SCFAs no activan el sistema AtoS-AtoC.** Es más, la presencia de SCFAs impide la activación del sistema AtoS-AtoC mediada por el activador acetoacetato.

- **El sistema AtoS-AtoC no participa regulando la expresión de ninguna de los alelos de *iha*.** En el modelo estudiado, y contrario a lo descrito, la presencia de SCFAs no modifica la actividad transcripcional de *iha*.

Estas conclusiones permiten rechazar la hipótesis planteada. Sin embargo, en la presente memoria se realizaron observaciones sobre el funcionamiento del sistema AtoS-AtoC concernientes a la regulación transcripcional que ejerce sobre el operón *atoDAEB*. Es así como:

- En la cepa silvestre, la presencia del activador acetoacetato sobreexpresa el operón *atoDAEB* más de 1.200 veces de una manera AtoS-AtoC dependiente.

- La delección de los ORFs constituyentes del operón *atoSC* sobreexpresa el operón *atoDAEB* más de 30 veces. La complementación de la cepa mutante $\Delta(\textit{atoSC})::\text{FRT}$, con el sistema AtoS-AtoC, es capaz de revertir este efecto en ausencia del activador acetoacetato.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ALTENDORF, K., BOOTH, I., GRALLA, J., GREIE, J., ROSENTHAL, A., & WOOD, J.** 2009. Osmotic stress. *EcoSal Plus* 3(2).
- BATTESTI, A., & BOUVERET, E.** 2006. Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. *Molecular microbiology* 62(4):1048-1063.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA, M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., & SHIPLEY, G. L.** 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical chemistry* 55(4):611-622.
- CANELLAKIS, E., PATERAKIS, A., HUANG, S., PANAGIOTIDIS, C., & KYRIAKIDIS, D.** 1993. Identification, cloning, and nucleotide sequencing of the Ornithine decarboxylase antizyme gene of *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(15):7129-7133.
- CLARK, D., & CRONAN, J.** 2005. Two-carbon compounds and fatty acids as carbon sources. *EcoSal Plus* 1(2).
- COOK, S., & SELLIN, J.** 1998. Short chain fatty acids in health and disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* 12(6):499-507.
- COSTERTON, J., INGRAM, J., & CHENG, K.** 1974. Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. *Bacteriological reviews* 38(1):87.
- CUMMINGS, J., & MACFARLANE, G.** 1991. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *Journal of Applied Bacteriology* 70(6):443-459.
- CUMMINGS, J. H.** 1981. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* 22(9):763.
- CHEREPANOV, P. P., & WACKERNAGEL, W.** 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: Tc^R and Km^R cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158(1):9-14.
- DATSENKO, K. A., & WANNER, B. L.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(12):6640-6645.
- DEIBEL, C., KRÄMER, S., CHAKRABORTY, T., & EBEL, F.** 1998. EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host cells, where it appears as a Tyrosine-phosphorylated 90 kDa protein. *Molecular microbiology* 28(3):463-474.
- DEN BESTEN, G., VAN EUNEN, K., GROEN, A. K., VENEMA, K., REIJNGOUD, D.-J., & BAKKER, B. M.** 2013. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *Journal of lipid research* 54(9):2325-2340.
- DIRUSSO, C. C., & NYSTRÖM, T.** 1998. The fats of *Escherichia coli* during infancy and old age: regulation by global regulators, alarmones and lipid intermediates. *Molecular microbiology* 27(1):1-8.
- DOBRINDT, U., HOCHHUT, B., HENTSCHEL, U., & HACKER, J.** 2004. Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nature Reviews Microbiology* 2(5):414-424.
- DONG, T., YU, R., & SCHELLHORN, H.** 2011. Antagonistic regulation of motility and transcriptome expression by RpoN and RpoS in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 79(2):375-386.
- ELLIOTT, S. J., WAINWRIGHT, L. A., MCDANIEL, T. K., JARVIS, K. G., DENG, Y., LAI, L. C., MCNAMARA, B. P., DONNENBERG, M. S., & KAPER, J. B.** 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Molecular microbiology* 28(1):1-4.
- ENDO, Y., TSURUGI, K., YUTSUDO, T., TAKEDA, Y., OGASAWARA, T., & IGARASHI, K.** 1988. Site of action of a Verotoxin (VT2) from *Escherichia coli* O157: H7 and of Shiga-toxin on eukaryotic ribosomes. *European Journal of Biochemistry* 171(1-2):45-50.

