

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



**“Influencia de la modificación Glu-Q del tRNA sobre
la expresión
del gen *virF* de *Shigella flexneri* en *Escherichia coli*”**

RUBY ARACELLY CARRASCO GAETE

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN CIENCIAS MÉDICAS Y
BIOLÓGICAS
MENCIÓN MICROBIOLOGÍA**

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

2011

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

INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina,
que la Tesis de Magister presentada por la candidata

RUBY ARACELLY CARRASCO GAETE

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para
optar al Grado de Magíster en Ciencias Médicas y Biológicas con mención
en Microbiología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 22 de
junio de 2011.**

Prof. Dr. Juan Carlos Salazar Garrido

Director de Tesis

Programa de Microbiología y Micología, ICBM

Facultad de Medicina, Universidad de Chile

COMISION INFORMANTE DE TESIS

Prof. Dr. Claudio Vásquez

Prof. Dr. Jonás Schneiderman

Prof. Dr. Rodrigo Villanueva

Prof. Dr. Germán Hermosilla

Presidente Comisión

A mi hijo Gabriel, eres la luz que me permite avanzar
A mi madre Elena, por su apoyo incondicional

AGRADECIMIENTOS

Primero que todo me gustaría agradecer a mi director de tesis, el Profesor Dr. Juan Carlos Salazar por guiarme y enseñarme durante todo este tiempo, por su amor a la ciencia, por su paciencia y entrega.

A mis compañeros y amigos en el programa de Microbiología: Alicia Marcoleta, Valeria Caballero, Cristian Maturana, Felipe Del Canto, Viviana Toledo, David Pezoa y Héctor Cortés por sus consejos y compañía.

Gracias también a mis amigos que me acompañaron desde afuera: Eduardo, Mangella, Daniela, Cristian y Ricardo.

Le agradezco infinitamente a mi madre Elena por su apoyo constante en este proceso, sin ella no habría logrado esto. Y por último, gracias a mi amado hijo Gabriel, que aunque está pequeño y no se da cuenta, me da las fuerzas para seguir adelante día a día.

Este trabajo fue financiado por el proyecto FONDECYT 1080308 de Dr. Juan C. Salazar

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
RESUMEN	8
ABSTRACT	10
I. INTRODUCCIÓN	12
Shigelosis como problema de salud pública	12
Mecanismo de patogénesis de <i>S. flexneri</i>	12
Regulación de la expresión de genes de virulencia en <i>S. flexneri</i>	15
Regulación de la expresión de <i>virB</i> en <i>Shigella</i>	17
Regulación de la expresión de <i>virF</i> en <i>Shigella</i>	18
II. HIPÓTESIS	22
III. OBJETIVO GENERAL	22
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
V. MATERIALES Y MÉTODOS	23
MATERIALES	23
1. Cepas bacterianas.	23
2. Plásmidos.	24
3. Reactivos.	25
MÉTODOS	26
1. Métodos Generales	26
1.1. Purificación de DNA plasmidial.	26
1.2. Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa.	26
1.3. Ligación de fragmentos de DNA en vectores.	26
1.4. Reacción de polimerasa en cadena (PCR).	26
1.5. Preparación de células quimiocompetentes.	27
1.6. Transformación de <i>E. coli</i>	27
1.7. Lisis de bacterias.	27
1.8. Cuantificación de proteínas.	28
1.9. Electroforesis en geles de poliacrilamida.	28
1.10. Sobreexpresión de proteína utilizando sistema de autinducción.	28
2. Clonamientos	29
2.1. Clonamiento en pET15b y pET20b.	29
2.2. Clonamiento en pGEX-2T.	30
2.3. Clonamiento en pACYCDuet.	30
2.4. Clonamiento en pWKS30.	31
2.5. Clonamiento en pBAD.	31
3. RT-PCR	32
4. Obtención de Anticuerpos Anti-VirF	33
5. Ensayos de “Western blotting”	34
VI. RESULTADOS	35
1. Analizar la expresión de <i>virF</i> en <i>E. coli</i> Δ <i>gluQ-rs</i> a nivel de la transcripción.	35
2. Analizar la expresión de <i>virF</i> en <i>E. coli</i> con la delección de <i>gluQ-rs</i> a nivel de la traducción.	40

2.1. Obtención de anticuerpos anti-VirF.....	40
2.2. Análisis de la proteína VirF.....	43
VII. DISCUSIÓN.....	45
VIII. CONCLUSIONES.....	48
IX. REFERENCIAS.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genotipos de las cepas bacterianas utilizadas.....	23
Tabla 2. Lista de partidores utilizados.....	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo propuesto para la estrategia invasora de <i>Shigella</i>	13
Figura 2. Representación del plásmido de virulencia de 230 kpb de <i>S. flexneri</i>	15
Figura 3. Esquema de la cascada de regulación de la expresión de los genes codificados en el PV por las proteínas VirB y VirF.....	17
Figura 4. Partidores utilizados en el clonamiento de <i>virF</i>	29
Figura 5. Construcción del plásmido recombinante pVirFStag-CM.....	32
Figura 6. Clonamiento de <i>virF</i> con su promotor en el vector pACYC Duet.....	36
Figura 7. Análisis transcripcional de <i>virF</i> en las cepas de <i>E. coli</i> W3110, Δ <i>gluQ-rs</i> y <i>tgt</i>	37
Figura 8. Análisis de la cepa complementada.....	38
Figura 9. Análisis de la cepa W3110 Δ <i>gluQ-rs</i> /pVirFStag-CM complementada con el gen <i>gluQ-rs</i>	39
Figura 10. Análisis transcripcional de <i>virF</i> en las cepas W3110 silvestre y Δ <i>gluQ-rs</i>	40
Figura 11. Obtención de los plásmidos recombinantes pET15b-H ₆ <i>virF</i> y pET20b- <i>virFH</i> ₆	41
Figura 12. Clonamiento y purificación del fragmento Ser146-Phe269 de VirF.....	42
Figura 13. Inmunodetección del péptido VirF.....	43
Figura 14. Curva de crecimiento de W3110 silvestre y mutante Δ <i>gluQ-rs</i>	44

ABREVIATURAS

BSA:	Albúmina de suero de bovino
cDNA:	DNA complementario
IPTG:	Isopropilo-beta-tiogalactopiranosido
KDa:	Miles de daltons
Kpb:	Miles de pares de bases
PCR:	Reacción de polimerasa en cadena
PV:	Plásmido de virulencia
RT-PCR:	Reacción de transcriptasa reversa y polimerasa en cadena

RESUMEN

La shigelosis o disentería bacilar es causada por el enteropatógeno *Shigella* spp, que incluye las especies *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* y *S. boydii*. Se estima que provoca 1 millón de muertes al año en todo el mundo, por lo que la Organización Mundial de la Salud ha establecido como prioridad el desarrollo de vacunas para combatir esta enfermedad. En Chile, *Shigella* causa aproximadamente el 12% de diarreas agudas y 30% de síndrome disentérico en niños menores de 5 años y los casos más severos están asociados a infección por *S. flexneri*. Después de la ingesta, *Shigella* llega hasta el colon, sobrevive el ataque de macrófagos residentes, induce su endocitosis en células no fagocíticas y se disemina a través del epitelio intestinal. Esta capacidad de la bacteria de infectar se debe a la presencia de un plásmido de virulencia (PV), específicamente de la “región de entrada”, en que están codificadas las proteínas necesarias para invadir la mucosa colónica. Los principales reguladores transcripcionales de los genes de virulencia del PV son las proteínas VirF y VirB. La importancia de VirF radica en la regulación de la expresión del gen *virB*; a su vez, el producto de éste regula los genes de la región de entrada. La expresión de *virF* está finamente controlada, siendo la regulación a nivel traduccional importante, mediada por modificaciones post transcripcionales de los tRNA. La ausencia de la base modificada queuosina (Q) provoca disminución de la cantidad de VirF, con un efecto en la virulencia de *Shigella*. Q es hipermodificada en *E. coli* por la enzima glutamil queuosina-tRNA sintetasa (GluQ-RS), que agrega un glutamato a esta base. El gen *gluQ-rs* está presente en *S. flexneri*, pero no hay estudios acerca de su papel en la patogenia de esta bacteria. En el presente trabajo se estudió la expresión del gen *virF* de *S. flexneri* clonado en un vector de expresión a nivel de su transcripción y traducción en cepas de *E. coli* W3110 silvestre y mutante en el gen *gluQ-rs*. Los experimentos de RT-PCR y “Western blot” no mostraron diferencias claras en los niveles

de mRNA de *virF* ni de proteína entre las cepas silvestre y mutante. Se observó además que la presencia de *virF* altera el crecimiento de la cepa silvestre y no así de la cepa mutante. En el futuro sería atractivo estudiar la influencia de VirF sobre la expresión de otros genes no codificados en el PV.

ABSTRACT

Shigellosis or Bacillary Dysentery is caused by the enteric pathogen *Shigella* spp. It includes *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* and *S. boydii*. In the world, it causes over a million deaths per year, thus the World Health Organization has established a priority the develop of vaccines against this pathogen. In Chile, *Shigella* causes 12% of acute diarrheas and 30% of dysenteric syndromes in children under 5 years old. More severe cases are associated with *Shigella flexneri* infection. After *Shigella* is ingested, it reaches the colon and survives the macrophages attack; then induces its endocytosis into non phagocytic cells and spreads trough the intestinal epithelium. The ability of *Shigella* to infect is due to the presence of the Virulence Plasmid (VP), specifically, the “entry region”, which encodes proteins involved in invasion. The two mayor virulence transcriptional regulators are VirF and VirB. The importance of VirF lays on the regulation of the *virB* gene expression; which product regulates the expression of the entry region genes. *virF* expression is finely controlled being traductional regulation important, which it is mediated by tRNA post-transcriptional modifications. The absence of the modified base queuosine (Q) results in lower levels of VirF protein, affecting the virulence of *Shigella*. In *E. coli*, Q is hypermodified by the glutamyl queuosine-tRNA synthetase (GluQ-RS), adding a glutamate to the base. The *gluQ-rs* gen is present in *S. flexneri*, but no investigations have been conducted to understand its possible role in the bacterial pathogenicity. In the present work I studied the expression of the *virF* gene cloned into an expression vector at the transcriptional and traductional levels in wild type *E. coli* W3110 and Δ *gluQ-rs*. The RT-PCR and western blot experiments did not show clear differences between wild type and Δ *gluQ-rs* *E. coli* mRNA or protein levels. However, I noticed that the presence of the *virF* gene impairs the growth to wild type strain, but not the

mutant. It would be interesting in the future to study the influence of VirF on the expression of not PV-encoded genes.

I. INTRODUCCIÓN

Shigelosis como problema de salud pública

Shigella es un bacilo gram negativo, inmóvil, intracelular y anaerobio facultativo, agente causal de la shigelosis humana o disentería bacilar. Esta patología sigue siendo una importante causa de mortalidad en el mundo, principalmente en países en desarrollo. Según datos de la Organización Mundial de la Salud, hay cerca de 165 millones de casos de infección por *Shigella* en el mundo y cada año hay un millón de muertes por esta causa, por lo que se ha determinado como prioridad el desarrollo de vacunas contra este patógeno (Kottlof y cols., 1999). Existen cuatro especies del género *Shigella*: *S. flexneri*, *S. sonnei*, *S. dysenteriae* y *S. boydii*.

En Chile, el síndrome diarreico agudo está dentro de las cinco causas principales de muerte en menores de 5 años. *Shigella* es causante de aproximadamente el 12% de diarreas agudas y 30% de síndrome disentérico en este grupo etario (Ferrecio y cols., 1991; Henríquez y cols., 1999). En nuestro país, las especies más frecuentemente aisladas son *S. sonnei* y *S. flexneri* (Boheme y cols., 2004; Prado y cols., 1999), siendo esta última la que provoca cuadros más severos (Hamilton y cols., 2007).

Mecanismo de patogénesis de *S. flexneri*

S. flexneri posee una baja dosis infectiva, siendo capaz de desarrollar el cuadro clínico con una ingesta de 10 a 100 bacterias (DuPont y cols., 1989). Esto puede ser explicado por su resistencia al medio ácido y sobrevivida en el estómago (Small y cols., 1994), pudiendo alcanzar finalmente el intestino. Una vez en el intestino grueso, *Shigella* es traslocada desde el lumen hacia la membrana basal por las células M. Los macrófagos residentes fagocitan a *Shigella*, pero sobrevive a este ataque al liberarse del fagosoma e inducir apoptosis vía caspasa-1

(Ogawa y cols., 2008). También estimula una respuesta inflamatoria induciendo la liberación de IL-18 e IL-1 β , que actúan como quimioattractantes para polimorfonucleares, lo que provoca destrucción del epitelio y facilita la diseminación de la bacteria (Figura 1). Luego de escapar de la fagocitosis, *Shigella* utiliza la maquinaria celular e induce su entrada por la membrana basolateral del enterocito, que es la única zona donde *Shigella* es capaz de invadir, probablemente debido a receptores de membrana específicos de este dominio (Mounier y cols., 1992; Skoudy y cols., 2000; Watarai y cols., 1996;). *Shigella* spp. provoca rearrreglos de los filamentos de actina del citoesqueleto, generando ondulaciones o deformaciones en la membrana de la célula eucarionte que envuelven la bacteria en una vacuola, posteriormente se libera y disemina en el epitelio.

