



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Ciencias Biológicas

**Clonación, purificación y generación de anticuerpos policlonales contra la adhesina
Bap de *Escherichia coli* enterohemorrágica**

Tesis que para obtener el título de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

PRESENTA

Sergio Iván Vázquez Arellano

DIRECTOR (A): Cristina Lara Ochoa

Diciembre 2020



AGRADECIMIENTOS

La presente tesis es un reto académico y personal, en el que, de un modo u otro, personas importantes en mi vida profesional y personal han contribuido o demostrado su interés, cercanía y apoyo moral.

Por ello, quiero expresar mi profundo agradecimiento a:

En primer lugar, a la M. en C. Cristina Lara Ochoa, por confiar en mí, para realizar este proyecto, así como por todos los buenos consejos y agradables momentos que compartimos juntos.

A la Doctora María Lilia Cedillo Ramírez, por todo el apoyo a las necesidades expuestas para el desarrollo de este trabajo.

A mi mamá por estar en los momentos mas difíciles de la carrera y a Mariela Vázquez Castillo que me ha impulsado a siempre seguir adelante con mis estudios.

Por ultimo, quiero agradecer a mis amigos Karen, Karla, Bernardo, Alfredo, Abraham, Paty y Amin, por todos esos buenos momentos vividos en el laboratorio en especial a esas comidas de las 2 de la tarde que jamás olvidare.

CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS	iv
LISTA DE FIGURAS	vi
LISTA DE TABLAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC).....	2
1.2 Determinantes genéticos contenidos en EHEC O157:H7	4
1.2.1 Isla de Patogenicidad LEE	4
1.2.2 Plásmido pO157	7
1.2.3 Islas Genómicas relacionadas con <i>stx1</i> y <i>stx2</i>	7
1.3 Factores de virulencia de EHEC	8
1.3.1 Sistemas de resistencia a ácido.....	8
1.3.2 Adhesinas	9
1.3.3 SST3.....	20
1.3.4 Toxina Shiga.....	23
1.4 Mecanismo de patogenicidad de EHEC	27
2. ANTECEDENTES	30
2.1 Antecedentes generales	30
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
4. HIPÓTESIS	39
5. OBJETIVOS.....	39
5.1 Objetivo general.....	39
5.2 Objetivos particulares.....	39
6. MATERIALES Y MÉTODOS	40
6.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	40
6.2 Manipulación de DNA.....	41

6.3 PCR punto final	42
6.4 Electroforesis en gel de agarosa para la separación de DNA.....	43
6.5 Extracción y purificación de DNA	43
6.5.1 Extracción de DNA genómico (DNAg)	43
6.5.2 Extracción de DNA plasmídico	43
6.5.3 Purificación de fragmentos de DNA a partir de gel de agarosa	44
6.6 Generación de células químicamente competentes por CaCl ₂	44
6.7 Transformación por choque térmico	45
6.8 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	45
6.9 Construcción de pBap(4696-4826)EH.....	46
6.10 Sobreexpresión y purificación de la proteína Bap(4696-4826)-6XH.....	48
6.11 Diálisis y concentración de la proteína Bap(4696-4826)-6XH.....	49
6.12 Secuenciación de la proteína Bap (4696-4826) por Espectrometría de masas	49
6.13 Western blot	50
6.13.1 Western blot para la detección de Bap(4696-4826)-6XH	50
6.13.2 Western blot para la detección de Bap	51
6.14 Cuantificación de proteínas.....	52
6.15 Generación de anticuerpos	53
6.16 Ensayos de adherencia	53
6.17 Análisis bioinformáticos	54
6.18 Análisis Estadísticos	55
7. RESULTADOS	56
7.1 Análisis bioinformáticos	56
7.1.1 Organización y ubicación de <i>bap</i> (<i>z0615</i>) en el cromosoma de EHEC.....	56
7.1.2 Predicción de dominios de Bap (Z0615).....	57
7.2 Clonación y expresión de la proteína recombinante Bap(4696-4826)-6XH	61
7.3 Purificación de la proteína Bap(4696-4826)-6XH	63
7.4 Identificación de la proteína Bap(4696-4826)-6XH por Espectrometría de masas... 65	
7.5 Evaluación de la funcionalidad de los anticuerpos Anti-Bap	66

7.6 Detección de Bap silvestre en EHEC y EAEC.....	67
7.7 Papel de Bap en la adherencia.....	69
7.7.1 Ensayo de adherencia de EHEC sobre vidrio.....	69
7.7.2 Ensayo de adherencia y formación de biopelícula de EAEC sobre poliestireno.	71
8. DISCUSIÓN.....	73
9. CONCLUSIONES.....	79
10. BIBLIOGRAFÍA.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

A/E	Adherencia y destrucción (<u>A</u> tta ^{ch} ing and <u>E</u> ffacing)
Amp.	Ampicilina
BSA	Albúmina sérica bovina (<u>B</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumine)
°C	Grados centígrados
DMEM	Medio de cultivo para células eucariotas (“ <u>D</u> ullbecco’s <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium”)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena (<u>E</u> nteropathogenic <u>E. coli</u>)
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (Enterohemorrhagic <u>E. coli</u>)
Et al.	Otros colaboradores
kDa	Kilodaltones
kbp	Kilopares de bases
LA	Adherencia localizada (<u>L</u> ocalized <u>a</u> dherence)
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LEE	Locus de eliminación del enterocito (“ <u>L</u> ocus of <u>e</u> nterocyte <u>e</u> ffacement”)
mg	Miligramos
µg	Microgramos
min	Minutos
ml	Mililitros
µl	Microlitros
mM	Milimolar
µM	Micromolar
ng	Nanogramos

nm	Nanómetros
N-WASP	Proteína del síndrome neural Wiskott-Aldrich (<u>N</u> eu <u>r</u> al- <u>W</u> iskott- <u>A</u> ldrich syndrome protein)
PBS	Regulador salino de fosfatos (<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PBS-T	Buffer salino de fosfatos-Tween (<u>P</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>s</u> aline/ <u>T</u> ween)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<u>P</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio (<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate)
SST3	Sistema de secreción tipo III
Stx1	Toxina Shiga 1
Stx2	Toxina Shiga 2
TAE	Tris-acetatos-EDTA
Tir	Receptor de Intimina translocado (<u>T</u> ranslocated <u>i</u> ntimin <u>r</u> eceptor)
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
V	volts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Lesión A/E causada por EHEC y la isla de patogenicidad LEE.....	6
Figura 2. Roles propuestos para las principales adhesinas fimbriales y afimbriales de EHEC.....	19
Figura 3. Representación esquemática del SST3.....	22
Figura 4. Esquema de la toxina Shiga y su transporte intracelular en células resistentes y sensibles.	26
Figura 5. Esquema del mecanismo de patogenicidad de EHEC.....	29
Figura 6. Ciclo de vida de la biopelícula.....	31
Figura 7. Organización general de Bap y el SST1.....	33
Figura 8. Papel de Bap en la adherencia de EHEC sobre células epiteliales.	36
Figura 9. Ubicación de <i>bap</i> y orf's ubicados en los extremos en EHEC O157:H7.....	56
Figura 10. Representación gráfica de la predicción de dominios de la proteína Bap (Z0615) en EHEC O157:H7 comparado con proteínas similares a Bap en EAEC 042, <i>Staphylococcus aureus</i> V329 y <i>Salmonella entérica</i> PNUSAS050755 con sus porcentajes de identidad.....	60
Figura 11. Expresión de Bap(4696-4826)-6XH en diferentes cepas de <i>E. coli</i>	62
Figura 12. SDS-PAGE de muestras correspondientes a diferentes pasos de la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad.	64
Figura 13. Principales péptidos obtenidos en la secuenciación por Espectrometría de masas.....	65
Figura 14. Western blot para evaluar la funcionalidad de los anticuerpos anti-Bap generados.....	67
Figura 15. Expresión de Bap en EHEC O157:H7 y otras cepas de <i>E.coli</i> con los anticuerpos anti-Bap.....	68
Figura 16. Papel de Bap en la adherencia de EHEC sobre vidrio.....	70
Figura 17. Papel de Bap en la adherencia y formación de biopelícula de EAEC sobre poliestireno.	72

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales adhesinas fimbriales de EHEC.	13
Tabla 2. Principales proteínas autotransportadoras de EHEC y sus funciones.	16
Tabla 3. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.	40
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.	42
Tabla 5. Concentración estándar para cuantificación por Bradford.	52