- ETHELBERG, S., OLSEN, K., SCHEUTZ, F., JENSEN, C., SCHIELLERUP, P., ENBERG, J., PETERSEN, A. M., OLESEN, B., GERNER-SMIDT, P., & MOLBAK, K.** 2004. Virulence factors for Hemolytic Uremic Syndrome, Denmark. *Emerging infectious diseases* 10(5):842-7.
- FARFÁN, M. J., INMAN, K. G., & NATARO, J. P.** 2008. The major pilin subunit of the AAF/II fimbriae from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates binding to extracellular matrix proteins. *Infection and immunity* 76(10):4378-4384.
- FISCHBACH, M. A., & SONNENBURG, J. L.** 2011. Eating for two: how metabolism establishes interspecies interactions in the gut. *Cell host & microbe* 10(4):336-347.
- FONG, W., HELLER, J., & CANELLAKIS, E.** 1976. The appearance of an Ornithine decarboxylase inhibitory protein upon the addition of Putrescine to cell cultures. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 428(2):456-465.
- FOSTER, J. W.** 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews Microbiology* 2(11):898-907.
- FRANKEL, G., & PHILLIPS, A. D.** 2008. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cellular microbiology* 10(3):549-556.
- FUJITA, Y., MATSUOKA, H., & HIROOKA, K.** 2007. Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Molecular microbiology* 66(4):829-839.
- GACA, A. O., COLOMER-WINTER, C., & LEMOS, J. A.** 2015. Many means to a common end: the intricacies of (p) ppGpp metabolism and its control of bacterial homeostasis. *Journal of bacteriology* 197(7):1146-1156.
- HACKER, J., & CARNIEL, E.** 2001. Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. *EMBO reports* 2(5):376-381.
- HAURYLIUK, V., ATKINSON, G. C., MURAKAMI, K. S., TENSION, T., & GERDES, K.** 2015. Recent functional insights into the role of (p) ppGpp in bacterial physiology. *Nature reviews microbiology* 13(5):298.
- HEROLD, S., PATON, J. C., SRIMANOTE, P., & PATON, A. W.** 2009. Differential effects of short-chain fatty acids and Iron on expression of *iha* in Shiga-toxigenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 155(11):3554-3563.
- HERSH, B. M., FAROOQ, F. T., BARSTAD, D. N., BLANKENHORN, D. L., & SLONCZEWSKI, J. L.** 1996. A Glutamate-dependent acid resistance gene in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 178(13):3978-3981.
- HIGUCHI, R., FOCKLER, C., DOLLINGER, G., & WATSON, R.** 1993. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Nature Biotechnology* 11(9):1026-1030.
- HLJOVA, E., & CHMELAROVA, A.** 2007. Short chain fatty acids and colonic health. *Bratislavské lekárske listy* 108(8):354.
- HOCH, J. A.** 2000. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current opinion in microbiology* 3(2):165-170.
- HOOPER, L. V., MIDTVEDT, T., & GORDON, J. I.** 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annual review of nutrition* 22(1):283-307.
- HURLEY, B. P., JACEWICZ, M., THORPE, C., LINCICOME, L. L., KING, A. J., KEUSCH, G. T., & ACHESON, D. W.** 1999. Shiga toxins 1 and 2 translocate differently across polarized intestinal epithelial cells. *Infection and immunity* 67(12):6670-6677.
- INOUE, H., NOJIMA, H., & OKAYAMA, H.** 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96(1):23-28.
- IRAM, S. H., & CRONAN, J. E.** 2006. The β -oxidation systems of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* are not functionally equivalent. *Journal of bacteriology* 188(2):599-608.
- JACEWICZ, M. S., ACHESON, D. W., BINION, D. G., WEST, G. A., LINCICOME, L. L., FIOCCHI, C., & KEUSCH, G. T.** 1999. Responses of human intestinal microvascular endothelial cells to Shiga toxins 1 and 2 and pathogenesis of hemorrhagic colitis. *Infection and immunity* 67(3):1439-1444.
- JENKINS, L. S., & NUNN, W. D.** 1987. Genetic and molecular characterization of the genes involved in short-chain fatty acid degradation in *Escherichia coli*: the Ato system. *Journal of bacteriology* 169(1):42-52.