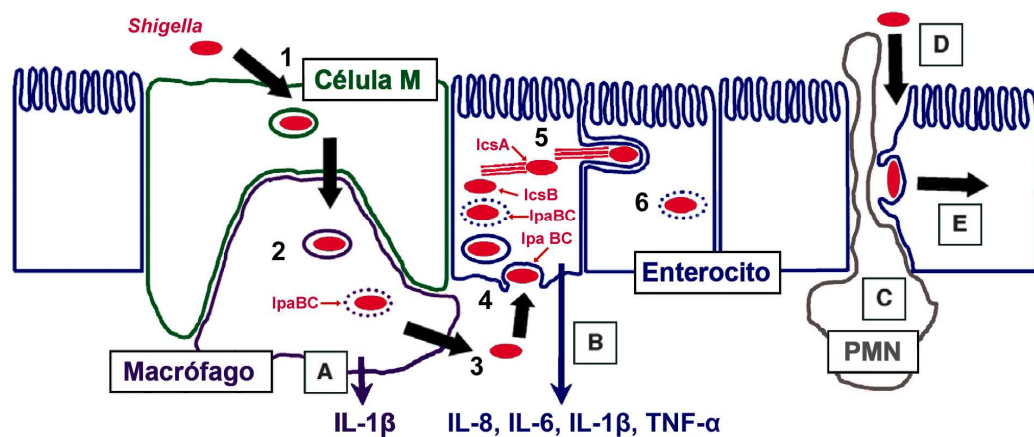


Figura 1. Modelo propuesto para la estrategia invasora de *Shigella*. (1) Una vez traslocada por células M, *Shigella* debe sobrevivir el ataque por macrófagos (2), en los que induce apoptosis; alcanza el polo basolateral de las células epiteliales (3) e induce su entrada (4). El movimiento intracelular de la bacteria (5) lleva a la formación de protrusiones y diseminación dentro del epitelio (6). Gatilla liberación de IL-1 β por los macrófagos apoptóticos (A), IL-8 y otras citoquinas por las células epiteliales (B), lo que promueve reclutamiento de polimorfonucleares que migran a través de la barrera epitelial (C), facilitando la entrada luminal de la bacteria a las células epiteliales (D) y mayor invasión del epitelio. Adaptado de Parsot, 2005.

Las proteínas requeridas en la patogénesis de *Shigella* se encuentran codificadas en el plásmido de virulencia (PV), que posee un tamaño de 230 kb y de secuencia conocida (Sansoneetti y cols., 1981; Venkatesan y cols., 2001) (Figura 2). El proceso de invasión sucede gracias a los productos de genes localizados en una región de 31 kb en el PV, conocida como “región de entrada” (Sasakawa, 1988). Estos genes incluyen un sistema de secreción tipo III (SSTT) codificado en el locus *mxi-spa*, los genes de las proteínas efectoras IpaA, IpaB, IpaC, IpaD, IpgB1, IpgD e IcsB y sus chaperonas IpgA, IpgC, IpgE y Spa15, codificadas en el operón *ipa*. El SSTT es un mecanismo ampliamente utilizado por bacterias Gram negativo patógenas que permite la secreción de proteínas, generalmente factores de virulencia, desde el citosol hacia la célula eucarionte (Cheng y Schneewind, 2000; Galán y Collmer, 1999;). Este sistema es conservado, pero las proteínas efectoras son diferentes para cada patógeno. En el caso de *Shigella*, IpaB e IpaD forman un complejo proteico que regula la secreción del SSTT; éste es activado cuando la bacteria establece contacto con la superficie de la célula del hospedero (Ménard y cols., 1993), lo que resulta en la secreción de las proteínas Ipa. Junto con IpaC, IpaB forma un poro en la membrana celular eucarionte que facilita la entrada de proteínas efectoras al enterocito (Cossart y Sansoneetti, 2004; Parsot, 2005;). IpaB por otra parte, es necesaria para escape del fagosoma y también para la activación de caspasa-1 y liberación de las citoquinas antes mencionadas (Figura 1) (Zychlinsky y cols., 1994). Una vez en el citoplasma eucarionte, *Shigella* escapa de la vacuola gracias a IpaB e IpaC y se moviliza al interior de la célula, diseminándose lateralmente mediante la formación de filamentos de actina en un polo de la célula, resultado de la interacción de la proteína de membrana IcsA/VirG con la proteína de la célula hospedera N-WASP y el complejo Arp2/3 (Suzuki y cols., 1998).

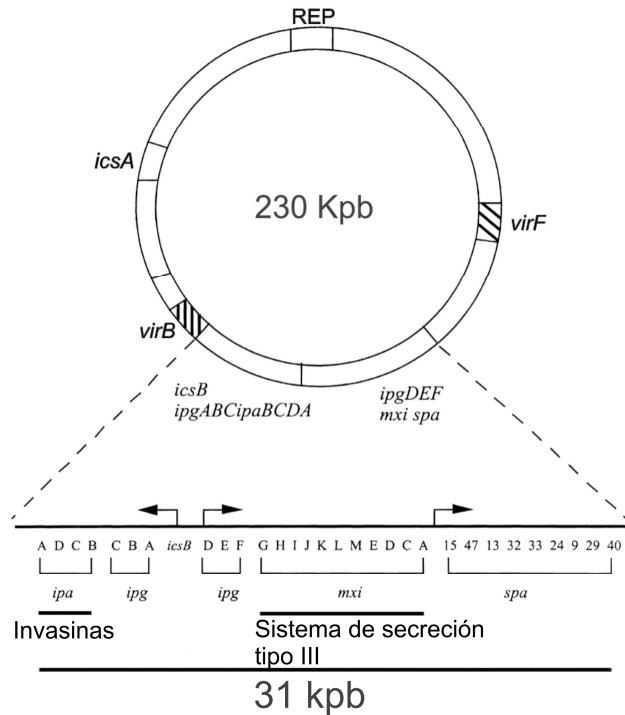


Figura 2. Representación del plásmido de virulencia de 230 kpb de *S. flexneri*. Abajo se destaca la región de entrada de 31 kpb. Las flechas angulares indican dirección de la transcripción. Rep, origen de replicación. No a escala. Adaptado de Dorman y cols., 2001.

Regulación de la expresión de genes de virulencia en *S. flexneri*.

El proceso de invasión, sobrevivencia intracelular y diseminación está finamente regulado por una serie de factores físicos y químicos incluyendo temperatura, osmolaridad y pH, así como también por proteínas reguladoras, codificadas en el PV. La expresión óptima de los factores de virulencia ocurre a 37 °C (Maurelli y cols., 1984), osmolaridad equivalente a suero fisiológico (Porter y Dorman, 1994) y pH 7,4 (Nakayama y cols., 1998), condiciones que ocurrirían en el ambiente donde se necesitará la expresión de los genes de virulencia, como el colon.

En el plásmido de virulencia también están codificados tres reguladores transcripcionales conocidos: VirF, VirB y MxiE y uno probable, Orf81 (Le Gall y cols., 2002). VirF es el regulador clave y da inicio a la cascada de regulación activando la transcripción del

gen *virB*, mientras que la proteína VirB activa la transcripción de los genes de la región de entrada y otros genes de virulencia codificados en el PV (Parsot, 2005) (Figura 3), incluido el gen que codifica al regulador transcripcional MxiE, que activa la transcripción de una serie de genes localizados fuera de la región de entrada del PV. MxiE se activa únicamente cuando el SSTT está activo (Mavris y cols., 2002). VirF activa además la expresión del gen requerido para movimiento intracelular *icsA/virG* (Wing y cols., 2004) y pertenece al grupo de reguladores tipo AraC que responden a señales físicas, como temperatura (Dorman y cols., 1998). Para el gen *orf81* no se ha demostrado participación en la activación transcripcional de algún gen específico (LeGall, 2002).

En el proceso de regulación mediada por temperatura está involucrada la proteína H-NS (Maurelli y Sansonetti, 1988), codificada en el cromosoma de *Shigella*, que ejerce un efecto represor en los promotores de varios genes de virulencia a temperaturas menores de 37 °C (Maurelli y cols., 1984; Porter y Dorman, 1997). H-NS es una proteína de unión a DNA de 15 kDa (Atlung e Ingmer, 1997; Bertin y cols., 1999). Es un componente mayor del nucleoide bacteriano y se encuentra en concentraciones de hasta 10^5 monómeros por célula (Williams y Rimsky, 1997). La unión de H-NS al DNA es independiente de la secuencia nucleotídica, pero la estructura y particularmente la curvatura del DNA es importante al determinar la afinidad de esta proteína a un sitio particular (Bracco y cols., 1989; Yamada y cols., 1990).

La mutación del gen *hns* en *S. flexneri*, provoca aumento en la expresión del SSTT a 30 °C (Porter y Dorman, 1994). Los genes regulados por esta proteína más estudiados son *virB* y *virF*.

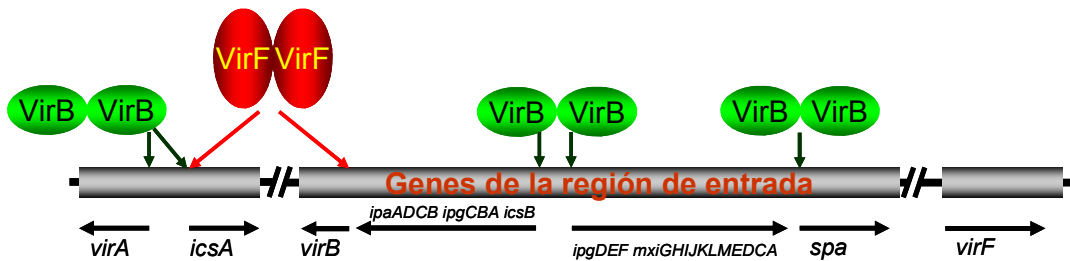


Figura 3. Esquema de la cascada de regulación de la expresión de los genes codificados en el PV por las proteínas VirB y VirF. Se representa los genes de la región de entrada y otros genes del PV. Las flechas verticales indican los promotores de los genes que son controlados por VirB o VirF. Las flechas horizontales indican la dirección de la transcripción de esos genes. No a escala.

Regulación de la expresión de *virB* en *Shigella*.

La importancia del gen *virB* para la expresión de genes de virulencia de *S. flexneri* se demostró por primera vez a través de mutagénesis del PV mediada por transposón (Watanabe y cols., 1990). Se observó que las proteínas IpaB e IpaC no se encontraban en mutantes para VirB aun si el gen *virF* estaba presente. Se ha determinado que la proteína VirB es capaz de unir DNA (Beloin y cols., 2002) y que la secuencia nucleotídica reconocida por ésta se sobrepone a la región reconocida por H-NS (Beloin y Dorman, 2003), ejerciendo un efecto antirrepositor con acción opuesta a H-NS, desplazándola y permitiendo que la RNA polimerasa reconozca el promotor (Turner y Dorman, 2007). Todos los genes regulados positivamente por VirB son reprimidos por H-NS (Beloin y Dorman, 2003). A su vez, la expresión de *virB*, es regulada positivamente por la proteína VirF y negativamente por la proteína H-NS (Tobe y cols., 1993). Además, existe un control determinado por cambios de temperatura, siendo reprimida a 30 °C, en la cual es importante la topología del DNA alrededor de la región promotora de *virB* (Tobe y cols., 1995). En *S. sonnei* se ha demostrado que la regulación de la expresión de *virB* mediada por temperatura ocurre a nivel post transcripcional, ya que a 30 °C

se observa represión de la síntesis de VirB (InvE), mientras que los niveles de mRNA son significativamente altos (Mitobe y cols., 2008).

Regulación de la expresión de *virF* en *Shigella*.

El regulador transcripcional inicial y principal es VirF. Esto se demostró en cepas con inactivación espontánea del gen *virF* y que presentan fenotipo avirulento (Mills y cols., 1992). En *S. flexneri*, la transcripción del gen *virF* se ve influenciada por varias proteínas. Así por ejemplo, el efecto de la temperatura está mediado por H-NS, que reprime la expresión al unirse a su promotor a 30 °C (Falconi y cols., 1998). VirF también regula negativamente la expresión de su propio gen (Porter y Dorman, 1997). La proteína IHF (factor de integración del hospedero) regula positivamente la transcripción de *virF* en fase logarítmica y estacionaria del crecimiento de *S. flexneri* (Porter y Dorman, 1997). En *S. sonnei* se ha visto que en la regulación de la expresión de *virF* mediada por pH está involucrado el sistema de dos componentes CpxR-CpxA (Nakayama y Watanabe, 1995).

VirF también puede ser regulado a nivel de traducción, jugando un papel importante las bases modificadas presentes en los tRNA. En eucariontes, procariontes y arquea, existen modificaciones post-transcripcionales de las bases en muchos tRNAs, pero la función de éstas no se conoce en su totalidad. Sin embargo, se ha planteado que permiten la fidelidad y eficiencia en la traducción (Björk, 1995; Curran, 1998) y también mantención del marco de lectura (Urbonavicius, 2001). Esto les confiere un papel importante en la regulación de la expresión de genes en distintos patógenos. En *Agrobacterium tumefaciens*, la ausencia de la base modificada isopentil adenosina provoca una reducción en su capacidad virulenta (Gray y cols., 1992). En *Pseudomonas aeruginosa*, la base modificada pseudouridina regula la expresión de los genes del SSTT (Ahn y cols., 2004). En *E. coli*, las proteínas GidA y MnmE

están involucradas en la adición de un grupo carboximetilaminometil (cmnm) en uridina 34 (U34) de algunos tRNAs. Se demostró que mutaciones del extremo amino terminal de GidA (proteína de unión a FAD) altera la capacidad de unir FAD y modificar tRNA, provocando deficiencia en crecimiento celular (Yim y cols., 2006). Otra modificación corresponde a la base modificada 7-metil-guanosina que es requerida para la infección del hongo fitopatógeno *Colletotrichum lagenarium* (Takano y cols., 2006).