RESUMEN

E. coli enterohemorrágica O157:H7 es un patógeno importante causante de diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH) que afecta a la población a nivel mundial. La enfermedad causada por esta bacteria se caracteriza por diarrea sanguinolenta que suele desaparecer sin complicaciones en la mayor parte de los casos. Sin embargo, aproximadamente 5 a 7% de los pacientes desarrollan una complicación conocida como SUH. Ésta es la secuela más seria de la infección por EHEC y su incidencia es más alta en niños y ancianos. La toxina Shiga es el principal factor de virulencia responsable de SUH aunque también contribuye al desarrollo de colitis hemorrágica. Un atributo importante de muchas bacterias patógenas es su capacidad para adherirse a la superficie y formar biopelículas sobre superficies bióticas y abióticas debido en parte a una multitud de proteínas de superficie que median las interacciones entre bacterias y superficie. Al respecto, se han descrito una gran diversidad de adhesinas, SST3, flagelos y proteínas de membrana en EHEC responsables de la adhesión y que contribuyen al establecimiento y desarrollo de la enfermedad. En los últimos años se han publicado diversos trabajos sobre la participación de una nueva familia de adhesinas llamadas Bap (Biofilm associated protein) implicadas en la adherencia y desarrollo de biopelículas en patógenos clínicamente importantes. EHEC cepa EDL933 contiene en su genoma el gen *z0615* con homología a esta familia de proteínas. Estudios preliminares con una cepa mutante en este gen sugieren que *bap* tiene un papel muy importante en la adherencia de EHEC sobre células epiteliales incluso mayor que las principales adhesinas previamente identificadas. Sin embargo, el estudio de la expresión de la proteína Bap en este patógeno no ha sido analizada. El objetivo de este trabajo fue la generación de anticuerpos policlonales contra la proteína Bap con la finalidad de estudiar su expresión y el papel que tiene en la adherencia de EHEC sobre superficies. Para esto, se clonó un fragmento del gen *bap* (*z0615*) que codifica para los aminoácidos 4696 a 4826 unida a una secuencia de 6 histidinas. La proteína resultante Bap (4696-4826)-6XH fue purificada y usada para la obtención de anticuerpos policlonales en conejos. Ensayos de western blot usando los anticuerpos anti-Bap indican que éstos reconocen con alta especificidad a la proteína purificada. Además, los anticuerpos permitieron identificar que Bap nativa es expresada cuando EHEC es cultivada en medio DME a 37°C. Asimismo, ensayos de adherencia de EHEC sobre vidrio sugieren que Bap tiene un papel importante en la unión a esta superficie debido a que la presencia de los anticuerpos anti-Bap provocaron una disminución drástica en la capacidad de la bacteria para adherirse. En este trabajo también se estudió la expresión de Bap en EAEC O42, los anticuerpos anti-Bap fueron capaces también de identificar a la proteína nativa en este patógeno y al igual que en EHEC, Bap se expresó cuando la bacteria fue cultivada en medio DME a 37°C. Ensayos de adherencia realizados con EAEC sobre poliestireno sugieren que Bap es requerida para la adherencia debido a que los anticuerpos anti-Bap bloquearon drásticamente la adherencia. Finalmente, los anticuerpos anti-Bap generados en este trabajo podrían servir como una herramienta importante para el estudio y caracterización profunda de las proteínas Bap en EHEC y EAEC para revelar el papel de esta nueva adhesina y su participación en el desarrollo de las enfermedades generadas por estos poderosos patógenos del ser humano.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas representan una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, principalmente en países en vías de desarrollo. En niños menores de 5 años de edad, la diarrea es causante de 1.3 millones de muertes anualmente; siendo, por tanto, la segunda causa de muerte en ese rango de edad (Mokomane et al. 2018). La Organización Mundial de la Salud define la diarrea como la deposición de tres o más veces al día (o con frecuencia mayor que la normal para la persona) de heces sueltas o líquidas (WHO 2017). Su etiología puede ser infecciosa causada por bacterias, virus o parásitos o de tipo no infeccioso (Humphries and Linscott 2015). Las bacterias que comúnmente se asocian como causantes de este padecimiento son: *Aeromonas*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Plesiomonas shigelloides*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio* y *Escherichia coli* (Humphries and Linscott 2015). *Escherichia coli* es una bacteria Gram-negativa en forma de bacilo y es un miembro importante de la microbiota intestinal de los humanos y otros mamíferos, pero también puede ser un patógeno altamente versátil y con frecuencia mortal (Fatima and Aziz 2018). Diferentes cepas de *E. coli* son capaces de causar una gran diversidad de enfermedades intestinales y extraintestinales mediante la adquisición de un gran repertorio de factores de virulencia que afectan una amplia gama de procesos celulares en sus hospederos (Kaper et al. 2004). Las cepas de *E. coli* causantes de enfermedades intestinales se dividen en seis categorías: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* adherente difusa (DAEC) (Kaper et al. 2004).

1.1 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

EHEC es un patógeno que suele causar diarrea y en la mayor parte de los casos colitis hemorrágica, una afección caracterizada por la presencia de grandes cantidades de sangre en heces. Desafortunadamente, en algunos pacientes este patógeno puede desencadenar patologías graves como síndrome urémico hemolítico (SUH) y púrpura trombocitopenia trombótica (PTT). El SUH es un padecimiento que afecta la sangre y los vasos sanguíneos. Resulta en la destrucción de las plaquetas, un recuento bajo de glóbulos rojos (anemia) e insuficiencia renal debido al daño en los vasos sanguíneos. Otros órganos como el cerebro o el corazón también pueden verse afectados por este patógeno. La lesión patológica conduce al engrosamiento de las arteriolas y las paredes capilares, inflamación y desprendimiento endotelial. La fibrina y los trombos ricos en plaquetas conducen a la obstrucción de la luz vascular (Rosove 2014).

La púrpura trombocitopenia trombótica (TTP) es una enfermedad potencialmente mortal en la cual se presenta una destrucción de las plaquetas. Filamentos sueltos de plaquetas y fibrinas se depositan en múltiples vasos pequeños, los cuales dañan las plaquetas y los eritrocitos que los atraviesan causando trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática (Joly et al. 2017).

Se han aislado más de 380 serotipos de EHEC de humanos y animales, pero solo un pequeño número está relacionados con enfermedades humanas (Nguyen and Sperandio 2012). El serotipo O157:H7 es el principal causante de brotes por intoxicación alimentaria en Estados Unidos de América (EUA) y fue aislado por primera vez de un paciente con enfermedad gastrointestinal inusual que afectó al menos a 47 personas en Oregón y Michigan en 1982 (Riley et al. 1983). Este serotipo cuenta con un cromosoma de 5,5 Mb, expresa el antígeno somático (O) 157 y el antígeno flagelar (H) 7, tiene características de fermentación retardada de D-sorbitol (>24 h) e incapacidad para producir β -glucuronidasa pero hidroliza una molécula sintética 4-metil-umbeliferil-D-glucurónido (MUG) (Thompson et al. 1990). Por lo tanto, el agar sorbitol MacConkey (SMAC) suplementado con MUG

se ha utilizado para su detección en el laboratorio (Lim et al. 2010b). Este serotipo alberga determinantes genéticos como el plásmido pO157 y la isla de patogenicidad LEE (“Locus of enterocyte effacement”), que contienen genes que codifican para importantes factores de virulencia como: el sistema de secreción tipo III (SST3), la toxina Shiga, fimbrias tipo IV, la adhesina intimina, hemolisina, entre otros (Wang et al. 2014; Croxen and Finlay 2010; Levine 1987).

El ganado bovino es uno de los principales reservorios de EHEC y puede transmitirse a los humanos mediante el consumo de carne poco cocida o de líquidos y alimentos contaminados con estiércol de vaca. La transmisión de EHEC también puede ocurrir por la ruta fecal-oral, especialmente entre lactantes que son atendidos por personas con medidas de higiene deficientes (Wasey and Salen 2019).

La dosis infecciosa es extremadamente baja (10-100 U.F.C), lo que indica que puede sobrevivir en el estómago con alta eficiencia. Esto es debido a su capacidad para soportar el ambiente ácido del estómago (pH 1.5-3.0) gracias a sus tres sistemas de resistencia a ácidos (AR) (AR1, AR2 y AR3) (Foster 2004). Además, produce la toxina Shiga (Stx), un factor de virulencia muy importante que causa daño a células endoteliales renales y que resulta en SUH (Price et al. 2004). Mientras que EHEC O157:H7 causa diarrea en personas de todas las edades, las complicaciones sistémicas ocurren con mayor frecuencia en niños menores de 5 años y adultos mayores de 60 años, aproximadamente el 5% de los casos en personas de este rango de edad se complica con SUH (Fatima and Aziz 2018). Se estima que esta bacteria causa un aproximado de 63,000 casos de colitis hemorrágica anualmente en los E.U.A., incluso llega a ser más común que la shigelosis o salmonelosis (Wasey and Salen 2019). De manera general, EHEC representa un patógeno importante en países industrializados mientras que en países en vías de desarrollo sólo está asociado a pocos brotes epidémicos, esto suele estar atribuido a la protección inmunológica cruzada originada por el patógeno EPEC que prevalece en regiones del mundo menos desarrolladas.

El tratamiento para la infección gastrointestinal causada por EHEC se centra en el mantenimiento del estado de hidratación, la mayoría de los pacientes con diarrea se recuperan sin tratamiento dentro de los primeros 10 días. La terapia con antibióticos no ha tenido un efecto beneficioso para la resolución de complicaciones, por el contrario, existe evidencia de que los antibióticos empeoran los resultados al aumentar la probabilidad de desarrollo de SUH debido a la lisis inducida de las bacterias con la liberación precipitada de toxina Shiga en el medio circundante (Thomas and Elliott 2013). Los pacientes con manifestaciones graves de SUH pueden beneficiarse de la hemodiálisis para tratar problemas de volumen, electrolitos y uremia relacionados con la insuficiencia renal aguda. Datos limitados sugieren que el anticuerpo monoclonal Eculizumab puede acelerar la recuperación, debido a que actúa inhibiendo la cascada del complemento, lo que interfiere en el reclutamiento de células inflamatorias y atenúa el daño a la vascularización renal. Eculizumab es un fármaco extremadamente caro y típicamente se utiliza como agente de rescate en los pacientes más enfermos (Thomas and Elliott 2013).