JISHAGE, M., KVINT, K., SHINGLER, V., & NYSTRÖM, T. 2002. Regulation of ζ factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes & development* 16(10):1260-1270.

JOHNSON, J. R., JELACIC, S., SCHOENING, L. M., CLABOTS, C., SHAIKH, N., MOBLEY, H. L., & TARR, P. I. 2005. The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infection and immunity* 73(2):965-971.

KANAMARU, K., KANAMARU, K., TATSUNO, I., TOBE, T., & SASAKAWA, C. 2000. SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Molecular microbiology* 38(4):805-816.

KANJEE, U., & HOURY, W. A. 2013. Mechanisms of acid resistance in *Escherichia coli*. *Annual review of microbiology* 67:65-81.

KARMALI, M., PETRIC, M., STEELE, B., & LIM, C. 1983. Sporadic cases of Hemolytic Uremic Syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *The Lancet* 321(8325):619-620.

KIRK, M., PIRES, S., BLACK, R., CAIPO, M., CRUMP, J., DEVLEESSCHAUWER, B., DÖPFER, D., FAZIL, A., FISCHER-WALKER, C., HALD, T., HALL, A., KEDDY, K., LAKE, R., LANATA, C., TORGERSON, P., HAVELAAR, A., ANGULO, F. 2015. World Health Organization estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: A data synthesis. *PLoS medicine* 12(12):e1001921.

KYRIAKIDIS, D. A., & TILIGADA, E. 2009. Signal transduction and adaptive regulation through bacterial two-component systems: the *Escherichia coli* AtoSC paradigm. *Amino acids* 37(3):443-458.

LINDGREN, S., MELTON, A., & O'BRIEN, A. 1993. Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O91: H21 clinical isolates in an orally infected mouse model. *Infection and immunity* 61(9):3832-3842.

LINDSEY, R. L., TREES, E., SAMMONS, S., LOPAREV, V., FRACE, M., STROCKBINE, N., SABOL, A. L., SOWERS, E., STRIPLING, D., & MARTIN, H. 2014. Draft whole-genome sequences of nine non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Genome announcements* 2(4):e00501-14.

LINGWOOD, C. A., LAW, H., RICHARDSON, S., PETRIC, M., BRUNTON, J., DE GRANDIS, S., & KARMALI, M. 1987. Glycolipid binding of purified and recombinant *Escherichia coli* produced Verotoxin *in vitro*. *Journal of Biological Chemistry* 262(18):8834-8839.

LIOLIOU, E. E., & KYRIAKIDIS, D. A. 2004. The role of bacterial antizyme: from an inhibitory protein to AtoC transcriptional regulator. *Microbial cell factories* 3(1):8.

LIVAK, K. J., & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *methods* 25(4):402-408.

MARCH, J. 1992. *Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure*. Volume 1:840-843. John Wiley & Sons. Hoboken, Nueva Jersey.

MARINUS, M. G., & MORRIS, N. R. 1973. Isolation of Deoxyribonucleic acid methylase mutants of *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology* 114(3):1143-1150.

MATTA, M. K., LIOLIOU, E. E., PANAGIOTIDIS, C. H., KYRIAKIDIS, D. A., & PANAGIOTIDIS, C. A. 2007. Interactions of the antizyme AtoC with regulatory elements of the *Escherichia coli* AtoDAEB operon. *Journal of bacteriology* 189(17):6324-6332.

MESELSON, M., & YUAN, R. 1968. DNA restriction enzyme from *E. coli*. *Nature* 217(5134):1110-1114.

MONTERO, D. A., VELASCO, J., DEL CANTO, F., PUENTE, J. L., PADOLA, N. L., RASKO, D. A., FARFÁN, M., SALAZAR, J. C., & VIDAL, R. 2017. Locus of Adhesion and Autoaggregation (LAA), a pathogenicity island present in emerging Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Scientific Reports* 7.

MÜLLER, D., BENZ, I., LIEBCHEN, A., GALLITZ, I., KARCH, H., & SCHMIDT, M. A. 2009. Comparative analysis of the locus of enterocyte effacement and its flanking regions. *Infection and immunity* 77(8):3501-3513.