Queuosina (Q) es una base modificada compleja, análogo de guanosina, que reemplaza a guanina (G) en posición 34 del anticodón de los tRNA de aspartato, asparragina, tirosina e histidina. Q está conservada en muchos organismos, lo que sugiere que esta modificación es de importancia. A partir de GTP y luego de 4 transformaciones enzimáticas, se genera PreQ₀, que es convertida a 7-amino-7-deazaguanina (PreQ₁) por la enzima PreQ₀ reductasa (Lee y cols., 2007). Mediante una reacción de transglicosilación, la enzima tRNA guanina transglicosilasa (TGT) reemplaza la base nitrogenada G del anticodón por PreQ₁, (Okada y cols., 1979). En el tRNA, PreQ₁ es modificada mediante la adición de un grupo epóxido ciclopentanediol por la enzima epoxiqueosina sintasa, dando origen a la epoxiqueuosina (oQ) (Jänel y cols., 1984; Morris y Elliott, 2001). El paso final que origina Q fue recientemente establecido identificándose a la enzima oQ reductasa o QueG, que convierte a la oQ en la base modificada Q ([7-(((4,5-cis-dihidroxy-2-ciclopenten-1-il)-amino)methyl)-7-deazaguanosina], Miles y cols., 2011). La base Q se encuentra en la primera posición del anticodón lo que facilitaría el balanceo o “wobble” de los tRNA correspondientes a los aminoácidos antes mencionados. Estudios realizados en *E. coli* mutantes en el gen *tgt* no han establecido claramente cuál sería el papel biológico de la modificación Q. Se piensa que esta base es importante para la supervivencia en un ambiente natural, ya que se ha observado que cepas *tgt* crecen más rápido que cepas control isogénicas, pero en condiciones desfavorables de

crecimiento, son menos viables (Noguchi y cols., 1982; Jänel y cols., 1984). Por otro lado, en el reconocimiento del tRNA^{Asp} por la enzima aspartil-tRNA sintetasa, la base modificada Q no juega ningún papel importante, es decir, la enzima aminoacila tRNA no modificado (tRNA^{AspG34}) y tRNA con la modificación queuosina (tRNA^{AspQ34}) (Martin y cols., 1993). Análisis basados en la estructura cristalográfica del tRNA^{Asp} han mostrado que hay diferencias en la afinidad de asociación codón-anticodón, dependiendo de la ausencia o presencia de queuosina. El tRNA^{AspG34} se asocia de manera más estable a citosina (GAC) y mucho menos al codón que contiene uridina (GAU), mientras que tRNA^{AspQ34} muestra igual afinidad por ambos codones (Morris y cols., 1999). Tras analizar la secuencia del mRNA del gen *virF* en *S. flexneri* en el laboratorio, se ha podido constatar que el uso de codones para aspartato contempla 10 codones GAU y sólo 1 codón GAC.

S. flexneri posee un gen con un 99% de homología a *tgt* denominado *vacC* (Durand y cols., 1994) y se han obtenido bacterias mutantes en este gen, generando la ausencia de la modificación Q (Durand y Bjork, 2003). En estas mutantes, se demostró que la cantidad de proteína VirF está disminuida, mientras la cantidad del mRNA permanece intacta, provocando una alteración en la expresión de genes de virulencia. La ausencia de la base Q reduce en un 50% la virulencia comparada con la cepa silvestre cultivada en medio nutritivo, mientras que en medio mínimo disminuye al 10% (Durand y cols., 2000). Además, al introducir un vector que contenga el gen *tgt* se restaura la expresión de *virF* y la virulencia de la bacteria, lo que sugiere que la modificación queuosina es importante en la traducción del mRNA de *virF*.

Un estudio *in vitro* realizado por el grupo de García, ha propuesto que TGT de *E. coli* reconoce una secuencia específica del mRNA de *virF* de *S. flexneri*, lo que también podría contribuir a la regulación post transcripcional de la expresión de este gen. Sin embargo, se

necesitan otros estudios que contribuyan a determinar la importancia fisiológica de esta posible modificación (Hurt y cols., 2007).

En estudios recientes realizados en *E. coli* se observó que la base Q es posteriormente modificada (Blaise y cols., 2004; Salazar y cols., 2004). En este proceso, la enzima glutamil-queuosina-tRNA sintetasa (Glu-Q-RS, antes denominada YadB) es capaz de activar un ácido glutámico y luego transferirlo al tRNA, uniendo el aminoácido a la base Q de ese tRNA. Esta reacción se realiza específicamente en el tRNA de aspartato, aún cuando la base Q también está presente en los otros tres tRNA mencionados (Dubois y cols., 2004; Salazar y cols., 2004).

El gen *gluQ-rs* no es esencial para *E. coli*, pues su inactivación no genera diferencias fenotípicas cuando la bacteria se crece en medios nutritivos o mínimos y a diferentes temperaturas (Salazar y cols., 2004). En *E. coli*, su expresión depende del promotor del gen adyacente *dksA*, constituyendo un operón (Dubois y cols., 2004). En el laboratorio, mediante análisis bioinformáticos, se ha detectado la presencia de este gen en *S. flexneri* y en más de 100 microorganismos. Además, la organización genómica *dksA–gluQ-rs* está conservada en más de 40 microorganismos (GenomeNet: <http://www.genome.jp>).

Considerando que las cuatro especies de *Shigella* y *E. coli* están estrechamente relacionadas con más de 90% de homología en su genoma (Jin y cols., 2002; Pupo y cols., 2000), y que hasta el momento en ninguna de las dos especies se han realizado estudios acerca de la función de la enzima GluQ-RS ni tampoco de la modificación Glu-Q, sería interesante y novedoso estudiar su papel sobre la expresión de algunos genes. El presente estudio pretende dilucidar el papel del producto génico de *gluQ-rs* sobre la expresión del gen que codifica para el regulador transcripcional VirF, utilizando como aproximación una cepa de *E. coli* con el gen *gluQ-rs* inactivo.

II. HIPÓTESIS

“El gen *virF* de *Shigella flexneri* es regulado postraduccionalmente a través de la modificación Glu-Q realizada por la enzima GluQ-RS en *Escherichia coli*”.

III. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la ausencia de la modificación Glu-Q por GluQ-RS sobre la expresión del gen *virF* de *S. flexneri* en *E. coli*.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar la expresión de *virF* en la mutante de *E. coli* Δ *gluQ-rs* a nivel de la transcripción de mRNA de *virF*.
2. Analizar la expresión de *virF* en la mutante de *E. coli* Δ *gluQ-rs* a nivel de la traducción de la proteína VirF.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES

1. Cepas bacterianas.

La cepa de *E. coli*, DH5 α fue utilizada para la mantenci3n y clonamiento de los pl3smidos recombinantes; la cepa BL21(DE3) fue utilizada en los experimentos destinados a la sobreexpresi3n y purificaci3n de prote3nas. El estudio de mRNA y s3ntesis de la prote3na VirF se desarroll3 en las cepas de *E. coli* W3110 silvestre y Δ *gluQ-rs* (W3110 Δ *gluQ-rs* Salazar y cols., 2004). Por su parte, la cepa JE7350, que contiene mutaci3n para el gen *tgt*, se utiliz3 como control en algunos experimentos. Las cepas utilizadas en la presente Tesis est3n resumidas en la Tabla 1.

Tabla 1. Genotipos de las cepas bacterianas utilizadas.

Cepa <i>Escherichia coli</i>	Genotipo	Referencia
BL21 (DE3)	F <i>omp T</i> , <i>hsd S_B</i> (<i>r_B⁻</i> , <i>m_B⁻</i>), <i>gal</i> , <i>dcm</i> , (DE3)	Sambrook y cols., 1989
DH5 α	F ⁻ <i>endA1 hsdR17 supE44 thi1 recA1 gyrA relA1 D(lacZYA-argF) U169(F80lacZDM15)</i>	Sambrook y cols., 1989
W3110	F ⁻ , λ ⁻ , IN(<i>rrnD-rrnE</i>)1, <i>rph</i> ⁻¹	Jensen, 1993
W3110 Δ <i>gluQ-rs</i>	W3110:: <i>kan^r</i> (Δ <i>gluQ-rs</i>)	Salazar y cols., 2004
JE7350	<i>leuB6</i> (Am), <i>secA206</i> (aziR), <i>fhuA23</i> , <i>lacY1</i> , <i>tgt</i> ⁻¹ , <i>entA403</i> , <i>glnV44</i> (AS), <i>LAM</i> ⁻ , <i>trpE38</i> , <i>rpsL109</i> (strR), <i>xylA5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>thi-1</i>	Nogushi y cols., 1982

2. Plásmidos.

El vector de clonamiento pTZ57R/T del kit de clonamiento InsTAclone™ PCR Cloning Kit de Fermentas® fue utilizado como paso previo en el proceso de clonamiento del gen *virF* con su promotor en pET15b y pET20b y del fragmento distal de 400 pb de este gen en pGEX-2T.

El vector **pET15b** contiene una secuencia de 6 histidinas codificadas en marco, río arriba del sitio de clonamiento, lo que permite obtener una proteína fusión con cola de histidina en el extremo amino terminal (pET15b-H₆*virF*). El vector **pET20b** posee esta secuencia río abajo del sitio de policlonamiento, lo que posibilita obtener una proteína con cola de histidinas en su extremo carboxilo terminal (pET20b-*virFH*₆). Ambos son inducibles por IPTG, por lo que fueron utilizados para sobreexpresar el gen *virF*.

El vector de expresión **pGEX-2T** (Amershan Pharmacia Biotech) fue utilizado para clonamiento, sobreexpresión y purificación de un péptido correspondiente al carboxilo terminal de la proteína VirF. Este plásmido contiene el gen que codifica para glutatión-S-transferasa (GST) adyacente al sitio de clonamiento, lo que permite obtener una proteína fusión entre GST y el péptido de interés. Esta estrategia permite la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad.

El plásmido **pACYCDuet** (Novagen) es un vector de clonamiento de mediano número de copias (aproximadamente 10-12 por bacteria), contiene el gen de resistencia a cloranfenicol y en él se clonó el gen *virF* y su promotor para ser utilizado en los ensayos de análisis de RNA y proteínas. El vector de bajo número de copias **pWKS30** (aproximadamente 6 copias por célula, Wang y cols., 1991) fue utilizado en estos mismos ensayos para eliminar posibles interferencias del mayor número de copias del vector pACYC en los resultados.

Para realizar la complementación de la cepa mutante para *gluQ-rs* con este gen, se utilizó el vector de expresión inducible por arabinosa, **pBAD24**, que contiene resistencia a ampicilina.

3. Reactivos.

Las enzimas de restricción utilizadas en el proceso de clonamiento, fueron obtenidas de Fermentas®. Para los experimentos de PCR se utilizó la enzima GoTaq polimerasa, buffer GoTaq y MgCl₂ de Promega®, dNTPs de Fermentas® y partidores obtenidos de IDT. Como marcador de tamaño se utilizó GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, que contiene tamaños de 250 pb a 10.000 pb. Se utilizó enzimas T4 ligasa de Fermentas® y de New England Biolabs. Para la amplificación del gen *virF* y su promotor y del fragmento de este gen que codifica para el carboxilo terminal de la proteína VirF se utilizó la enzima Expand High Fidelity de Fermentas®.

Todos los antibióticos utilizados fueron de USBiological® y se usaron siempre en la siguiente concentración final: ampicilina 100 µg/ml, kanamicina 50 µg/ml y cloranfenicol 10 µg/ml. De Winkler se utilizó persulfato de amonio, azul de Coomassie, cloroformo y SDS. Los siguientes reactivos se obtuvieron de Merck: etanol, metanol, isopropanol, TEMED, Tween-20, IPTG y lisozima. Se utilizó BSA de CALBIOCHEM, β-mercaptoetanol de PROMEGA, Mix acrilamida 30% y solución de Bradford de Bio-Rad.

MÉTODOS

1. Métodos Generales

1.1. Purificación de DNA plasmidial.

Se cultivó 15 ml de bacterias con el plásmido de interés durante la noche a 37 °C con agitación y se realizó la purificación de DNA plasmidial con el kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen® según lo indica el proveedor.

1.2. Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa.

Se separó los fragmentos de interés mediante electroforesis en geles de agarosa (1-1,5%). Luego de teñir con bromuro de etidio los fragmentos se identificaron por tamaño, se cortaron y se purificaron según las instrucciones del proveedor con el kit MinElute Gel Extraction de Qiagen®.

1.3. Ligación de fragmentos de DNA en vectores.

El inserto y el vector fueron incubados en relación de 5:1 con T4 ligasa (Fermentas®) y su vector a 4 °C toda la noche. Se utilizó 50 pmoles de vector. Se transformaron bacterias DH5 α con el producto de ligación y se incubaron en placas Luria-Bertani (LB)-agar, durante la noche.

1.4. Reacción de polimerasa en cadena (PCR).

Se realizó PCR utilizando 2-4 ng de DNA o colonias resuspendidas en agua, se utilizó los partidores a concentración final de 10mM, dNTPs 10 mM, MgCl₂ 10 mM y 1,25 U de Taq polimerasa Go-Taq flexi (Promega®) para 25 μ L de reacción. Todos los partidores utilizados en esta Tesis fueron diseñados en base a la secuencia de DNA publicada en las bases de datos (NCBI o GenomeNet) y el software Vector NTI V10.3 disponible de Invitrogen.

1.5. Preparación de células quimiocompetentes.

Se inoculó 100 ml de medio LB (Tryptona al 1%, NaCl al 1%, extracto de levadura al 0,5%) a partir de un cultivo de bacterias crecidas durante la noche a 37°C. Se dejó crecer con agitación en una estufa a 37°C hasta una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de aproximadamente 0,3. Posteriormente se incubó 30 min en hielo para detener su crecimiento. Las bacterias se colectaron mediante centrifugación a 3000 rpm por 15 minutos a 4°C. Las células bacterianas fueron lavadas con 100 ml de solución de Inoue (10 mM HEPES, 15 mM $CaCl_2$, 55 mM $MnCl_2$, 250 mM KCl, pH 6,7) y se mantuvieron en hielo por 10 min para volver a centrifugar. Se realizó un segundo lavado con 1 ml de solución de Inoue, se incubó por 10 min en hielo, se agregó 1,87 ml de DMSO y se guardaron en alícuotas de 200-300 μ l a -80°C.