Por otro lado, los agentes antiperistálticos como loperamida o dicitomina, ralentizan la motilidad intestinal y aumentan el riesgo de complicaciones sistémicas por lo que los médicos deben evitar su utilización en este entorno (Thomas and Elliott 2013).

1.2 Determinantes genéticos contenidos en EHEC O157:H7

1.2.1 Isla de Patogenicidad LEE

Una de las características más importantes de EHEC es la capacidad de producir una lesión histopatológica única denominada A/E (Ataching and Effacing) en una amplia variedad de tipo de células (Figura 1A), estas lesiones se caracterizan por la eliminación de las microvellosidades de las células epiteliales intestinales y rearrreglos del citoesqueleto que llevan a la acumulación de actina polimerizada generando la formación de estructuras en forma de copa o pedestal justo debajo

en donde EHEC se adhiere (Kaper et al. 2004). La capacidad de esta bacteria para formar las lesiones A/E está ligada a un conjunto de genes ubicados en una isla de patogenicidad denominada LEE insertada en el cromosoma. La isla está presente también en la bacteria EPEC y en el patógeno de ratón *Citrobacter rodentium*. Aunque la estructura, organización y disposición de los genes de la isla entre estos patógenos presenta algunas diferencias (Law 2000).

LEE de EHEC tiene un tamaño de 35,6 kb y contiene 41 marcos de lectura abiertos organizados en cinco operones policistrónicos principales llamados *LEE1*, *LEE2*, *LEE3*, *LEE4* y *LEE5* (Figura 1B). *LEE1*, *LEE2* y *LEE3* albergan los genes *esc* y *sep* que codifican para los componentes principales del sistema de secreción tipo III (SST3). *LEE1* alberga el gen regulador *ler* que codifica a la proteína Ler, una proteína de unión a DNA que actúa como el principal regulador transcripcional de los operones de esta isla. *LEE4* contiene los genes que codifican para las proteínas efectoras que son translocadas por el T3SS y en *LEE5* se ubican los genes *eae* y *tir* que codifican para las proteínas intimina y Tir, respectivamente, que favorecen la unión íntima de EHEC con el enterocito (Gaytan et al. 2016; Franzin and Sircili 2015; Donnenberg 2013).

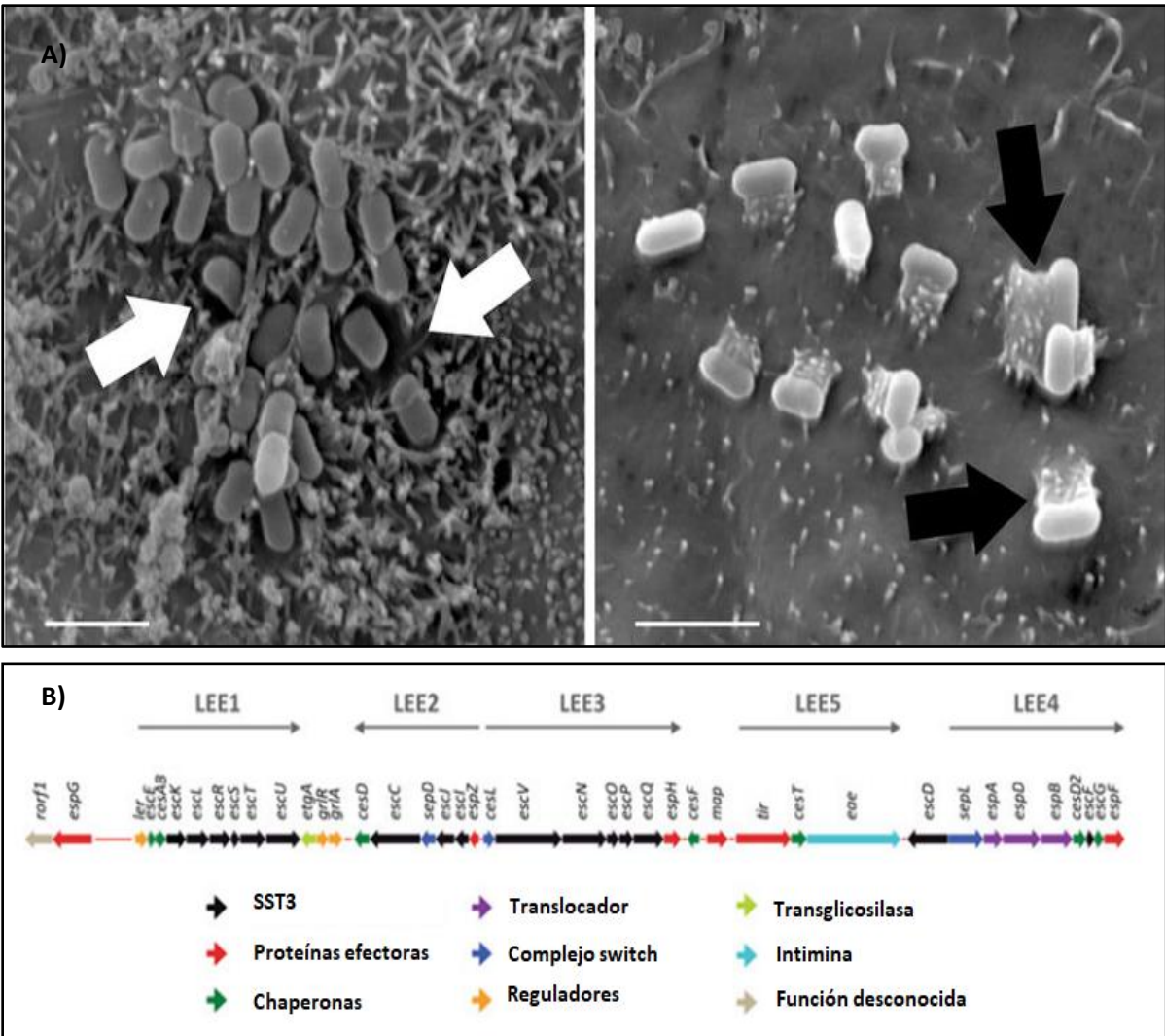


Figura 1. Lesión A/E causada por EHEC y la isla de patogenicidad LEE.

A) Micrografías electrónicas de barrido que muestran el borramiento de microvellosidades asociado a EHEC (flechas blancas) en células polarizadas y formación de pedestal de actina (flechas negras) en células no polarizadas. Barras = 2 μm. Tomado y modificado de (Lewis et al. 2015). B) La isla genómica está organizada en cinco operones principales. Alberga todos los genes necesarios para ensamblar un SST3 funcional, así como reguladores y proteínas efectoras. Tomado y modificado de (Slater et al. 2018).

1.2.2 Plásmido pO157

EHEC contiene un plásmido altamente conservado denominado pO157. Es un plásmido tipo F no conjugante con un rango de tamaño de 92 a 104 kb. Muestra una estructura dinámica e incluye diferentes elementos genéticos móviles, como: transposones, profagos, secuencias de inserción (SI) y partes de otros plásmidos. Estos datos indican que el pO157 se formó mediante la integración de diversos fragmentos de especies evolutivamente diferentes en un plásmido tipo F y, por lo tanto, los genes que codifican factores de virulencia ubicados en el pO157 podrían provenir de diferentes orígenes (Law 2000). La secuencia completa de pO157 revela 100 marcos de lectura abiertos de los cuales solo 19 se han caracterizado, entre éstos se incluyen los genes que codifican para: la enterohemolisina HlyA que pertenece a la familia de las toxinas RTX (Repeats in toxin); EspP, una proteína autotransportadora de la familia serin proteasas que funciona degradando el factor V que participa en el proceso de coagulación; ToxB, una proteína involucrada en la adherencia a células epiteliales y que presenta similitud a la familia de las toxinas de *Clostridium*; y StcE, una metaloproteasa de zinc que tiene actividad de mucinasa y que está relacionada con la colonización y daño al tejido (Lim et al. 2010a; Brunder et al. 1996).

1.2.3 Islas Genómicas relacionadas con *stx1* y *stx2*

En las cepas de EHEC, así como en muchas otras cepas de *E. coli* productoras de Stx (STEC), las toxinas están codificadas por bacteriófagos lisogénicos (O'Brien et al. 1989) La cepa EDL933 de EHEC serotipo O157:H7 produce las variantes Stx1 y Stx2. Stx1 está ubicada en un profago críptico mientras que Stx2 se encuentra el bacteriófago templado 933W (O'Brien et al. 1989; O'Brien et al. 1984). La producción de la toxina Shiga por EHEC se controla mediante la conversión de fagos que portan los operones *SLT-I* y *SLT-II* (O'Brien et al. 1989).

1.3 Factores de virulencia de EHEC

Los factores de virulencia contenidos en EHEC O157:H7 han sido objeto de numerosos estudios y la producción de Stx se considera esencial pero no totalmente responsable de la enfermedad en humanos. A continuación, se describen los factores de virulencia mejor caracterizados de EHEC.