MURRAY, H. D., SCHNEIDER, D. A., & GOURSE, R. L. 2003. Control of rRNA expression by small molecules is dynamic and nonredundant. *Molecular cell* 12(1):125-134.

NAKANISHI, N., TASHIRO, K., KUHARA, S., HAYASHI, T., SUGIMOTO, N., & TOBE, T. 2009. Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology* 155(2):521-530.

- NATARO, J. P., & KAPER, J. B.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical microbiology reviews 11(1):142-201.
- NAVILLE, M., GHUILLOT-GAUDEFFROY, A., MARCHAIS, A., & GAUTHERET, D.** 2011. ARNold: a web tool for the prediction of Rho-independent transcription terminators. RNA biology 8(1):11-13.
- NEWTON, H., SLOAN, J., BULACH, D. M., SEEMANN, T., ALLISON, C., TAUSCHEK, M., & HARTLAND, E. L.** 2009. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains negative for locus of enterocyte effacement. Emerging infectious diseases. 15(3):372.
- O'BRIEN, A., TESH, V., DONOHUE-ROLFE, A., JACKSON, M., OLSNES, S., SANDVIG, K., LINDBERG, A., & KEUSCH, G.** 1992. Shiga toxin: biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. Volume 180:65-94. Springer. Berlin, Heidelberg.
- OSHIMA, T., AIBA, H., MASUDA, Y., KANAYA, S., SUGIURA, M., WANNER, B. L., MORI, H., & MIZUNO, T.** 2002. Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. Molecular microbiology 46(1):281-291.
- PATON, A. W., WOODROW, M. C., DOYLE, R. M., LANSER, J. A., & PATON, J. C.** 1999. Molecular characterization of a Shiga toxigenic *Escherichia coli* O113: H21 strain lacking *eae* responsible for a cluster of cases of Hemolytic Uremic Syndrome. Journal of clinical microbiology 37(10):3357-3361.
- PAULI, G., & OVERATH, P.** 1972. Ato operon: a highly inducible system for acetoacetate and butyrate degradation in *Escherichia coli*. The FEBS Journal 29(3):553-562.
- PHILLIPS, A., NAVABPOUR, S., HICKS, S., DOUGAN, G., WALLIS, T., & FRANKEL, G.** 2000. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. Gut 47(3):377-381.
- PRUMBOOM-BREES, I. M., MORGAN, T. W., ACKERMANN, M. R., NYSTROM, E. D., SAMUEL, J. E., CORNICK, N. A., & MOON, H. W.** 2000. Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157: H7 Shiga toxins. Proceedings of the National Academy of Sciences 97(19):10325-10329.
- RASHID, R. A., TARR, P. I., & MOSELEY, S. L.** 2006. Expression of the *Escherichia coli* IrgA homolog adhesin is regulated by the ferric uptake regulation protein. Microbial pathogenesis 41(6):207-217.
- RAY, J. C. J., & IGOSHIN, O. A.** 2010. Adaptable functionality of transcriptional feedback in bacterial two-component systems. PLoS computational biology 6(2):e1000676.
- RECORD JR, M. T., COURTENAY, E. S., CAYLEY, D. S., & GUTTMAN, H. J.** 1998. Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. Trends in biochemical sciences 23(4):143-148.
- REY, F. E., FAITH, J. J., BAIN, J., MUEHLBAUER, M. J., STEVENS, R. D., NEWGARD, C. B., & GORDON, J. I.** 2010. Dissecting the *in vivo* metabolic potential of two human gut acetogens. Journal of Biological Chemistry 285(29):22082-22090.
- ROE, A. J., O'BYRNE, C., MCLAGGAN, D., & BOOTH, I. R.** 2002. Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. Microbiology 148(7):2215-2222.
- ROY, C. C., KIEN, C. L., BOUTHILLIER, L., & LEVY, E.** 2006. Short-chain fatty acids: ready for prime time? Nutrition in clinical practice 21(4):351-366.
- SHARMA, V. K., & BEARSON, S. M. D.** 2013. Evaluation of the impact of quorum sensing transcriptional regulator SdiA on long-term persistence and fecal shedding of *Escherichia coli* O157: H7 in weaned calves. Microbial pathogenesis 57:21-26.
- SHEN, S., MASCARENHAS, M., RAHN, K., KAPER, J. B., & KARMAL, M. A.** 2004. Evidence for a hybrid genomic island in Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* CL3 (serotype O113: H21) containing segments of EDL933 (serotype O157: H7) O islands 122 and 48. Infection and immunity 72(3):1496-1503.
- STOCK, A. M., ROBINSON, V. L., & GOUDREAU, P. N.** 2000. Two-component signal transduction. Annual review of biochemistry 69(1):183-215.
- SUN, Y., & O'RIORDAN, M. X.** 2013. Regulation of bacterial pathogenesis by intestinal short-chain fatty acids. Advances in applied microbiology 85:93.