1.6. Transformación de *E. coli*.

La transformación de las células quimiocompetentes se realizó incubando 200 μ l de células con 2-5 μ l de DNA por 30-60 minutos en hielo, para luego incubar por 45 s en baño a 42 °C y posteriormente en hielo por 2 min. Se realizó recuperación en 900 μ l de medio LB a 37 °C y se sembraron en placas de agar LB con el antibiótico correspondiente.

1.7. Lisis de bacterias.

Para la lisis de bacterias en los experimentos destinados a análisis de proteínas se cultivó 50 ml de células, se centrifugaron a 6000 rpm por 10 min, se suspendieron en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 2 mM, Tritón X-100 0,1% v/v, β -mercaptoetanol 20 mM, glicerol 10%, “cocktail” de inhibidor de proteasa, lisozima 200 μ g/ μ l) y posteriormente fueron sonicadas con 5 pulsos de 30 segundos. Después de sonicadas fueron centrifugadas

recuperando el sobrenadante, que se filtró y utilizó para separar proteínas en geles de acrilamida.

1.8. Cuantificación de proteínas.

La concentración de proteínas en el extracto proteico obtenido luego de la lisis se sometió a cuantificación según método de Bradford modificado. Se construyó curva de calibración en base a diluciones de un stock de BSA de concentración conocida ($1\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Para ello, $5\mu\text{l}$ de la muestra a analizar se mezclaron con 1 ml de solución de Bradford y se midió absorbancia a 595 nm. La concentración se calculó a partir de la ecuación obtenida de la línea de tendencia de la curva de calibración.

1.9. Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Se utilizó geles de poliacrilamida (12%) para separar proteínas obtenidas luego de la lisis de bacterias. La electroforesis se realizó a 170 Volts por 45 min y se tiñó el gel con azul de Coomassie para la visualización de las bandas proteicas.

1.10. Sobreexpresión de proteína utilizando sistema de autinducción.

Se utilizó el kit de Novagen® Overnight Express Autoinduction system para lograr la expresión de grandes cantidades de proteína VirF en células BL21. Este sistema se basa en el principio de represión por metabolito, en el que estando presente glucosa y lactosa en el medio la bacteria utilizará primero las fuentes de carbono distintas de lactosa. Este kit contiene una mezcla de fuentes de carbono que mantiene un crecimiento regulado sin inducción hasta una alta concentración de bacterias, y posteriormente una inducción a alto nivel inducido por

lactosa. Se preparó el medio de cultivo como lo indica el proveedor y se inoculó a partir de una colonia crecida en placa de agar LB. Se cultivó por 16 h con agitación a 37 °C.

2. Clonamientos

2.1. Clonamiento en pET15b y pET20b.

Los clonamientos se realizaron mediante la técnica descrita por Sambrook y colaboradores (1989). Se amplificó mediante PCR de DNA total de la cepa de *S. flexneri* 2457T la región codificante del gen *virF*. Se utilizó los partidores H6VFF y H6VFR para clonar en pET15b o H6VFF y VFH6R (Tabla 2, Figura 4) para clonar en pET20b. Posteriormente el amplicón de 795 pb fue clonado en el plásmido pTZ57R/T. El clonamiento fue confirmado mediante secuenciación. En paralelo se realizó digestión de los vectores de expresión con las enzimas de restricción correspondientes (pET15b: *NdeI* y *BamHI*, y pET20b: *NdeI* y *XhoI*). Por otro lado, el vector recombinante que contenía al gen *virF* clonado en el vector pTZ57R/T cuya secuencia fue confirmada, también fue digerido con las enzimas correspondientes.

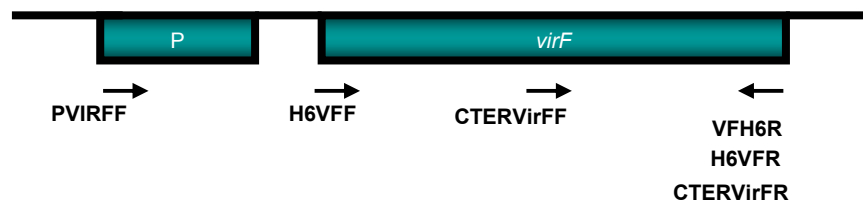


Figura 4. Esquema que muestra la posición de los partidores utilizados en el clonamiento de *virF*. P, representa la región promotora de *virF*. No a escala.

2.2. Clonamiento en pGEX-2T.

Se amplificó el fragmento de *virF* que codifica desde el aminoácido Ser₁₄₆ hasta el aminoácido Phe₂₆₉ correspondiente al carboxilo terminal de la proteína, por PCR, utilizando los partidores CTERVirFF y CTERVirFR (Tabla 2, Figura 4). El fragmento obtenido de 400 pb fue aislado y posteriormente clonado en el vector pGEX-2T entre los sitios *Bam*HI y *Eco*RI, adyacente al gen de GST, originando el vector recombinante pGST-CTVirF.

2.3. Clonamiento en pACYCDuet.

Se clonó el gen *virF* en el vector pACYCDuet (Novagen®) bajo el control de su promotor pero fusionado a la región que codifica al péptido “S-tag” (McCormick y Mierendorf, Novagen). El S-tag consiste en un péptido de 15 aminoácidos derivado de RNasa A, que permite su detección mediante anticuerpos anti-S tag en ensayos de “Western blot”. Asimismo es posible detectar la proteína utilizando la interacción de este péptido con la enzima ribonucleasa S. Ni la secuencia S-Tag ni la proteína ribonucleasa por sí solas tienen actividad enzimática, por lo que la medición de actividad ribonucleasa luego de agregar proteína S purificada provee una estimación directa de la concentración de la proteína fusionada a S-Tag.

Para realizar el clonamiento se amplificó la región promotora y el gen *virF* a partir de DNA total de *S. flexneri* 2457T utilizando los partidores PVIRFF y VFH6R (Tabla 2, Figura 4). El producto amplificado se clonó en pACYCDuet entre los sitios *Nde*I y *Xho*I y se confirmó mediante secuenciación, dando origen al plásmido pACYC*virF*-S.

2.4. Clonamiento en pWKS30.

Utilizando como base el plásmido recombinante pACYC*virF*-S se amplificó *virF* con su promotor fusionado a S-tag y el gen que codifica para resistencia a cloranfenicol utilizando los partidores PromVFFBamHI y PromVFRBamHI (Tabla 2). Esto originó un fragmento de 2.550 pb que fue clonado en un vector de fácil clonamiento, pTZ57R/T (Fermetas®). Se comprobó su secuencia y se digirió la construcción con la enzima *Bam*HI para liberar el inserto. El vector pWKS30 fue digerido con la enzima *Bg*III que deja extremos cohesivos compatibles con la digestión con *Bam*HI. Ambos fragmentos fueron ligados, originando el plásmido pVirFStag-CM (Figura 5). Se verificó la orientación mediante digestión con las enzimas *Nde*I y *Bg*III.

2.5. Clonamiento en pBAD.

A partir del plásmido recombinante pET15b se digirió el gen *gluQ-rs* junto a la secuencia de histidinas río abajo su sitio de clonamiento. Se subclonó en el vector pBAD24 entre los sitios *Nco*I y *Hind*III y se utilizó para complementar la cepa W3110 Δ *gluQ-rs* que contiene pVirFStag-CM.

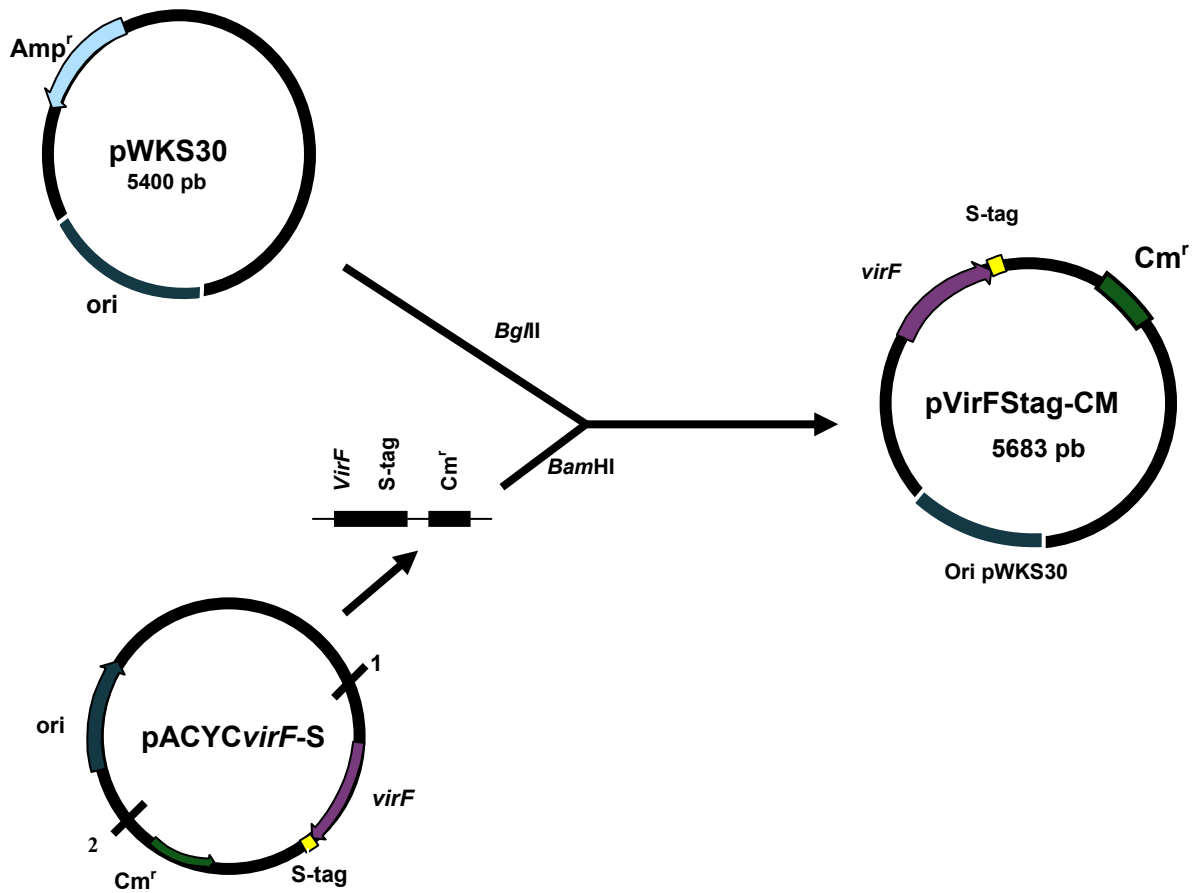


Figura 5. Construcción del plásmido recombinante pVirFStag-CM Esquema que muestra el proceso de construcción del plásmido recombinante pVirFStag-CM. Se indican las posiciones de los partidores utilizados para amplificar el gen *virF* y el gen *cat*, 1:PromVFF*Bam*HI, 2:PromVFR*Bam*HI.

3. RT-PCR

La cepa W3110 Δ *gluQ-rs* se transformó con el plásmido recombinante pVirFStag-CM y posteriormente se cultivó en medio LB hasta una DO_{600} de 0,6. Se purificó RNA total con el kit de Qiagen® como lo indica el proveedor. La concentración de RNA se determinó por absorbancia a 260 nm. Se analizó los niveles de mRNA de *virF* por RT-PCR, utilizando

partidores universales y los partidores específicos para el gen *virF*, VirFF, VirFR y NTVirFR (Tabla 2). La pareja VirFF y VirFR amplifica casi toda la región codificante, obteniéndose un tamaño de 618 pb y la pareja VirFF y NTVirFR amplifica la región ubicada hacia el extremo 5' de la región codificante, obteniéndose un tamaño de 218 pb. Se utilizó los respectivos controles positivos (DNA genómico para amplificación del gen y RNA ribosomal 16s, partidores 16SF y 16SR, como control de carga) y negativos (PCR sin obtención de cDNA por transcriptasa reversa y agua). Tanto el RNA purificado como el producto de PCR obtenido se analizaron en geles de agarosa horizontales teñidos con bromuro de etidio y se visualizó en un transiluminador UV. Como control se transformó la cepa silvestre de *E. coli* W3110 y se realizó la misma reacción descrita. La cepa mutante se complementó con el gen *gluQ-rs* de *S. flexneri* (pSF*gluQ-rs*) y se realizó los mismos ensayos.

Como control se realizó el mismo tipo de experimento utilizando la cepa de *E. coli* JE7350 con ausencia del gen *tgt* (Noguchi y cols., 1982).

4. Obtención de Anticuerpos Anti-VirF

La cepa de *E. coli* BL21(DE3) fue transformada con los vectores pET15b y pET20b ambos conteniendo el gen *virF*. Se cultivó las bacterias hasta una D.O. de 0,5 y se indujo la expresión de la proteína agregando diferentes concentraciones de IPTG (0,5-1,0 mM). Utilizando la construcción pGST-CTVirF se sobreexpresó el péptido correspondiente al carboxilo terminal de VirF, denominado CTERVIRF. Luego de la adición de IPTG las bacterias fueron cultivadas por 3 h y lisadas según se indicó en 1.7. Para la purificación del péptido se utilizó cromatografía de afinidad con glutatión. El péptido purificado fue enviado para producción de anticuerpos al laboratorio del Dr. A. Oñate en la Universidad de Concepción.