1.3.1 Sistemas de resistencia a ácido

Durante la entrada al hospedero, EHEC debe atravesar un ambiente ácido para llegar al colon donde es capaz de desencadenar diferentes efectos que conllevan a la enfermedad. La capacidad de resistencia al ácido de esta bacteria es debido a 3 sistemas de resistencia a ácidos (AR) que produce: AR1, AR2 y AR3. AR1 es un sistema oxidativo, AR2 es un sistema dependiente de arginina y AR3 dependiente de glutamato (Lin et al. 1996). A pH 2, el sistema dependiente de arginina proporciona más protección en EHEC que en las cepas comensales de *E. coli*. El mecanismo de resistencia oxidativa depende del factor sigma alternativo RpoS que favorece la transcripción de los genes necesarios para la sobrevivencia de EHEC a un pH por debajo de 2.5 durante más de 2 horas (Waterman and Small 1996). Las bacterias en fase estacionaria son 1000 veces más resistentes al ácido que los organismos que crecen exponencialmente y no necesitan exposición previa a pH bajo para exhibir resistencia (Law 2000). Dicha resistencia a los ácidos suele estar asociada con la baja dosis infectiva de este patógeno (Law 2000).

La tolerancia a ácidos es una característica muy importante para EHEC debido a que mejora la supervivencia de este patógeno en los alimentos que presentan un pH ácido tales como: mayonesa, yogurt, diferentes jugos de frutas, etc; lo que representa un grave peligro de consumo de estos alimentos (Croxen and Finlay 2010). De mayor interés es el hallazgo de que el estrés por calor aumenta la resistencia al ácido y es por esto que organismos estresados, pero viables, presentes en los alimentos mal cocinados pueden sobrevivir al tránsito a través del estómago mejor que aquellos en un estado sin estrés (Wang and Doyle 1998).

1.3.2 Adhesinas

Las adhesinas son un grupo de proteínas que participan en la unión o colonización de las bacterias a superficies bióticas y abióticas. De manera general, las bacterias intestinales requieren del uso de adhesinas que sirven en la unión estrecha con el epitelio y les permiten colonizar las diferentes zonas del intestino. En el caso de las bacterias patógenas, las adhesinas representan factores de virulencia importantes porque, además de favorecer la colonización, son responsables de inducir diferentes tipos de daño que conducen a la enfermedad en el hospedero (McWilliams and Torres 2014a).

Las adhesinas reconocen y se unen a receptores específicos de las células huésped, dicho evento de unión puede activar cascadas complejas de transducción de señales en el hospedero que puede tener diversas consecuencias, incluida la activación de las defensas innatas o la subversión de procesos celulares que facilitan la colonización o invasión bacteriana (Soto and Hultgren 1999).

Las adhesinas se dividen en dos categorías: fimbriales y no fimbriales. Las fimbrias o pili son estructuras delgadas y similares a pelos involucradas en la adherencia, la formación de biopelículas y, en el caso de los pili tipo IV, en el movimiento llamado “twitching motility”. La primera observación funcional de pili adhesivos pudo haber sido en 1908, cuando Guyot registró la capacidad de ciertas cepas bacterianas para aglutinar glóbulos rojos (Donnenberg 2013). Las primeras imágenes de estructuras superficiales no flagelares fueron posibles a fines de la década de 1940 y principios de la década de 1950 por la invención del microscopio electrónico. Duguid fue uno de los pioneros en la caracterización de los pili y utilizó la palabra “fimbriae” en 1955, que significa hilos o fibras en latín, para describir las estructuras superficiales de *E. coli* involucradas en la aglutinación de eritrocitos (Duguid et al. 1966). El término “Pili”, del latín que significa pelo o cabello, fue utilizado más tarde por Brinton en 1959 para describir los apéndices de la superficie de *E. coli* no flagelar (Brinton 1965).

EHEC expresa una gran cantidad de proteínas responsables de la adhesión a tejidos del hospedero y que contribuyen al establecimiento, persistencia y tropismo tisular observado durante la infección. Entre las adhesinas más importantes de EHEC se incluyen:

1.3.2.1 Adhesinas fimbriales

Las fimbrias son un grupo de apéndices filamentosos rígidos y rectos que se encuentran sobre la superficie bacteriana. Son más prominentes en las bacterias Gram negativas, donde están ancladas a la membrana externa. Estas estructuras superficiales de cientos a miles de subunidades, median la adhesión a través de la interacción específica con estructuras superficiales (receptores) presentes en las células huésped o sobre superficies inertes (Gerlach and Hensel 2007). Muchas especies bacterianas tienen más de un tipo de pilus y se pueden dividir en cuatro subgrupos generalmente definidos por sus procesos de secreción y ensamblaje: 1) fimbrias ensambladas por la vía de la Chaperona-ayudadora, 2) fimbrias tipo IV; 3) fimbrias ensambladas por la vía alternativa de la Chaperona-ayudadora y 4) fimbrias ensambladas por la ruta extracelular de precipitación-nucleación, también conocida como curli (Berne et al. 2015).

1.3.2.2.1 Fimbria polar larga (LPF1 y LPF2)

Las fimbrias polares largas pertenecen a un subconjunto de las fimbrias tipo IV llamado Tad (por sus siglas en inglés, tight adherence) y también son conocidas como Lpf (Long polar fimbriae), son importantes para la patogénesis y virulencia de *Salmonella entérica* serovar Thyphimurium que causa la fiebre tifoidea murina (Baumler et al. 1996). EHEC O157:H7 contiene dos loci *lpf* no idénticos, homólogos a las fimbrias polares largas de *Salmonella entérica* serovar Thyphimurium, participan en la adherencia inicial a las células epiteliales y están asociadas con la colonización del intestino (Torres et al. 2002). El operón *lpf1* consiste de cinco genes con funciones similares a los descritos en *Salmonella* (Torres et al. 2002). El primer gen, *lpfA*, codifica la proteína de la subunidad

fimbrial principal, mientras que *lpfB* es una chaperona que participa en el plegamiento adecuado. El tercer gen, *lpfC*, es la proteína ayudadora que se inserta en la membrana externa y contiene un codón de paro dentro de este marco de lectura que divide el gen *lpfC* y *lpfC'*. El gen *lpfD* representa la región que codifica para una subunidad fimbrial menor. Finalmente, el gen *lpfE* codifica para otra subunidad de las fimbrias. El operón *lpf2* contiene un duplicado de *lpfD* llamada *lpfD'* y carece del gen *lpfE* (Torres et al. 2004). Debido a estas diferencias genéticas, se han propuesto variaciones estructurales predichas y pueden contribuir a pequeñas diferencias en la función entre LPF1 y LPF2 (Doughty et al. 2002). Además, *lpf1* y *lpf2* están regulados de manera ligeramente diferente. Los estudios indican que la transcripción de *lpf1* aumenta durante la fase logarítmica tardía en medio DMEM a 37°C, pH de 6.5 y en respuesta a las condiciones de sal (Torres et al. 2002). El *lpf2* se ve afectado positivamente por el agotamiento de hierro (Torres et al. 2007). En la tabla 1 se muestran las adhesinas fimbriales mejor caracterizadas en EHEC O157:H7.

1.3.2.2.2 Curli

Curli pertenece a las fimbrias ensambladas por la ruta extracelular de precipitación-nucleación, ha sido reconocido como un factor relacionado con la adherencia capaz de mediar las interacciones entre EHEC y las células huésped, específicamente con proteínas de la matriz extracelular (ECM) laminina y fibronectina, junto con el plasminógeno y las principales moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad clase 1 (Olsen et al. 1989). Curli está formado por fibras delgadas que se agregan en la superficie de las células bacterianas y se caracterizan por su unión al tinte rojo congo (McWilliams and Torres 2014b). Además, está influenciado transcripcionalmente por las señales ambientales, lo que permite que su transcripción responda a varios estímulos como el pH, temperatura y la limitación en nutrientes (Dong and Schellhorn 2009). Existe a nivel genético como dos operones distintos y transcritos de manera divergente: *csgDEFG* y *csgAB* (Romling et al. 1998). Además de asumir el papel de una

adhesina primaria de EHEC en ausencia de Lpf, la función principal de curli es mediar la interacción bacteriana con superficies abióticas, la protección del patógeno de los químicos antisépticos y contribuye directamente a la unión bacteriana al acero inoxidable (Ryu and Beuchat 2005). Otros estudios han identificado otras superficies abióticas a las que curli media la unión, incluidos el poliestireno, vidrio y caucho (Pawar et al. 2005). De manera interesante es el papel importante que tiene en la adherencia de EHEC a las hojas vegetales, lo que hace que curli sea de particular interés en la investigación de brotes asociados con el consumo de espinacas y lechugas contaminadas (Fink et al. 2012).

1.3.2.2.3 ECP (*E. coli* common pilus)

ECP originalmente denominado fimbria asociada a meningitis y regulada por temperatura (Mat), se identificó por primera vez en NMEC causante de meningitis y septicemia en recién nacidos. El operón *ecp* es ubicuo a través de *E. coli* e incluso conservado para algunas otras especies entéricas (McWilliams and Torres 2014b). ECP pertenece a la familia de la Chaperona-ayudadora codificada por *ecpRABCDE*. Se han descrito varios roles para ECP, incluida la unión a células epiteliales humanas cultivadas (Rendon et al. 2007). ECP está compuesta por una proteína única de ~18 kDa llamada EcpA (Garnett et al. 2012), las imágenes de microscopía electrónica de barrido muestran que estos pili son fibras delgadas y flexibles que se extienden varios micrómetros lejos de la superficie bacteriana y tienen una alta tendencia a agregarse en superestructuras paralelas bien ordenadas y antiparalelas de 12 nm (Rendon et al. 2007). Estudios indican que ECP de EHEC es crítica para la adherencia a las células HEp-2 y HeLa (Rendon et al. 2007).