- TARR, P. I., BILGE, S. S., VARY, J. C., JELACIC, S., HABEEB, R. L., WARD, T. R., BAYLOR, M. R., & BESSER, T. E.** 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157: H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infection and immunity* 68(3):1400-1407.
- THOMAS, A., CHART, H., CHEASTY, T., SMITH, H., FROST, J., & ROWE, B.** 1993. Vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*, particularly serogroup O 157, associated with human infections in the United Kingdom: 1989–91. *Epidemiology and infection* 110(03):591-600.
- TOBE, T., NAKANISHI, N., & SUGIMOTO, N.** 2011. Activation of motility by sensing short-chain fatty acids via two steps in a flagellar gene regulatory cascade in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infection and immunity* 79(3):1016-1024.
- TOJO, S., SATOMURA, T., MATSUOKA, H., HIROOKA, K., & FUJITA, Y.** 2011. Catabolite repression of the *Bacillus subtilis* FadR regulon, which is involved in fatty acid catabolism. *Journal of bacteriology* 193(10):2388-2395.
- TOPPING, D. L., & CLIFTON, P. M.** 2001. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiological reviews* 81(3):1031-1064.
- TROEGER, C., FOROUZANFAR M., RAO, P., KHALIL, I., BROWN, A., SWARTZ, S., FULLMAN, N., MOSSER, J., THOMPSON, R. L., REINER JR, R., ABAJOBIR, A., ALAM, N., ALEMAYOHU, M. A., AMARE, A., ANTONIO, C., ASAYESH, H., AVOKPAHO, E., BARAC, A., BESHIR, M., BONEYA, D., BRAUER, M., DANDONA, L., DANDONA, R., FITCHETT, J. R., GEBREHIWOT, T., HAILU, G., HOTEZ, P. J., KASAEIAN, A., KHOJA, T., KISSOON, N., KNIBBS, L., KUMAR, G. A., RAI, R., EL RAZEK, H., MOHAMMED, M., NIELSON, K., OREN, E., OSMAN, A., PATTON, G., QORBANI, M., SHORE ROBA, H., SARTORIUS, H., SAVIC, M., SHIGEMATSU, M., SYKES, B., SWAMINATHAN, S., TOPOR-MADRY, R., UKWAJA, K., WERDECKER, A., YONEMOTO, N., ZAKI, M., LIM, S., NAGHAVI, M., VOS, T., HAY, S., MURRAY, C., & MOKDAD, A.** 2017. Estimates of global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoeal diseases: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet Infectious Diseases* 17(9):909-948.
- VAN DER WOUDE, M. W., & HENDERSON, I. R.** 2008. Regulation and function of Ag43 (flu). *Annual review of microbiology* 62:153-169.
- VILLAVERDE, A., & CARRIÓ, M. M.** 2003. Protein aggregation in recombinant bacteria: biological role of inclusion bodies. *Biotechnology letters* 25(17):1385-1395.
- WEISS, S. M., LADWEIN, M., SCHMIDT, D., EHINGER, J., LOMMEL, S., STÄDING, K., BEUTLING, U., DISANZA, A., FRANK, R., & JÄNSCH, L.** 2009. IRSp53 links the enterohemorrhagic *E. coli* effectors Tir and EspF U for actin pedestal formation. *Cell host & microbe* 5(3):244-258.
- ZHOU, L., LEI, X.-H., BOCHNER, B. R., & WANNER, B. L.** 2003. Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *Journal of bacteriology* 185(16):4956-4972.
- ZWICK, F., LALE, R., & VALLA, S.** 2013. Regulation of the expression level of transcription factor XylS reveals new functional insight into its induction mechanism at the Pm promoter. *BMC microbiology* 13(1):262.