5. Ensayos de “Western blotting”

Utilizando los vectores recombinantes pACYC*virF*-S y pVirFStag-CM, se transformó las cepas de *E. coli* mutantes en *gluQ-rs*, *tgt* y la cepa silvestre y se obtuvieron proteínas totales, la que fueron separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y se realizó la transferencia a 170 Volts por 1 h a una membrana de nitrocelulosa. Se realizó el ensayo de “Western blot” como se describió en Salazar, 2001, utilizando los anticuerpos anti S-tag. El revelado se realizó utilizando el kit CN/DAB substrate kit que utiliza detección cromogénica de la peroxidasa de rábano, utilizando 0,125 ml de solución por cm² de membrana.

Tabla 2. Lista de partidores utilizados.

NOMBRE	SECUENCIA 5' 3'	REFERENCIA
PVIRFF	CATATGGATTTGTGGAGCCTCCAG	Este trabajo
TVIRFR	CTCGAGTTAAAATTTTTATGATA	Este trabajo
VirFF	AGCTCAGGCAATGAACTTTGAC	Vidal y cols., 2005
VirFR	TGGGCTTGATATTCCGATAAGTC	Vidal y cols., 2005
16SF	CCTACGGGAGGCAGCAG	Yu y Morrison, 2004
16SR	CCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT	Yu y Morrison, 2004
H6VFF	CATATGATGGATATGGGACATAAAA	Este trabajo
H6VFR	GGATCCTTAAAATTTTTATGATATA	Este trabajo
VFH6R	CTCGAGAAATTTTTATGATATAAGT	Este trabajo
NTvirFR	ACCCCTTTTCTCCTCAGAATAG	Este trabajo
PromVFFBamHI	GATTTGTGGAGCCTCCAG	Este Trabajo
PromVFRBamHI	TAGCGCTGATGTCCGG	Este trabajo
CTERFVirFF	AGTGGATCCGCTGTTTCTGATGAGT	Este trabajo
CTERVirFR	CCATGAATTCTTAAAATTTTTATGA	Este trabajo
pBADF	CTGTTTCTCCATACCCGTT	Este trabajo
pBADR	CTCATCCGCCAAAACAG	Este trabajo

VI. RESULTADOS

1. Analizar la expresión de *virF* en *E. coli* Δ *gluQ-rs* a nivel de la transcripción.

E. coli W3110 no posee el gen *virF*, por lo que para cumplir con este objetivo se requiere de la incorporación de este gen en la cepa bacteriana. Para ello se amplificó la región del DNA plasmidial que contenía el gen *virF* con su promotor mediante PCR utilizando DNA total obtenido de *S. flexneri* 2457T (Figura 6A). El producto de 1.150 pb fue clonado en el vector pTZ57R/T que permite clonar productos de PCR. Células de *E. coli* DH5 α fueron transformadas y seleccionadas en presencia de ampicilina. Una vez que se aisló las colonias, se confirmó la presencia del inserto mediante PCR de colonias, se purificó el DNA plasmidial, el cual fue digerido con la enzima *Bam*HI para confirmar la presencia del inserto al observar una banda del tamaño esperado, aproximadamente 4 kpb correspondiente al tamaño del vector más el inserto. La integridad de la secuencia nucleotídica fue confirmada mediante secuenciación del DNA. A partir del clon correcto, el inserto fue liberado mediante digestión del DNA plasmidial con las enzimas *Nde*I y *Xho*I para clonarlo en un vector de mediano número de copias, pACYCDuet (Held, D. y cols., 2003) (Figura 6B) digerido con las mismas enzimas de restricción, obteniéndose el plásmido recombinante pACYC*virF-S*.

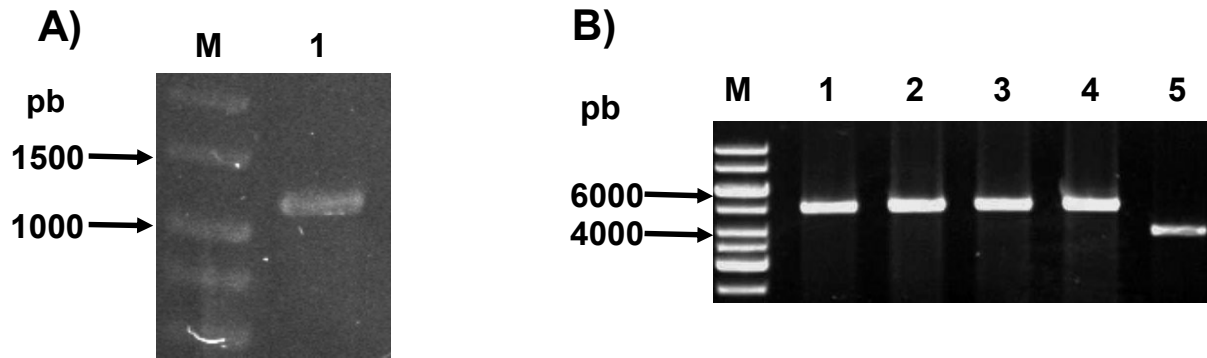


Figura 6. Clonamiento de *virF* con su promotor en el vector pACYC Duet. A) Electroforesis en gel de agarosa, carril 1: producto de PCR de 1.150 pb al amplificar con los partidores PVirFF y VFH6R. B) Se purificó DNA plasmidial de 4 clones (carriles 1-4), se digirió con *NdeI* y se sometió a electroforesis en gel de agarosa, se observa tamaño esperado de 5.093 pb. Carril 5: vector vacío. M: marcador de tamaño molecular (se indican los tamaños de los fragmentos en pares de bases).

Utilizando este plásmido recombinante se transformó las cepas de *E. coli* W3110 y $\Delta gluQ-rs$ y se realizaron los experimentos para la detección de RNA y proteína, sin lograr distinguir diferencias entre la cepa silvestre y mutante (resultado no mostrado). Es posible que el efecto observado fuera debido al número de copias del plásmido utilizado, por ello se procedió a utilizar un plásmido de bajo número de copias como pWKS30 (Wang y col, 1991). Se amplificó el promotor, *virF* fusionado a S-tag y el gen que codifica para resistencia a cloranfenicol a partir de la construcción pACYC*virF*-S. Esto originó un fragmento de 2550 pb que fue clonado en el vector pTZ57R/T. Nuevamente se confirmó la integridad de la secuencia y se digirió con la enzima *Bam*HI para liberar el inserto. Por otro lado, el vector pWKS30 fue digerido con la enzima *Bgl*III, liberándose dos fragmentos, aquel que contenía al origen de replicación (3.140 pb) fue purificado. Ambos fragmentos fueron ligados, originando el plásmido pVirFStag-CM. Como la ligación no fue direccional, se verificó la orientación del inserto de 2.550 pb mediante digestión con las enzimas *Nde*I y *Bgl*III. El sitio *Nde*I pertenece al vector y por lo tanto esta dentro de los 3.140 pb, mientras que *Bgl*III se encuentra en el gen *virF*.

Se procedió a transformar *E. coli* W3110 y $\Delta gl u Q-rs$ con el plásmido recombinante y se analizó la expresión del gen *virF* mediante RT-PCR. En experimentos realizados en el laboratorio utilizando *S. flexneri* no se detectó el mRNA de *virF* en la cepa mutante para *gluQ-rs* al utilizar la pareja *virFF/virFR* en las RT-PCR, pero si fue detectado cuando se utilizaron los partidores *virFF/NTvirF*. Considerando este hecho, en los experimentos realizados en esta Tesis, se utilizó las dos parejas de partidores, una pareja que involucra a prácticamente toda la región codificante y otro par que alinea hacia el extremo 5' de la región codificante (Figura 7A). Se detectó la presencia de mRNA de *virF* en *E. coli* W3110 y $\Delta gl u Q-rs$ transformada con pVirFStag-CM cuando se utilizaron los partidores *virFF* y *virFR*, pero no se detectó en la cepa $\Delta t g t$. Sin embargo, siempre se detectó mRNA cuando se utilizó los partidores *virFF* y *NTvirFR*. Estos resultados sugieren que el promotor de *virF* clonado es funcional en *E. coli* y se detecta el mRNA del gen *virF* (Figura 7B).

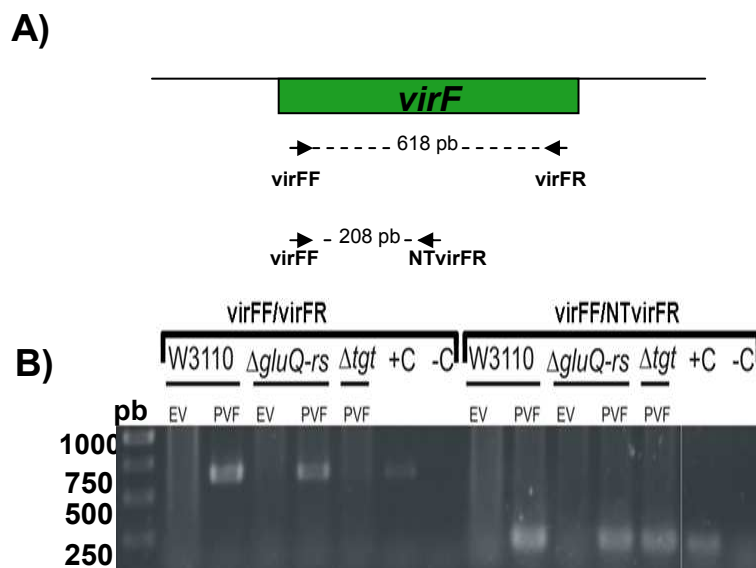


Figura 7. Análisis transcripcional de *virF* en las cepas de *E. coli* W3110, $\Delta gl u Q-rs$ y $\Delta t g t$. **A)** Esquema que muestra la posición de los partidores utilizados y el tamaño esperado para los amplicones. **B)** Electroforesis en geles de agarosa para verificar la amplificación del cDNA, EV: sin vector, PVF: pVirFStag-CM, +C: Control positivo de DNA genómico, -C: control negativo sin cDNA. Se indican algunos tamaños moleculares del marcador 1 kb.

Posteriormente se realizó complementación de la mutante con el gen *gluQ-rs* clonado en el vector pBAD24. A pesar de tener orígenes de replicación compatibles, la transformación de la cepa con ambos vectores fue muy complicada y luego de varios intentos se logró obtener colonias con resistencia a cloranfenicol y ampicilina. Se aisló un clon y se estudió en primera instancia mediante PCR de colonia la presencia de la construcción pSF*GluQ-rs*, con los partidores clgQrsF y clgQrsR que amplifican el gen *gluQ-rs* y con los partidores pBADF y pBADR que son externos al gen *gluQ-rs* clonado en pBAD24. Se obtuvo un producto de PCR del tamaño esperado en ambos casos (Figura 8). Se utilizó esta cepa en los experimentos de RT-PCR y más adelante, “Western blot”.

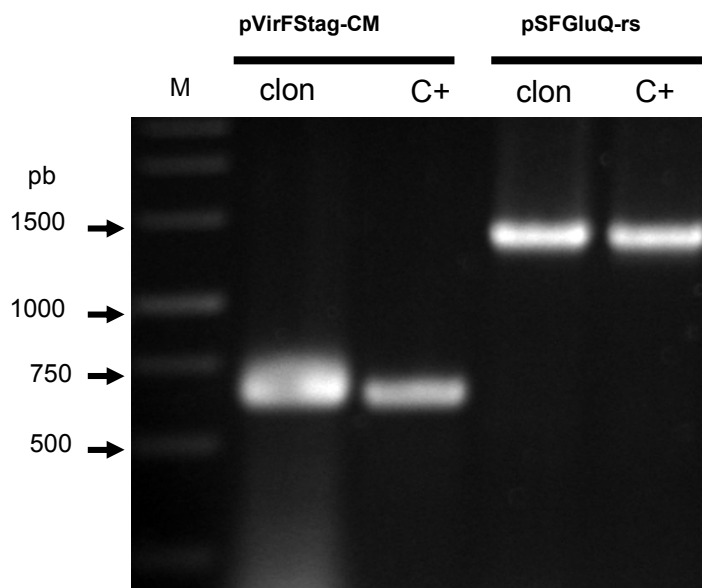


Figura 8. Análisis de la cepa complementada obtenida. Electroforesis en gel de agarosa que muestra los amplicones obtenidos de la PCR de colonia del clon obtenido al transformar la cepa W3110 Δ *gluQ-rs* con pVirFStag-CM y pSF*gluQ-rs*. M: Marcador de tamaño molecular.

Para establecer la presencia de ambos plásmidos, se purificó DNA plasmidial y se realizó digestión y PCR. Se realizó digestión con las enzimas *NcoI* y *HindIII* del DNA

plasmidial de la cepa complementada (Figura 9A) con el objetivo de liberar el fragmento *gluQ-rs*, no obteniéndose los resultados esperados. Por este motivo se procedió a realizar PCR del DNA plasmidial con los partidores pBADF y pBADR (Figura 9B). Con esta reacción se obtuvo una banda del tamaño esperado y otra más grande que no se había observado antes. Por otra parte se purificó los fragmentos obtenidos y se realizó una reacción de PCR anidado de ambos fragmentos con los partidores clgQrsF y clgQrsR para corroborar la presencia del gen *gluQ-rs*. Inesperadamente se observó la amplificación del gen en ambos fragmentos (Figura 9C).