1.3.2.2.4 HCP (*Hemorrhagic coli* pilus)

La fimbria originalmente conocida como TFP (pilus tipo IV), está compuesto por una subunidad de pilina de 19 kDa (HcpA) que esta codificada por el gen

cromosómico *hcpA*. Se muestra como haces de fibras con más de 10 micras de longitud que forman puentes entre las bacterias que se adhieren a las células humanas y bovinas. Sueros de pacientes con SUH, pero no individuos sanos, reconocieron a HcpA, sugiriendo que los pili se producen *in vivo* durante las infecciones por EHEC (Xicohtencatl-Cortes et al. 2007). Además, se demostró que HCP estaba involucrada en las interacciones de EHEC con células de colon humano (T84 y Caco-2), células no intestinales (HeLa y HEp-2) y células epiteliales de riñón bovino (MDBK). También se demostró que HCP contribuye a la adhesión y se sugirió que la interacción de HCP funciona en conjunto con otras adhesinas y sirve como una interacción de unión en la superficie de las células huésped (Xicohtencatl-Cortes et al. 2007).

Tabla 1. Principales adhesinas fimbriales de EHEC.

Nombre de la fimbria	Gen estructural primario	Ligando
Fimbria polar larga 1	<i>lpfA1</i>	Fibronectina, colágeno, IV, laminina
Fimbria polar larga 2	<i>lpfA2</i>	Desconocido
Curli	<i>csgA</i>	Superficies abióticas, hojas de lechuga
Pilus común de <i>E.coli</i>	<i>ecpA</i>	Desconocido
Fimbria F9	<i>Z2200</i>	Fibronectina
Fimbria de <i>E. coli</i> con unión a laminina	<i>ycbQ</i>	Laminina
Proteínas de fimbrias fermentadoras de sorbitol	<i>sfpA</i>	Desconocido
Fimbrias tipo 1	<i>fimA</i>	Superficies abióticas
Proteína hemorrágica de <i>E.coli</i>	<i>hcpA</i>	Laminina, fibronectina

Tomado y modificado de (McWilliams and Torres 2014a).

1.3.2.3 Adhesinas afimbriales

Las adhesinas no fimbriales son estructuras monoméricas o triméricas cortas. Este tipo de adhesina se disemina ampliamente entre bacterias y participa en la unión celular a superficies abióticas o células huésped. Están ancladas en la superficie bacteriana y comúnmente están asociadas con la agregación bacteria-bacteria, la formación de colonias bacterianas y desarrollo de biopelículas (Berne et al. 2015). En bacterias Gram negativas, se agrupan en dos categorías principales: las adhesinas no fimbriales secretadas a través del sistema de secreción tipo 1 (SST1) y adhesinas no fimbriales exportadas mediante el sistema de secreción tipo 5 (SST5) (Tabla 2) (Chagnot et al. 2013; Gerlach and Hensel 2007).

En las bacterias Gram negativas, el sistema de secreción tipo 1 (SST1) secreta un grupo muy grande de adhesinas no fimbriales. Este sistema es uno de los más simples descritos hasta la fecha. Es un complejo compuesto por tres componentes: 1) un autotransportador ABC de membrana interna (por sus siglas en inglés, ATP binding cassette), 2) una proteína de fusión de membrana en el espacio periplásmico y 3) un poro de membrana externa. Estas tres proteínas interactúan y forman un canal que transporta específicamente sustratos del SST1 a través de la envoltura bacteriana en un solo paso, directamente desde el citoplasma al espacio extracelular. Las proteínas dirigidas por el SST1 comparten un dominio C-terminal de estructura secundaria ligeramente conservada que no se escinde durante el proceso de secreción. Las proteínas se secretan en un estado desplegado, primero interactúan con el transportador ABC desencadenando un cambio conformacional del canal y la posterior hidrólisis de ATP, seguido del transporte de la proteína a través del canal del sistema de secreción y el posterior plegamiento de la proteína secretada (Delepelaire 2004).

La otra clase de adhesinas no fimbriales son secretadas por el SST5 también conocido como Autotransportador (AT). Las proteínas que forman dicho sistema son también las proteínas secretadas y esto sucede en un proceso de exportación

en dos pasos: las proteínas se transportan primero desde el citoplasma a través de la maquinaria Sec al periplasma y luego es secretada a través de la membrana externa mediante un poro formado por dominios β , presentes en el extremo carboxilo terminal de la misma proteína. Todas las proteínas del SST5 comparten características estructurales y funcionales comunes: 1) un péptido señal ubicado en el N-terminal dependiente de Sec, 2) un dominio pasajero que es translocado al exterior de la bacteria y 3) dominios β ubicados en el C-terminal que forma el poro para la secreción del dominio pasajero (Berne et al. 2015).

1.3.2.3.1 Intimina

Una de las adhesinas más importantes y mejor caracterizadas en EHEC es la proteína Intimina identificada originalmente en EPEC (Jerse et al. 1990). Intimina de EPEC y EHEC comparten el 86% de homología a nivel de nucleótidos y 83% a nivel de proteínas, con la mayor parte de la divergencia entre estas dos proteínas en su extremo C-terminal, que es el dominio responsable de la interacción con su blanco (Yu and Kaper 1992). Intimina de EHEC es una proteína de 95 kDa (939 aminoácidos) que se puede dividir en dos regiones funcionales, la región N-terminal (residuos 1-550) contiene una región que es responsable de su interacción con el sistema Sec (Francis et al. 1986), una región de tipo LysM (Motivo de lisina) que permite la integración en el peptidoglicano (Buist et al. 2008) y un dominio β que se inserta en la membrana externa de la bacteria y que favorece la disposición a la superficie bacteriana del dominio responsable de la interacción con la célula huésped. Mientras que la región C-terminal contiene 4 dominios pequeños (D1-D4), cada uno de los cuales son dominios independientes de tipo inmunoglobulina bacteriana (BIG, por sus siglas en inglés) que forman una región expuesta en la superficie de la bacteria a la que se une al receptor de Intimina translocado (Tir, por sus siglas en inglés) (Kelly et al. 1999). La interacción Tir-Intimina desencadena una serie de eventos dentro de la célula hospedera que originan cambios en el citoesqueleto y la acumulación de actina

polimerizada que producen las lesiones A/E y que permiten a EHEC establecer una interacción íntima con su hospedero.

1.3.2.3.2 EhaA-D

Autotransportadores de *E.coli* enterohemorrágica Eha (Por sus siglas en inglés, autotransporter protein of enterohemorrhagic *E. coli*) son proteínas expuestas a la superficie que contribuyen a la interacción con las células huésped y tienen la capacidad de secretarse independientemente de la maquinaria de translocación celular convencional (Henderson and Nataro 2001). Un estudio identificó en EHEC O157:H7 cuatro genes (*z0402/ehaA*, *z0469/ehaB*, *z3487/ehaC*, y *z3948/ehaD*) que codifican a miembros de esta familia (Wells et al. 2008). Estas proteínas son capaces de inducir la formación de biopelículas en células epiteliales del recto bovino (McWilliams and Torres 2014b). En la tabla 2 se muestran los autotransportadores mejor caracterizados de EHEC.

Tabla 2. Principales proteínas autotransportadoras de EHEC y sus funciones.

Proteínas autotransportadoras	Gen estructural primario	Función
EhaA	<i>ehaA</i>	Biopelículas
EhaB	<i>ehaB</i>	Biopelículas
EspP	<i>espP</i>	Actividad proteasa, Biopelículas
Saa	<i>saa</i>	Adhesión a la célula huésped
Sab	<i>sab</i>	Adhesión a la célula huésped, biopelículas
Cah	<i>cah</i>	Autoagregación, unión de Ca ⁺ , unión a hojas vegetales

Tomado y modificado de (McWilliams and Torres 2014a).

1.3.2.3.3 Saa y Sab

Saa y Sab son proteínas autotransportadoras, ambas son adhesinas codificadas por plásmidos. La adhesina autoaglutinante de STEC Saa (Por sus siglas en inglés, STEC autoagglutinating adhesin) fue la primera adhesina identificada en una cepa LEE negativa (O133:H21), responsable de un brote de SUH (Paton et al. 2001). Diversos estudios mostraron que la expresión en *trans* dio como resultado un aumento de casi 10 veces en la adhesión bacteriana a las células HEp-2. Por el contrario, la mutación del gen *saa* resultó en una reducción significativa en esta unión (Paton et al. 2001). Esta proteína varía en tamaño como consecuencia de la variación en el número de copias de una unidad con repeticiones de 37-aa en la región C-terminal. Curiosamente las cepas que portaban los genes *saa* más cortos exhibieron una menor adherencia a las células HEp-2 (Lucchesi et al. 2006).

El autotransportador STEC que contribuye a la formación de biopelículas Sab (Por sus siglas en inglés, STEC autotransporter contributing to biofilm formation) no se ha caracterizado tan ampliamente como Saa pero se ha demostrado que media la adhesión a las células HEp-2 y las cepas mutantes son menos adhesivas que la cepa O133 de tipo silvestre (Herold et al. 2009). El gen *sab* de 4,296 pb codifica una proteína de 1,431 aminoácidos con las características de los miembros de la familia de proteínas autotransportadoras. Cuando se expresa en *E. coli* JM109, Sab contribuyó a la adherencia difusa a las células epiteliales humanas (HEp-2) y promovió la formación de biopelículas en las superficies de poliestireno. Una mutante por delección *sab* 98NK2 también fue defectuosa en la formación de biopelícula en relación con la tipo silvestre (Herold et al. 2009).

1.3.2.4 Flagelo H7

El flagelo bacteriano es una maquina molecular compleja con una diversidad de funciones en la patogénesis que incluyen llegar al sitio óptimo del hospedador, colonización o invasión, mantenimiento en el sitio de infección y dispersión posterior a la infección. Son estructuras conformadas por hélices helicoidales que

se extienden desde la superficie bacteriana y su ensamblaje requiere la exportación ordenada de miles de subunidades estructurales a través de la membrana celular y esto se logra mediante una maquinaria de exportación de tipo III ubicada en la base del flagelo, después de lo cual las subunidades transitan por un canal estrecho en el núcleo del flagelo para llegar al sitio de ensamblaje en la punta de la estructura naciente (Evans et al. 2014). En EHEC O157:H7 la flagelina H7 se une al moco bovino principalmente a mucinas I y II, que puede contribuir a la colonización de las superficies mucosas (Erdem et al. 2007). Además, estudios con EHEC O157:H7 carente de flagelos exhibe una adherencia disminuida al epitelio rectal bovino ya que la eliminación de la flagelina *fliC_{H7}* (proteína estructural del filamento flagelar) reduce significativamente su adherencia al igual que la incubación de la cepa parental con anticuerpos específicos para H7 (Mahajan et al. 2009). También se ha demostrado que el flagelo H7 induce la producción de quimiocinas como la interleucina 8 y la infiltración neutrofílica a la mucosa intestinal, lo que a su vez puede aumentar la captación de la toxina Shiga (Stx) a través del epitelio intestinal (Moxley 2004). Estos hallazgos indican que la contribución general de los flagelos como orgánulos de adherencia no puede pasarse por alto.

Hay una gran cantidad de proteínas dentro del proteoma de EHEC que contribuyen en diversos grados a su interacción con diversas superficies como: hojas de plantas, células epiteliales intestinales del ganado bovino y del humano, así como con las superficies abióticas, como el vidrio y el poliestireno. En la figura 2 se muestran algunas de las principales adhesinas que han mostrado ser esenciales en la colonización de EHEC en el epitelio intestinal.

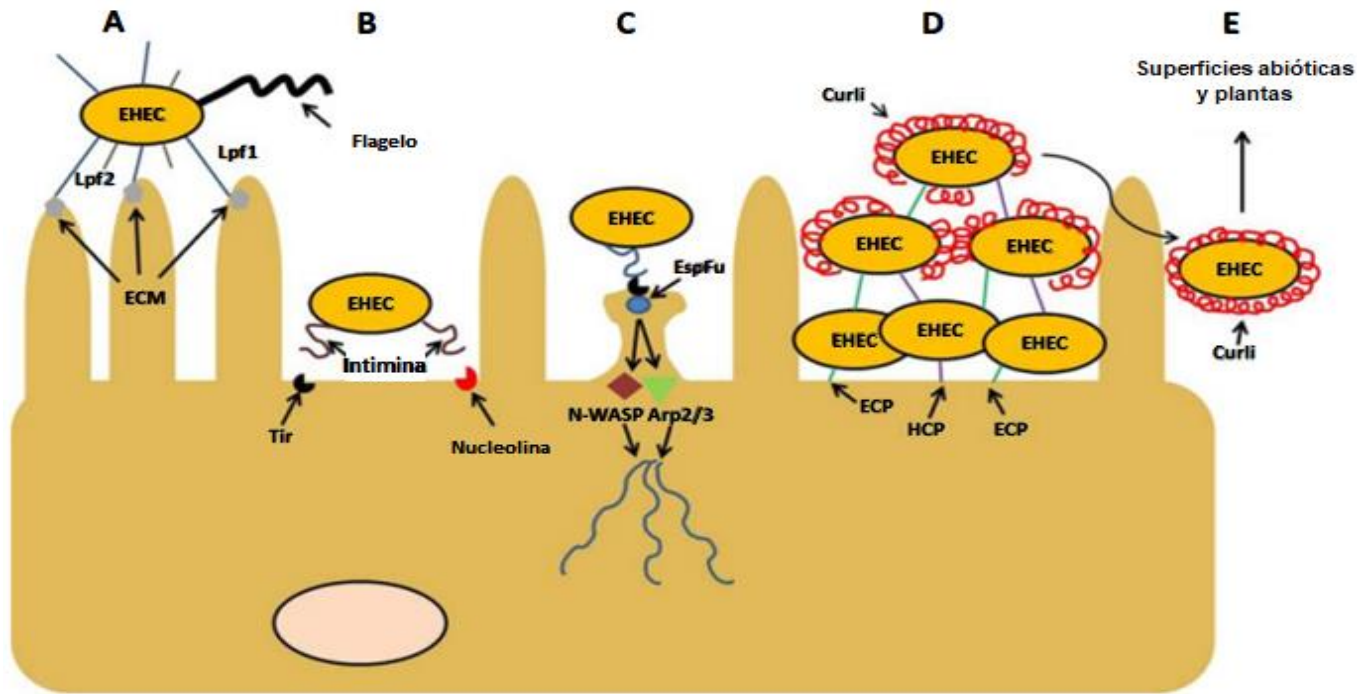


Figura 2. Roles propuestos para las principales adhesinas fimbriales y afimbriales de EHEC.

Se propone que EHEC establece una interacción inicial con las proteínas de membrana de los enterocitos (ECM) mediante la fimbria Lpf (A), la cual reconoce y se une a la laminina, el colágeno IV y la fibronectina. Después de que se establece la interacción inicial, EHEC es capaz de unirse estrechamente a la célula huésped a través de la interacción de la proteína de superficie Intimina con su receptor translocado de Intimina, Tir (B). Dicha interacción desencadena el reordenamiento de actina de la célula huésped mediante la participación de la proteína bacteriana translocada EspFu y el reclutamiento de varias proteínas del huésped (C). Se ha propuesto que ECP y HCP interactúan con la superficie de las células intestinales fortaleciendo la colonización mediante la formación de microcolonias o biopelículas. También se ha demostrado que curli contribuye al establecimiento de biopelículas, aunque no se ha demostrado una interacción con ECP y HCP. Finalmente, en (E), se muestra curli que es importante para la interacción del patógeno con superficies abióticas y la colonización de superficies de hojas de vegetales. Tomada y modificada de (McWilliams and Torres 2014a).

1.3.3 SST3

El sistema de secreción tipo III (SST3) es una estructura bacteriana compleja que proporciona a algunos patógenos Gram negativos un mecanismo de virulencia único, es utilizado por los patógenos para inyectar proteínas efectoras directamente en el citoplasma de la célula huésped, evitando el medio extracelular. Aunque las proteínas efectoras varían entre los diferentes patógenos, existen mecanismos comunes que alteran al hospedero, que incluyen: interferencia con el citoesqueleto de la célula huésped para promover la unión o la invasión, interferencia con los procesos del tráfico vesicular, citotoxicidad, alteración de las uniones celulares, subversión del sistema inmune, etc (Fatima and Aziz 2018). SST3 es llamado también inyectisoma porque su estructura es similar y funciona como una jeringa, el componente principal se encuentra anclado en la membrana interna y externa de la bacteria y la aguja, que sobresale de la superficie, perfora la membrana plasmática del huésped para translocar las proteínas efectoras directamente en el citosol de los enterocitos. Esto conduce al reordenamiento y subversión de las vías de señalización de la célula huésped con fines de sobrevivencia de EHEC (Slater et al. 2018).

El SST3 de EHEC está formado por aproximadamente 20 proteínas, consta de dos anillos que proporcionan un camino continuo a través de las membranas internas y externas, incluida la capa de peptidoglicano (Figura 3). El anillo de la membrana interna es el más grande de los dos anillos coaxiales. Una estructura en forma de aguja se asocia con el anillo de la membrana externa y se proyecta hacia la superficie bacteriana. Las proteínas efectoras se translocan a través de la aguja hueca en forma de tubo hacia la célula huésped mediante los poros formados en la membrana del enterocito por las mismas proteínas translocadoras. El ensamblaje es un proceso que ocurre en 4 etapas: 1) ensamblaje del cuerpo basal y el aparato de exportación, 2) ensamblaje de la varilla interna y aguja, 3) ensamblaje del filamento y 4) translocación de efectores (Slater et al. 2018).

Los componentes que se anclan en las membranas y las proteínas que forman la aguja generalmente se conservan entre los diferentes patógenos que poseen un SST3 y muestran complementariedad funcional para la secreción y la translocación, mientras que los efectores son a menudo distintos, tienen funciones únicas adecuadas para la estrategia de virulencia de un patógeno particular (Coburn et al. 2007).

En EHEC, las proteínas efectoras mejor caracterizadas que son translocadas por el SST3 están codificadas en LEE e incluyen: Tir, Map, EspF y EspH (Dahan et al. 2005). Tir es insertada en la membrana plasmática de la célula huésped, donde funciona como un receptor bacteriano para la Intimina. Map se dirige a las mitocondrias y se ha sugerido que interrumpe su función normal, dicha interacción con las mitocondrias sugiere un posible papel en la subversión de las funciones clave de estos organelos, como la producción de energía (Kenny and Jepson 2000). EspF interrumpe la función de barrera intestinal contribuyendo a la diarrea y también juega un papel en la apoptosis de células epiteliales (Crane et al. 2001). EspH cuando es sobreexpresada induce un alargamiento marcado en los pedestales típicamente planos ya que es un modulador de la estructura del citoesqueleto de actina en el huésped (Tu et al. 2003).