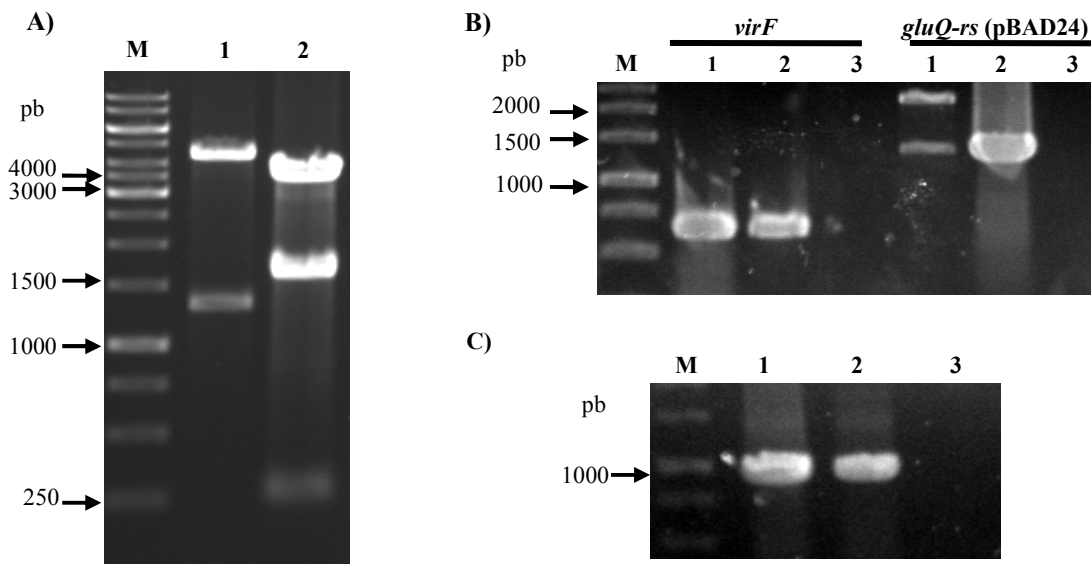


Figura 9. Análisis de la cepa W3110 Δ *gluQ-rs*/pvirFStag-CM complementada con el gen *gluQ-rs*. A) se purificó DNA plasmidial de la cepa y se digirió con las enzimas *Nco*I y *Hind*II para liberar el fragmento *gluQ-rs* clonado, lo que se observa en el control positivo (pSFGluQ-rs purificado desde DH5 α , 1), pero no en el DNA plasmidial purificado de la cepa complementada (2). B) Se realizó PCR del DNA plasmidial (1) y del control positivo (2, pSFGluQ-rs purificado desde DH5 α) para detectar *virF* y *gluQ-rs* clonado en pBAD. Se utilizaron partidores internos en el caso de *virF* y externos en el caso de *gluQ-rs*. Se detecta la presencia de *virF* (1), pero además de observarse la banda del tamaño para *gluQ-rs* (1400 pb) también se observa una banda cercana a los 2500 pb. C) Se purificaron los fragmentos de 1400 y 2500 pb amplificados a partir del DNA plasmidial de la cepa complementada en B) y se realizó PCR con partidores internos para *gluQ-rs*. Se muestra el tamaño esperado de aproximadamente 950 pb. M: Marcador de tamaño molecular.

Se realizó RT-PCR para la detección de mRNA incluyendo la cepa mutante complementada con el gen *gluQ-rs* (Figura 10). En esta ocasión se utilizó los partidores *virFF* y *virFR*. Se detectó mRNA en las cepas transformadas con la construcción pVirFStag-CM, observándose un leve aumento de la cantidad de mRNA en la cepa complementada.

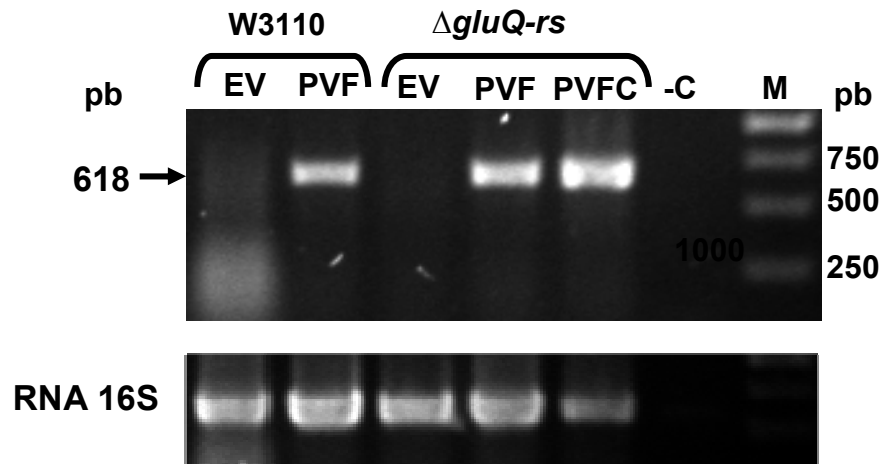


Figura 10. Análisis transcripcional de *virF* en las cepas W3110 silvestre y Δ *gluQ-rs*. Electroforesis en gel de agarosa que muestra amplificación de cDNA con los partidores *virFF* y *virFR* en cepas silvestre y Δ *gluQ-rs* y sin vector (EV), transformadas con la construcción pVirFStag-CM (PVF) y cepa mutante complementada (PVFC). Se amplificó gen 16S y se utilizó como control de carga. M: Marcador de tamaño molecular.

2. Analizar la expresión de *virF* en *E. coli* con la delección de *gluQ-rs* a nivel de la traducción.

2.1. Obtención de anticuerpos anti-VirF.

En una primera instancia, se clonó el gen *virF* en los plásmidos de expresión pET15b y pET20b según la técnica descrita. El plásmido recombinante fue purificado a partir de la cepa de *E. coli* DH5 α y digerido con *Bam*HI para pET15b-H₆*virF* o *Xho*I para pET20b-*virFH*₆. Luego se sometió a electroforesis en gel de agarosa (Figura 11). Cada clon recombinante fue confirmado mediante secuenciación.

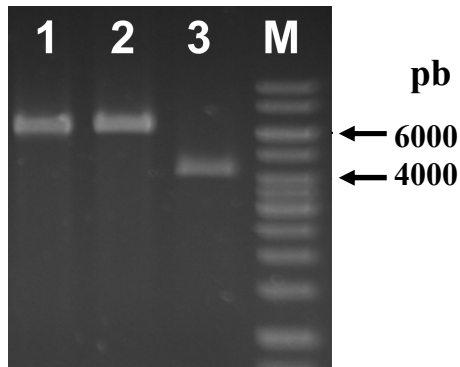


Figura 11. Obtención de los plásmidos recombinantes pET15b-H₆virF y pET20b-virFH₆. Líneas 1 y 2, *virF* clonado en pET15b. Línea 3, *virF* clonado en pET20b. M= Marcador de tamaño molecular, se indica los tamaños de 6 kpb y 4 kpb.

Luego se transformó *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido recombinante pET20b-*virFH*₆ y se indujo la expresión del gen con IPTG 1mM. Se analizó un extracto de proteínas totales mediante electroforesis en gel de poliacrilamida sin distinguir banda del tamaño esperado para la proteína VirF. Se repitió la inducción con distintas concentraciones de IPTG en el medio (0,3-1,0 mM) y se cultivó las bacterias en cantidades crecientes desde 1 ml hasta 50 ml, sin lograr resultados. Se decidió utilizar un sistema de autoinducción de Novagen® (Overnight ExpressTM), que permite expresión de altos niveles de proteína con vectores inducibles como pET. No se logró observar sobreexpresión de una proteína del tamaño esperado para VirF (30 kDa) en ninguna de las condiciones descritas (Datos no mostrados).

Puesto que el clonamiento en el vector pET permite obtener la proteína VirF con una cola de histidinas, se intentó su purificación mediante cromatografía de afinidad en una columna de níquel, también sin resultados. Por consiguiente, y teniendo como antecedente lo comunicado por Durand y cols., (2003), quienes utilizaron en sus estudios anticuerpos

dirigidos al carboxilo terminal de VirF. Se decidió amplificar por PCR la región del gen *virF* que codifica para el carboxilo terminal entre los aminoácidos Ser₁₄₆-Phe₂₆₉ y se clonó en el vector pGEX-2T para obtener una proteína de fusión entre el péptido GST y CTVirF.

Se indujo la expresión del gen de fusión y se purificó del péptido GST-CTVirF a partir de células BL21(DE3) mediante cromatografía de afinidad. Posteriormente se digirió con trombina y se obtuvo el péptido de 14 kDa correspondiente al carboxilo terminal VirF (Figura 12). La muestra fue transferida a una membrana de nitrocelulosa para la obtención de anticuerpos, que fueron preparados en colaboración con el Dr. Ángel Oñate de la Universidad de Concepción. Estos anticuerpos fueron utilizados para detectar la proteína en las cepas transformadas con los plásmidos recombinantes sin resultados positivos.

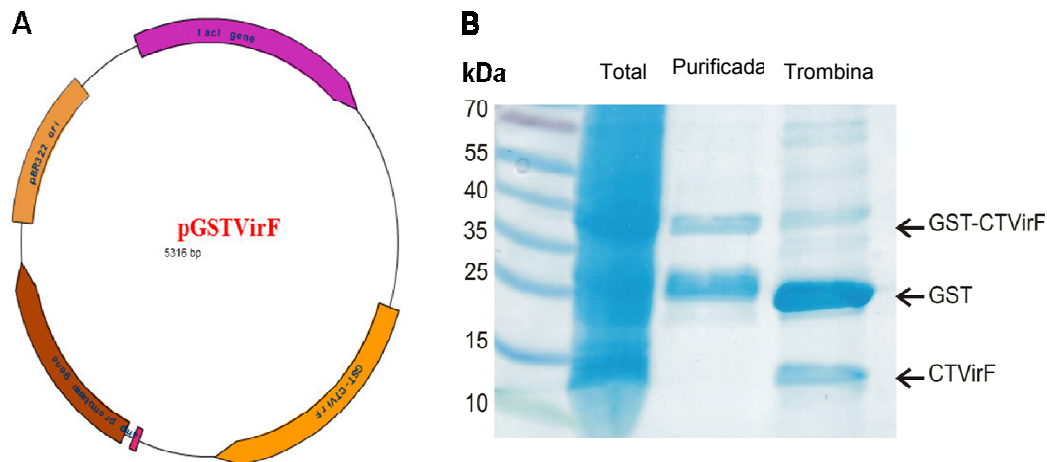


Figura 12. Clonamiento y purificación del fragmento Ser146-Phe269 de VirF. A) esquema del plásmido recombinante obtenido. B) Electroforesis en geles de poliacrilamida de algunas de las etapas de la purificación del péptido. Total: Extracto total de BL21(DE3)/pGSTVirF. Purificada: proteína de fusión purificada. Trombina: digestión con trombina. Se indican los pesos moleculares en kDa del marcador. Con la flechas se indican la proteína de fusión GST-CTVirF, GST y CTVirF.

2.2. Análisis de la proteína VirF.

Como estrategia alternativa se utilizó la proteína fusión VirF-Stag obtenida a partir del plásmido recombinante pVirFStag-CM para realizar ensayos de “Western Blot” con anticuerpos dirigidos contra el péptido S-tag. Se utilizó 10-40 μg de proteína total extraído de cada cepa para detectar la proteína. Se observó reacción con una proteína de tamaño esperado (33 kDa) en las cepas silvestre y $\Delta\text{gluQ-rs}$ transformadas con el plásmido recombinante, pero no en las cepas sin el vector (Figura 13). En ensayos de western blot utilizando cantidades menores de proteína (10 μg) se observó una leve disminución de la intensidad de la banda en la cepa mutante para *gluQ-rs* (no mostrado). En la cepa complementada con el gen *gluQ-rs* se observa una reacción más intensa, que estaría relacionada con el aumento en los niveles de mRNA de *virF*.

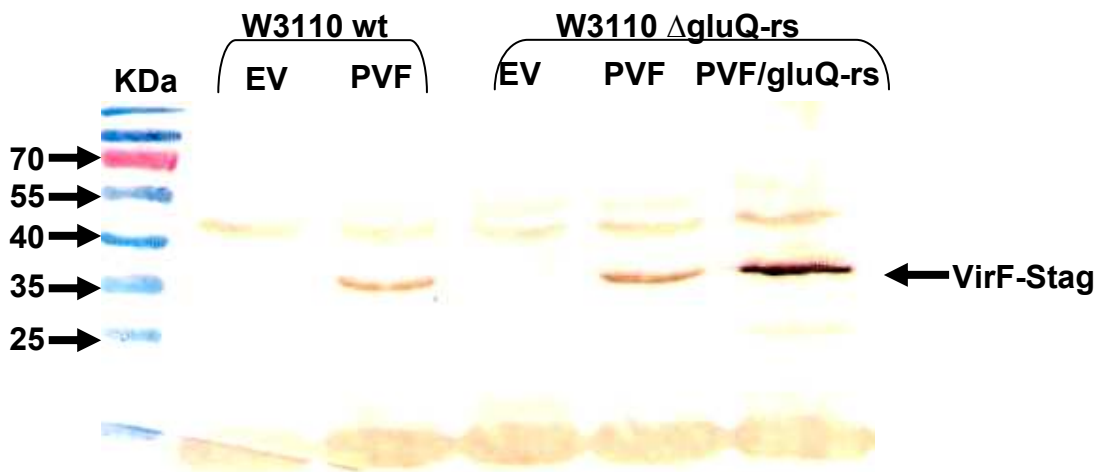


Figura 13. Inmunodetección del péptido VirF. Extracto de proteínas de las cepas W3110 y $\Delta\text{gluQ-rs}$ sin plásmido (EV) y transformadas con el plásmido pVirFStag-CM (PVF) fueron separadas mediante SDS-PAGE y transferidas a nitrocelulosa. Se realizó el ensayo de “Western blot” con anticuerpos anti-Stag.