De manera interesante, existen diversas proteínas efectoras que utilizan el SST3 pero que no están codificadas en LEE, algunas de éstas son: Cif (factor inhibidor del ciclo), EspI/NleA y TccP (proteína de acoplamiento al citoesqueleto Tir)/ESpFu (Dahan et al. 2005). Cif bloquea la transición del ciclo celular G2/M e induce la formación de fibras de estrés a través del reclutamiento de adherencias focales (Marches et al. 2003). EspI/NleA esta codificada en una isla de patogenicidad asociada a un profago dentro del genoma de EHEC (Gruenheid et al. 2004).

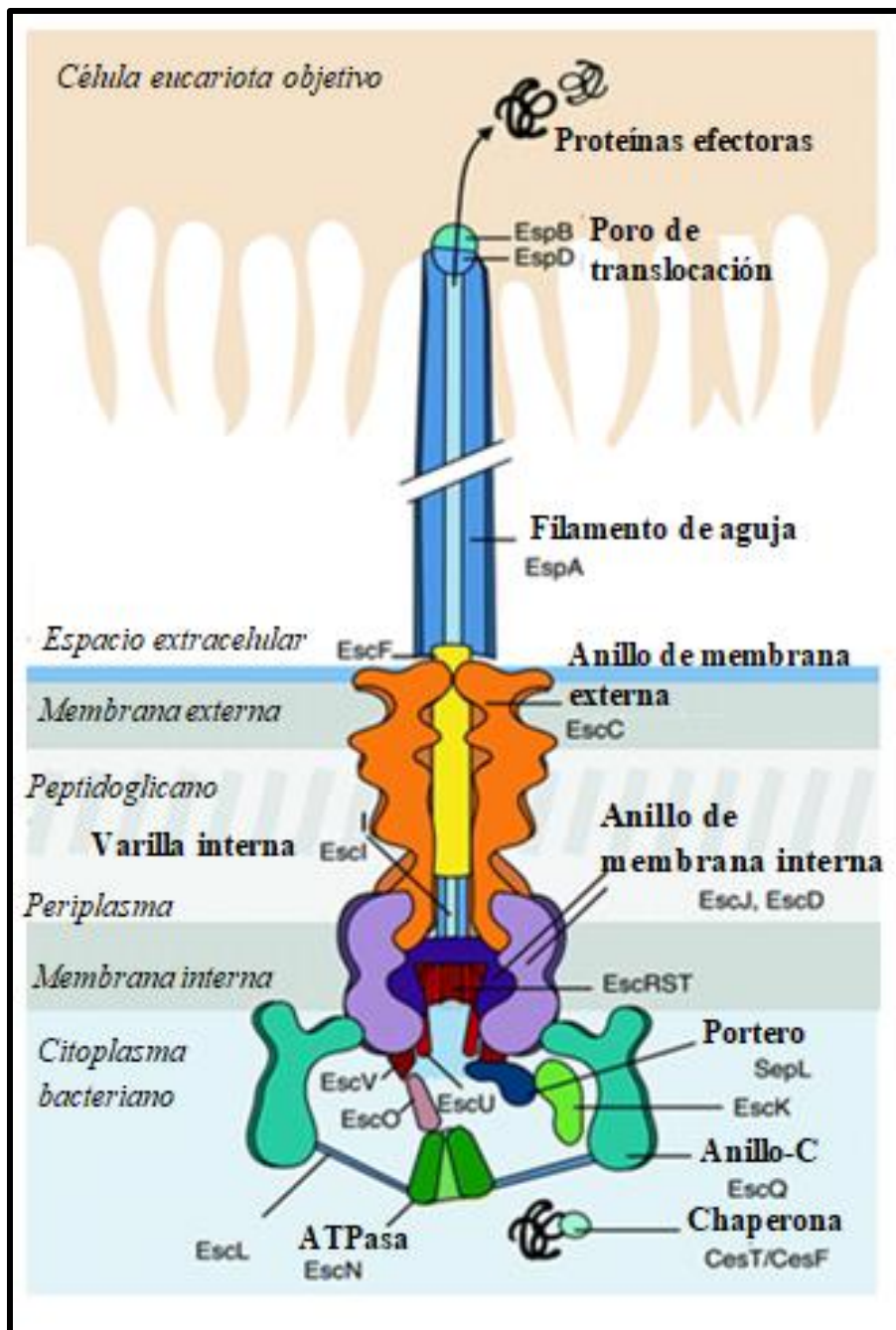


Figura 3. Representación esquemática del SST3.

El SST3 consta de una serie de estructuras coaxiales en forma de anillo. Comprende un aparato de exportación (rojo), un complejo de base y un filamento de aguja (azul) a través del cual se translocan las proteínas efectoras. El complejo ATPasa ubicado en el citoplasma (verde) potencia el ensamblaje del inyector, así como la translocación de proteínas efectoras. Tomado y modificado de (Slater et al. 2018).

Una vez translocada en las células huésped se dirige al aparato de Golgi, aunque su papel en la virulencia aun no está claro se ha mostrado que NleA participa en la perturbación de las uniones estrechas intestinales por lo menos en el patógeno EPEC y que su papel en esto está relacionado con la interrupción del tráfico de proteínas (Thanabalasuriar et al. 2010). TccP/EspF_u es un efector que se transporta en el profago CP-933U y se transloca a las células huésped. Mientras que Tir de EHEC no puede reclutar eficientemente a N-WASP o desencadenar la polimerización de actina, EspF_u se asocia con Tir, se une a N-WASP y estimula fuertemente el ensamblaje de actina (Campellone et al. 2004). En esta lista se incluyen también a las proteínas Nle (non-LEE encoded): EspJ, NleB, NleE, NleF y NleH; las cuales diversos estudios han demostrado que tienen efectos sobre la supervivencia y colonización de EHEC. Un ejemplo es EspJ que no es necesaria para la formación de lesiones A/E en células HEp-2, pero estudios *in vivo* en ratones muestran que ayuda en el paso de EHEC a través del tracto intestinal del huésped, lo que sugiere un papel para EspJ en la supervivencia del huésped (Dahan et al. 2005). Aunque no ha sido ampliamente descrito el papel que juegan los otros efectores en la patogénesis de EHEC, se sabe que en el patógeno de ratón *Citrobacter rodentium* las mutantes en *nleB*, *nleE*, *nleF* o *nleH* muestran un efecto reducido en la capacidad de colonización en ratones en comparación con la cepa de tipo silvestre (Nguyen and Sperandio 2012).

1.3.4 Toxina Shiga

EHEC O157:H7 produce la toxina Shiga (Stx), uno de los factores de virulencia más importantes responsable de las complicaciones clínicas e incluso muerte que afectan a su hospedero. Stx es llamada así porque se identificó por primera vez en *Shigella dysenteriae*, es codificada por los genes *stx* ubicados en profagos lambdoides integrados en el cromosoma bacteriano. Hay dos formas principales de toxina antigénicamente distintas, Stx1 y Stx2. Mientras que Stx1 es homogénea, existen numerosas variantes de Stx2; sin embargo, ambas

comparten aproximadamente el 60% de homología a nivel de ADN y aminoácidos, pero son inmunológicamente distintas (Bergan et al. 2012).

Las toxinas Shiga pertenecen al tipo de toxina AB₅ que consisten de una subunidad A enzimáticamente activa unida de forma no covalente a un pentámero de subunidades B, responsables de la unión con el receptor Gb3 (Figura 4) (Fraser et al. 2004). Después de la unión con el receptor se internaliza en las células, viajan a través de endosoma tempranos y luego se dirigen hacia la red trans-Golgi. Durante esta primera etapa, la subunidad A se escinde por una furina en una subunidad A1 activa y un fragmento A2 asociado con el pentámero B (Garred et al. 1995). El complejo de toxina activada se transporta a través de la vía retrógrada al aparato de Golgi, el retículo endoplásmico (ER) y la membrana nuclear. StxA1 se retro-transloca al citoplasma, donde se une a la subunidad ribosómica grande e inhibe la síntesis de proteínas al escindir un solo residuo de adenina del ARNr 28S. Si bien la inhibición de la síntesis de proteínas en sí misma no mata a la célula huésped, desencadena una respuesta al estrés ribotóxico que finalmente conduce a la apoptosis (Figura 4) (Schuller 2011).

El epitelio intestinal humano representa el primer punto de contacto de Stx con el huésped y actúa como una barrera al evitar el acceso de toxinas a la circulación sistémica (Bjork et al. 1987). Después de que Stx se libera en la luz intestinal, tiene que atravesar el epitelio intestinal que forma una barrera tensa para evitar la entrada de contenido luminal en el tejido subyacente. El mecanismo de este proceso sigue sin estar claro ya que no hay modelos animales apropiados disponibles para estudiar este aspecto de la infección por EHEC (Schuller 2011).