Adicionalmente, durante el desarrollo de la Tesis se observó constantemente que al cultivar las bacterias hasta la fase exponencial la cepa silvestre transformada con pVirFStag-CM presentaba un crecimiento más lento, por lo que se decidió realizar una curva de crecimiento (Figura 14). Se observa que ambas cepas mutantes y la cepa silvestre sin transformar con pVirFStag-CM presentan un patrón de crecimiento similar, pero W3110-pVirFStag-CM tarda 1,5 veces más en alcanzar su fase exponencial.

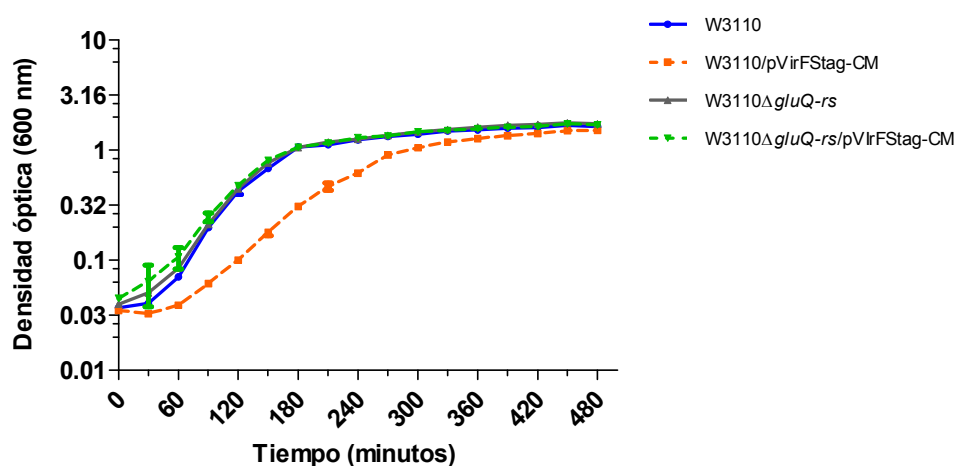


Figura 14. Curva de crecimiento para W3110 silvestre y mutante para *gluQ-rs*. W3110: cepa silvestre sin vector. W3110/pVirFStag-CM: cepa silvestre conteniendo la construcción pVirFStag-CM. W3110 Δ *gluQ-rs*: cepa mutante para el gen *gluQ-rs* sin el vector. W3110 Δ *gluQ-rs*/pVirFStag-CM: cepa mutante para el gen *gluQ-rs* que contiene el plásmido pVirFStag-CM. El gráfico representa el promedio de un experimento en triplicado. Se muestran los valores de densidad óptica en escala logarítmica.

VII. DISCUSIÓN

De los resultados observados en los ensayos de RT-PCR se puede concluir que el promotor de *virF* clonado es funcional en *E. coli*, detectándose el mRNA del gen *virF* en las cepas transformadas. En estudios de Durand y Bjork (1994, 2003) se analizó la presencia de RNA de *virF* mediante “Northern Dot-blot” en mutantes *tgt* de *Shigella* que carecen de la modificación Q. En esta Tesis se utilizó la técnica de RT-PCR, que es más sensible y requiere de menores cantidades de RNA. No se observó diferencias en los niveles de mRNA entre las cepas silvestre y mutante para *gluQ-rs*, lo que concuerda con lo esperado y lo observado en por Durand y Bjork. Asimismo la reacción obtenida en el “Western blot” con anticuerpo anti S-Tag demuestra síntesis de VirF en las cepas transformadas, sin diferencias evidentes entre ambas cepas. Sin embargo al utilizar bajas concentraciones de proteína total (10 µg/µl) en los ensayos de “Western blot” se observó una pequeña disminución en la cepa mutante para *gluQ-rs* al realizar un análisis con el software IMAGE J. Esto estaría en concordancia con lo esperado pues al haber menos Glu-Q la traducción sería menos eficiente, lo que resultaría en menor cantidad de proteína. La diferencia puede no ser tan notoria como en mutantes *tgt*, pues aún está presente Q. Los experimentos de “Western blot” fueron realizados con anticuerpos dirigidos al péptido S-Tag fusionado a VirF debido a que no se logró la sobreexpresión y purificación de la proteína VirF, esta experiencia fue corroborada por el Dr. Jiro Mitobe, quien trabaja con *Shigella*, y también tuvo estas dificultades en el proceso de purificación de la proteína (comunicación personal). Si bien en *Shigella* la mutación *gluQ-rs* no provoca diferencias en el crecimiento celular al cultivar en medios mínimos y nutritivos (Salazar y cols., 2004) como lo observado en *E. coli tgt-* por Janel y cols., (1984) y Noguchi y cols., (1982), sí se observó una marcada disminución en la virulencia de *Shigella* al crecer en medio mínimo (Durand y cols., 2000), por lo que sería interesante complementar los trabajos hechos

en esta Tesis con análisis utilizando medio mínimo, eventualmente podría observarse una disminución de la expresión de *virF* en estas condiciones.

En la cepa complementada con el gen *gluQ-rs* se observa una reacción más intensa en la banda correspondiente a VirF-Stag, lo cual es interesante pues sugiere que la presencia de GluQ-RS favorece la síntesis de VirF. Esto probablemente es exacerbado debido a que *gluQ-rs* fue clonado en un vector de mediano número de copias (aprox. 20 por célula) por lo que la enzima GluQ-RS está más representada en la cepa complementada que en la cepa silvestre que posee sólo una copia del gen en su cromosoma, haciendo la presencia de la modificación Glu-Q más eficiente la traducción de la proteína VirF. Hubo grandes dificultades en la obtención de esta cepa, a pesar de tener orígenes de replicación compatibles, probablemente la carga metabólica que significa la mantención de 2 plásmidos en la bacteria provoca la eliminación precoz de uno de los vectores o simplemente no incorporación del segundo. Los últimos resultados obtenidos en el análisis de la cepa complementada muestran la aparición de un nuevo amplicón de aproximadamente 2500 pb al realizar la PCR con los partidores pBADF y pBADR que alinean al exterior del gen *gluQ-rs* clonado en pBAD24 (figura 9b), no observado en los primeros experimentos. Esto podría ser explicado por un evento de recombinación entre los plásmidos recombinantes pSF*gluQ-rs* o entre pVirFStag-CM y pSFGluQ-rs, obteniéndose un producto de PCR de mayor tamaño.

Un resultado adicional y no esperado se obtuvo al evaluar el crecimiento de la cepa W3110 silvestre transformada con pVirFStag-CM, ya que se observó un retardo en el crecimiento de esta cepa. Al realizar la curva de crecimiento y calcular la razón específica de crecimiento (μ) para cada cepa, se obtiene un μ de $0,025 \text{ min}^{-1}$ para *E. coli* W3110 silvestre y Δ *gluQ-rs*, un valor de $0,022 \text{ min}^{-1}$ para la cepa Δ *gluQ-rs* con la construcción pVirFStag-Cm y de $0,016 \text{ min}^{-1}$ para la cepa W3110 transformada con este plásmido recombinante. Por otro

lado, el tiempo de duplicación de la cepa W3110 silvestre es de 27 min mientras que el tiempo de duplicación de la misma cepa transformada con el plásmido recombinante fue de 43 min. Quizás este se hecho se relacione con los intentos al sobreexpresar el gen de la cepa de *E. coli* BL21(DE3) utilizando las diferentes condiciones en esta Tesis ya que no fue posible inducir el gen. Como futura proyección resultaría interesante utilizar VirF con mutación en su sitio de unión a DNA o bien proteína trunca y observar si desaparece el efecto observado. Si se determina que la presencia de *virF* afecta el crecimiento de *E. coli*, una posibilidad es estudiar genes posiblemente afectados mediante micro array, por ejemplo.

VIII. CONCLUSIONES

1. El promotor de *virF* es funcional en la cepa de *E. coli* W3110 silvestre y Δ *gluQ-rs* y *E. coli* JE7350. Por lo tanto es reconocido por la maquinaria celular de *E. coli* y transcrito a un mRNA.
2. En el análisis del mRNA de *virF* no se observan diferencias en los niveles del transcrito cuando se comparan las cepas silvestre y mutante para *gluQ-rs* en las condiciones estudiadas.
3. La síntesis de la proteína VirF no se ve afectada por la ausencia de la modificación Glu-Q del tRNA^{Asp} en la cepa mutante para *gluQ-rs* en las condiciones estudiadas.
4. La presencia de VirF en la cepa de *E. coli* W3110 altera su crecimiento, con un tiempo de duplicación de ésta casi 2 veces mayor.

IX. REFERENCIAS

1. Ahn, K.; Ha, U.; Jia, J.; Wu, D. and Jin, S. "The *truA* gene of *Pseudomonas aeruginosa* is required for the expression of type III secretory genes". *Microbiol.* 150:539-547, 2004.
2. Atlung, T. and Ingmer, H. "H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression". *Mol Microbiol.* 24:7-17, 1997.
3. Beloin, C.; McKenna, S. and Dorman, C. "Molecular dissection of VirB, a key regulator of the virulence cascade of *Shigella flexneri*". *J Biol Chem.* 277:15333-15344, 2002.
4. Beloin, C. and Dorman, C. "An extended role for the nucleoid structuring protein H-NS in the virulence gene regulatory cascade of *Shigella flexneri*". *Mol Microbiol.* 47:825-838, 2003.
5. Bertin P.; Benhabiles N.; Krin E.; Laurent-Winter C.; Tendeng C. and Turlin E. "The structural and functional organization of H-NS proteins is evolutionarily conserved in Gram-negative bacteria". *Mol Microbiol.* 31:319-330, 1999.
6. Björk, G. "Biosynthesis and function of modified nucleosides in tRNA". En "tRNA: Structure, Biosynthesis, and Function". Söll, D., and RajBhandary, U.L. (eds). American Society for Microbiology Press, Washington, DC. p 165-205, 1995.
7. Blaise, M.; Becker H.; Keith, G.; Cambillau, C.; Lapointe, J.; Giege, R. and Kern, D.. A minimalist glutamyl-tRNA synthetase dedicated to aminoacylation of tRNA^{Asp} QUC anticodon. *Nucl Acids Res.* 32:2768-2775, 2004.
8. Boheme, K.; Iglesias, T.; Loyola, M.; Soto, L.; Rodríguez, G.; Reydet, P. e Illesca V. "Comparación de susceptibilidad de especies de *Shigella* a antimicrobianos de uso habitual en el Hospital Regional de Temuco, Chile" 1990-2001. *Rev Méd Chile.* 130:1021-1026, 2002.

9. Bracco, L.; Kotlarz, D.; Kolb, A.; Diekmann, S. and Buc, H. "Synthetic curved DNA sequences can act as transcriptional activators in *Escherichia coli*". EMBO J. 8:4289-4296, 1989.
10. Cossart, P. and Sansonetti, P. "Bacterial Invasion: The Paradigms of Enteroinvasive Pathogens". Science. 304:242-248, 2004.
11. Curran, J. "Modified nucleosides in translation". En "Modification and Editing of RNA". Grosjean, H., and Benne, B. (eds). American Society for Microbiology Press, Washington, DC, p 493-519, 1998
12. Cheng, L. and Schneewind, O. "Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods". Trends Microbiol 8:214-220, 2000.
13. Dorman, C.; Bhriain, N. and Higgins, C. "DNA supercoiling and environmental regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*". Nature. 344:789-792, 1990.
14. Dorman, C. and Porter, M. "The *Shigella* virulence gene regulatory cascade: a paradigm of bacterial gene control mechanisms". Mol Microbiol. 29:677-84, 1998.
15. Dubois, D.; Blaise, M.; Becker, H.; Campanacci, V.; Keith, G.; Giegé, R.; Cambillau, C.; Lapointe, J. and Kern, D. "An aminoacyl-tRNA synthetase-like protein encoded by the *Escherichia coli yadB* gene glutamylates specifically tRNA^{Asp}". Proc Natl Acad Sci USA. 101:7530-7535, 2004.
16. DuPont, H.; Levine, M.; Hornick, R. and Formal, S. "Inoculum size in shigellosis and implications for expected mode of transmission". J Infect Dis. 159:1126-1128, 1989.
17. Durand, J.; N. Okada, T.; Tobe, M.; Watarai, I.; Fukuda, T.; Suzuki, N.; Nakata, K.; Komatsu, M.; Yoshikawa, M. and Sasakawa, C. "*vacC*, a virulence-associated chromosomal locus of *Shigella flexneri*, is homologous to *tgt*, a gene encoding tRNA-

- guanine transglycosylase (TGT) of *Escherichia coli* K-12". J. Bacteriol. 176:4627-34, 1994.
18. Durand, J.; Dagberg, B.; Uhlin, B. and Björk, G. "Transfer RNA modification, temperature and DNA superhelicity have a common target in the regulatory network of the virulence of *Shigella flexneri*: the expression of the *virF* gene". Mol Microbiol. 35:924-935, 2000.
 19. Durand, J. and Björk, G. "Putrescine or a combination of methionine and arginine restores virulence gene expression in a tRNA modification-deficient mutant of *Shigella flexneri*: a possible role in adaptation of virulence". Mol Microbiol. 47:519-527, 2003.
 20. Falconi, M.; Colonna, B.; Prosseda, G.; Micheli, G. and Gualerzi, C. "Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor H-NS". EMBO J. 17:7033-43, 1998.
 21. Ferrecio, C.; Prado, V.; Ojeda, A.; Cayyazo, M.; Abrego, P.; Ghers, L. and Levine, M. "Epidemiologic patterns of acute diarrhea and endemic *Shigella* infections in children in a poor periurban setting in Santiago, Chile". Am J Epidemiol. 134:614-27, 1991.
 22. Galán, J. and Collmer, A. "Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells". Science. 284:1322-1328, 1999.
 23. Gray, J.; Wang, J. and Gelvin, S. "Mutation of the *miaA* gene of *Agrobacterium tumefaciens* results in reduced *vir* gene expression". J Bacteriol. 174:1086-98, 1992.
 24. Gustilo, E.; Vendeix, F. and Agris, P. "tRNA's modifications bring order to gene expression". Curr Opin Microbiol. 11:134-140, 2008.
 25. Hamilton-West, C.; Prado, V.; Hormazábal, J.; Lagos, R.; Benadof, D.; Mendoza, C.; Elgueta A.; Tapia, C.; Cifuentes, M.; Alvarez, I. and Hernandez, M. "Epidemiología

- clínica y molecular de las infecciones por *Shigella spp* en niños de la Región Metropolitana durante el verano 2004-2005”. Rev Méd Chile. 135:1388-1396, 2007.
26. Held, D.; Yaeger, K. and Novy, R. “Enhanced protein coexpression in *E. coli*”. in *Innovations* 18:4-6, 2003.
27. Henríquez, M.; Montoya, R.; Venegas, G.; Henríquez, P. and Apablaza, P. “Frecuencia y biodiversidad de algunas bacterias enteropatógenas aisladas en niños con síndrome disentérico agudo”. Rev Chil Infect. 16:283-91, 1999.
28. Hurt, J.; Olgen, S. and García, G. “Site-specific modification of *Shigella flexneri virF* mRNA by tRNA-guanine transglycosylase *in vitro*”. Nucleic Acids Res. 35:4905-4913, 2007.
29. Jänel, G.; Michelsen, U.; Nishimura, S. and Kersten, H. “Queuosine modification in tRNA and expression of the nitrate reductase in *Escherichia coli*”. EMBO J. 3:1603-8, 1984.
30. Jensen, K. “The *Escherichia coli* K-12 "Wild Types" W3110 and MG1655 Have an *rph* frameshift mutation that leads to pyrimidine starvation due to low *pyrE* expression levels”. J Bacteriol. 175:3401-3407, 1993.
31. Jin, Q.; Yuan, Z.; Xu, J.; Wang, Y.; Lu, W.; Wang, J.; Liu, H.; Yang, F.; Zhang, X.; Zhang J.; Yang, G.; Wu, H.; Qu, D.; Dong, J.; Sun, L.; Xue, Y.; Zhao, A.; Gao, Y.; Zhu, J.; Kan, B.; Ding, K.; Chen, S.; Cheng, H.; Yao, Z.; He, B.; Chen, R.; Ma, D.; Qiang, B.; Wen, Y.; Hou, Y. and Yu, J. “Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157”. Nucleic Acids Res. 30:4432-4441, 2002
32. Kotloff, K.; Winickoff, L.; Ivanoff, B.; Clemens, J.; Swerdlow, D.; Sansonetti, D.; Adak, G. and Levine, M. “Global burden of *Shigella* infections: Implications for vaccine

- development and implementation of control strategies". Bull World Health Organ. 77:651-66, 1999.
33. Le Gall, T.; Mavris, M.; Martino, M.; Bernardini, M.; Denamur, E. and Parsot C. "Analysis of virulence plasmid gene expression defines three classes of effectors in the type III secretion system of *Shigella flexneri*". Microbiology. 151:951-962, 2002.
34. Lee, B.; Van Lanen, S. and Iwata-Reuyl, D. "Mechanistic studies of *Bacillus subtilis* QueF, the nitrite oxidoreductase involved in queuosine biosynthesis". Biochemistry. 46:12844-12854, 2007.
35. McCormick, M. and Mierendorf, R. "S-Tag: A Multipurpose Fusion Peptide for Recombinant Proteins". Novagen, Inc.
36. Martin, F.; Eriani, G.; Eiler, S.; Moras, D.; Dirheimer, G. and Gangloff, J. "Overproduction and Purification of Native and Queuine-lacking *Escherichia coli* tRNA^{Asp}. Role of the Wobble Base in tRNA^{Asp} Acylation". J Mol Biol. 234:965-974. 1993
37. Maurelli, A.; Blackmon, B. and Curtiss II, R. "Temperature-dependent expression of virulence genes in *Shigella flexneri*". Infect Immun. 43:195-201, 1984.
38. Maurelli, A. and Sansonetti, P. "Identification of a Chromosomal Gene Controlling Temperature-Regulated Expression of *Shigella* Virulence". Proc Natl Acad Sci USA. 85:2820-2824. 1988.
39. Ménard, R.; Sansonetti, P. and Parsot, C. "Nonpolar mutagenesis of the ipa genes defines IpaB, IpaC, and IpaD as effectors of *Shigella flexneri* entry into epithelial cells". J Bacteriol. 175:5899-5906, 1993.
40. Miller, J. "A short course in bacterial genetics. In: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and related bacteria". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1992.

41. Mills, J.; Venkatesan, M.; Baron, L. and Buysse, J. “Spontaneous insertion of an IS1-like element into the *virF* gene is responsible for avirulence in opaque colonial variants of *Shigella flexneri* 2a”. *Infect Immun.* 60:175-182, 1992.
42. Mitobe, J.; Morita-Ishihara, T.; Ishihama, A. and Watanabe, H. “Involvement of RNA-binding Protein Hfq in the Post-transcriptional Regulation of *invE* Gene Expression in *Shigella sonnei*”. *J Biol Chem.* 283(9):5738-5747, 2008.
43. Morris, R.; Brown, K. and Elliott, M. “The effect of queuosine on tRNA structure and function”. *J Biomol Struct Dyn.* 16:757-774, 1999.
44. Morris, R. and Elliott, M. “Queuosine Modification of tRNA: A Case for Convergent Evolution”. *Mol Genet Metab.* 74, 147-159, 2001.
45. Mounier, J.; Vasselon, T.; Hellio, R.; Lesourd, M. and Sansonetti, P. “*Shigella flexneri* enters human colonic Caco-2 epithelial cells through the basolateral pole”. *Infect Immun.* 60:237-248, 1992.
46. Nakayama, S. and Watanabe, H. “Involvement of *cpxA*, a sensor of a two-component regulatory system, in the pH-dependent regulation of expression of *Shigella sonnei virF* gene”. *J Bacteriol.* 177:5062-5069, 1995.
47. Nakayama, S. and Watanabe, H. “Identification of *cpxR* as a positive regulator essential for expression of the *Shigella sonnei virF* gene”. *J Bacteriol.* 180:3522-3528, 1998.
48. Noguchi, S.; Nishimura, Y.; Hirota, Y. and Nishimura, S. “Isolation and characterization of an *Escherichia coli* mutant lacking tRNA-guanine transglycosylase. Function and biosynthesis of queuosine in tRNA”. *J Biol Chem.* 257:6544-50, 1982.
49. Ogawa, M.; Handa, Y.; Ashida, H.; Suzuki M. and Sasakawa C. “The versatility of *Shigella* effectors”. *Nat Rev Microbiol.* 6:11-16, 2008.

50. Okada, N.; Noguchi, S.; Kasai, H.; Shindo-Okada, N.; Ohgi, T.; Goto, T. and Nishimura, S. "Novel Mechanism of Post-transcriptional Modification of tRNA". J Biol Chem. 254:3067-73, 1979.
51. Parsot, C. "*Shigella spp.* and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors". FEMS Microbiol Lett. 252:11-18, 2005.
52. Porter, M. and Dorman, C. "A role for H-NS in the thermoosmotic regulation of virulence gene expression in *Shigella flexneri*". J Bacteriol. 176:4187-4191, 1994.
53. Porter, M. and Dorman, C. "Positive regulation of *Shigella flexneri* virulence genes by integration host factor". J Bacteriol. 179:6537-6550, 1997.
54. Porter, M. and Dorman, C. "Differential regulation of the plasmid-encoded genes in the *Shigella flexneri* virulence regulon". Mol Gen Genet. 256:93-103, 1997.
55. Prado, V.; Lagos, R.; Nataro, J.; Martin, O.; Arellano, C.; Wang, J.; Borczyk, M.; and Levine, M. "Population-based study of the incidence of *Shigella* diarrhea and causative serotypes in Santiago, Chile". Pediatr Infect Dis J. 18:500-505, 1999.
56. Pupo, G.; Lan, R. and Reeves, P. "Multiple independent origins of *Shigella* clones of *Escherichia coli* and convergent evolution of many of their characteristics". Proc Natl Acad Sci USA. 97:10567-10572, 2000.
57. Salazar, J. "Estudio de la interacción entre la tirosil-tRNA sintetasa y el tRNA^{Tyr}". Tesis Doctor en Ciencias Biomédicas. 2001.
58. Salazar, J.; Ambrogelly, A.; Crain, P.; McCloskey, J. and Söll, D. "A truncated aminoacyl-tRNA synthetase modifies RNA". Proc Natl Acad Sci USA. 101:7536-7541, 2004.
59. Sambrook, J.; Fritsch, E. y Maniatis, T. "Molecular cloning. A laboratory manual. Second edition". Cold Spring Harbor Laboratory. USA, 1989.

60. Sansonetti, P.; Kopecko, D. and Formal, S. "Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*". *Infect Immun.* 35:852-860, 1982.
61. Sasakawa, C.; Kamata, K.; Sakai, T.; Makino, S.; Yamada, M.; Okada, N. and Yoshikawa, M. "Virulence-associated genetic regions comprising 31 kilobases of the 230-kilobase plasmid in *Shigella flexneri* 2a". *J Bacteriol.* 170:2480-2484, 1988.
62. Skoudy, A.; Mounier, J.; Aruffo, A.; Ohayon, H.; Gounon, P.; Sansonetti, P. and Tran Van Nhieu, P. "CD44 binds to the *Shigella* IpaB protein and participates in bacterial invasion of epithelial cells". *Cell Microbiol.* 2:19-33, 2000.
63. Small, P.; Blankenhorn, D.; Welty, D.; Zinser, E. and Slonczewski, J. "Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH". *J Bacteriol.* 176:1729-1737, 1994.
64. Suzuki, T.; Miki, H.; Takenawa, T. and Sasakawa, C. "Neural Wiskott–Aldrich syndrome protein is implicated in the actin-based motility of *Shigella flexneri*". *EMBO J.* 17:2767-2776, 1998.
65. Tobe, T.; Yoshikawa, M. and C. Sasakawa. "Thermoregulation of *virB* transcription in *Shigella flexneri* by sensing of changes in local DNA superhelicity". *J Bacteriol.* 177:1094-1097. 1995, 2000.
66. Turner, E. and Dorman, C. "H-NS antagonism in *Shigella flexneri* by VirB, a virulence gene transcription regulator that is closely related to plasmid partition factors". *J Bacteriol.* 189:3403-3413, 2007.
67. Urbonavicius, J.; Qian, Q.; Durand, J.; Hagervall, T. and Björk, G. "Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications". *EMBO J.* 20:4863-4873, 2001.

68. Venkatesan, M.; Goldberg, M.; Rose, D.; Grotbeck, E.; Burland, V. and Blattner, F. "Complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Shigella flexneri*". *Infect Immun.* 69:3271-3285, 2001.
69. Vidal, M.; Kruger, E.; Durán, C.; Lagos, R.; Levine, M.; Prado, V.; Toro, C. and Vidal, R. "Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections". *J Clin Microbiol.* 43:5362-5365, 2005.
70. Wang, R. and Kushner, S. "Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*". *Gene.* 100:195-199. 1991.
71. Watanabe, H.; Arakawa, E.; Ito, K.; Kato, J. and Nakamura, A. "Genetic analysis of an invasion region by use of a Tn3-lac transposon and identification of a second positive regulator gene, *invE*, for cell invasion of *Shigella sonnei*: significant homology of *invE* with ParB of plasmid P1". *J Bacteriol.* 172:619-629, 1990.
72. Watarai, M.; Funato, S. and Sasakawa, C. "Interaction of Ipa proteins of *Shigella flexneri* with $\alpha_5\beta_1$ integrin promotes entry of the bacteria into mammalian cells". *J Exp Med.* 183:991-999, 1996.
73. Williams, R. and Rimsky, S. "Molecular aspects of the *E. coli* nucleoid protein, H-NS: a central controller of gene regulatory networks". *FEMS Microbiol Lett* 156:175-185, 1997.
74. Wing, H.; Yan, A.; Goldman, S. and Goldberg, M. "Regulation of IcsP, the outer membrane protease of the *Shigella* actin tail assembly protein IcsA, by virulence plasmid regulators VirF and VirB". *J Bacteriol.* 186, 699–705, 2004.
75. Yamada, H.; Muramatsu, S. and Mizuno, T. "An *Escherichia coli* protein that preferentially binds to sharply curved DNA". *J Biochem.* 108:420-425, 1990.

76. Yim, L.; Moukadiri, I.; Bjork, G. and Armengod, M. "Further insights into the tRNA modification process controlled by proteins MnmE and GidA of *Escherichia coli*". *Nucleic Acids Res.* 34:5892-5905, 2006.
77. Yu, Z. and Morrison, M. "Comparisons of different hypervariable regions of *rrs* genes for use in fingerprinting of microbial communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis". *Appl Environ Microbiol.* 70:4800-4806, 2004.
78. Zychlinsky, A.; Fitting, C.; Cavaillon, J. and Sansonetti, P. "Interleukin 1 is released by murine macrophages during apoptosis Induced by *Shigella flexneri*". *J Clin Invest.* 94:1328-1332, 1994.
79. Zychlinsky, A.; Kenny, B.; Ménard, R.; Prévost, M.; Holland, I. and Sansonetti, P. "IpaB mediates macrophage apoptosis induced by *Shigella flexneri*". *Mol Microbiol.* 11:619-627, 1994.