La citotoxicidad de Stx está fuertemente asociada con la cantidad de Gb3 expresada en la superficie celular y con la asociación de balsas lipídicas que contienen alto contenido de colesterol. Se ha demostrado que la expresión diferencial de isoformas de Gb3 con respecto a la longitud de la cadena de ácido graso, la hidroxilación y el grado de saturación afecta la unión de Stx y el transporte intracelular (Kiarash et al. 1994). El transporte de la toxina Stx puede

llevarse a cabo de dos formas, dependiendo de la sensibilidad de la célula huésped (Schuller 2011). El transporte retrógrado de Stx puede ocurrir al ER y al núcleo y esto se ha relacionado con la citotoxicidad, ya que el tráfico de toxinas es diferente en las células resistentes a Stx (Figura 4). Por ejemplo, en los macrófagos y las células dendríticas, Gb3 no se asocia con las balsas lipídicas y Stx se transporta a lo largo de la vía endosómica/lisosómica y finalmente es degradada en los lisosomas (Falguieres et al. 2001). La resistencia del epitelio intestinal bovino a Stx es debido a la ausencia de Gb3 en el endotelio y contribuye al estado asintomático del ganado durante la infección por EHEC (Figura 4) (Pruimboom-Brees et al. 2000).

Los efectos sistémicos de Stx sobre las células endoteliales vasculares resultan en vasculitis desencadenando una cascada inflamatoria que causa la agregación de leucocitos, la apoptosis de las células afectadas, la agregación plaquetaria, la formación de microtrombos y la hemólisis (Wasey and Salen 2019), resultando en complicaciones clínicas como: síndrome urémico hemolítico, púrpura trombocitopénica trombótica, anemia hemolítica, daño renal y en ocasiones la muerte (Lee and Tesh 2019).

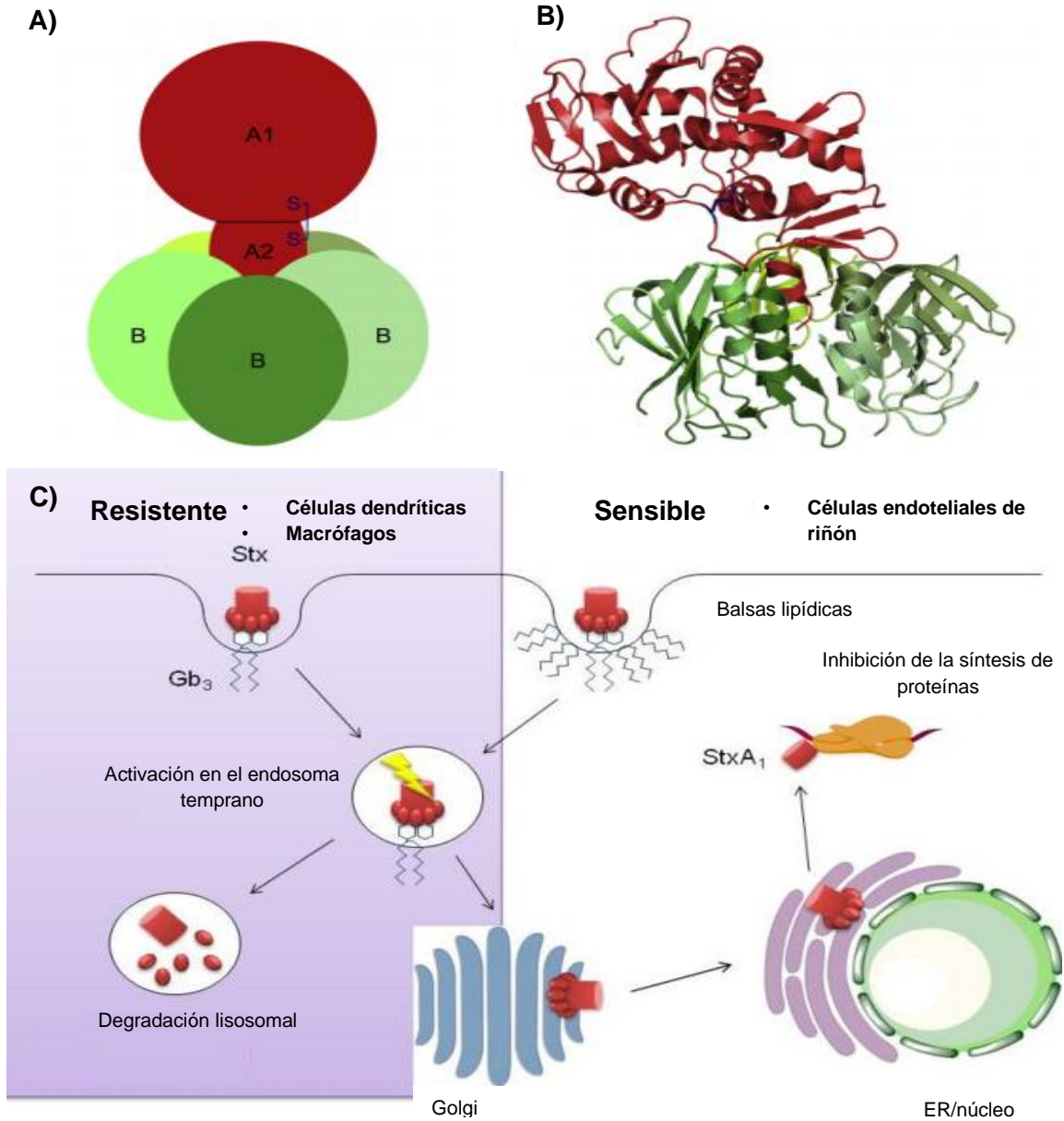


Figura 4. Esquema de la toxina Shiga y su transporte intracelular en células resistentes y sensibles.

(A) Representación de la estructura tipo AB₅ de la toxina Shiga. (B) Estructura de la toxina Shiga determinada por cristalografía de rayos-X (Fraser et al. 1994) (PDB ID: 1DM0). La subunidad A se muestra en color rojo, las cinco subunidades B se muestran en verde, y el puente disulfuro que une los fragmentos A1 y A2 se muestra en azul. (C) Representación del transporte intracelular de la toxina Shiga en células sensibles y resistentes. Tomado y modificado de (Bergan et al. 2012; Schuller 2011)

1.4 Mecanismo de patogenicidad de EHEC

El ganado bovino es un reservorio importante de EHEC, pero a diferencia de los humanos, la colonización en rumiantes adultos es asintomática por lo que es impermeable a los efectos de la toxina Shiga (Nguyen and Sperandio 2012). El ganado bovino transmite EHEC a los humanos al sacar al patógeno en sus heces. Una vez arrojados al medio ambiente, los humanos adquieren EHEC consumiendo productos contaminados derivados de bovinos como carne y productos lácteos; o a través de agua, bebidas de manzana no pasteurizadas o vegetales contaminados con el patógeno (Nguyen and Sperandio 2012). El contacto directo con rumiantes en zoológicos, mascotas o mediante interacciones con personas infectadas dentro de familias, guarderías e institutos de atención médica representan otra fuente de transmisión de EHEC (Nguyen and Sperandio 2012).

La patogénesis resulta de la adherencia de EHEC a las microvellosidades de las células epiteliales intestinales del colon. Para esto, expresa una multitud de factores de superficie que incluyen adhesinas fimbriales y no fimbriales que contribuyen a la interacción inicial con la mucosa del huésped (Donnenberg 2013). Una de las principales adhesinas de EHEC es Intimina la cual interactúa de manera específica con su receptor Tir que es translocado por el SST3 dentro de la célula hospedera (Figura 5) (Nguyen and Sperandio 2012). Una vez liberado en el citoplasma del huésped, Tir se dirige a la membrana citoplasmática del huésped y se inserta como una estructura en forma de horquilla, con sus extremos amino y carboxilo terminal inmersos en el citoplasma y el dominio central expuesto a la superficie celular. Éste último interactúa con Intimina para establecer una interacción íntima con la célula eucariota, tal interacción y la participación de EspFu (efector translocado por el SST3) desencadenan rearrreglos en el citoesqueleto (Figura 5). EspFu recluta la proteína del síndrome Wiskott-Aldrich (N-WASP), el sustrato receptor de insulina tirosina quinasa p53 (IRSp53) y diversas proteínas del citoesqueleto. El resultado final es la formación de

estructuras en forma de copa o pedestal que consisten en la acumulación de actina polimerizada justo por debajo del sitio donde EHEC se adhiere, las cuales le permiten a este patógeno sellar una interacción íntima con su hospedero y además mantenerse alejado de la microbiota intestinal (Figura 5) (Nguyen and Sperandio 2012).

Los genes *stx* se encuentran codificados en fagos integrados en el cromosoma, que, al ser inducidos (inducción ligada a una respuesta SOS por daño en el ADN) producen la transcripción de dichos genes y la síntesis de la toxina. La toxina Shiga se propaga a través del torrente sanguíneo y para ello debe de atravesar la barrera intestinal. Aún no se comprende por completo como ocurre el tránsito de la toxina Stx a través de los enterocitos asociados a folículos linfoides, ya que éstos aumentan la probabilidad de que pueda interactuar la toxina Stx con las células M que están especializadas en translocar antígenos de la luz intestinal al torrente sanguíneo. Una vez administrada la Stx en el folículo linfoide asociado al intestino, el antígeno translocado interactúa con macrófagos y células dendríticas, es decir, células capaces de procesar y presentar antígenos para la activación de la inmunidad adaptativa. La activación de los macrófagos, a su vez, produce la infiltración de neutrófilos y monocitos que pueden exacerbar aún más el daño tisular, además, pueden actuar como células “transportadoras” para llevar toxinas en el torrente sanguíneo lo que provoca daño a células endoteliales (Figura 5) (Lee and Tesh 2019).

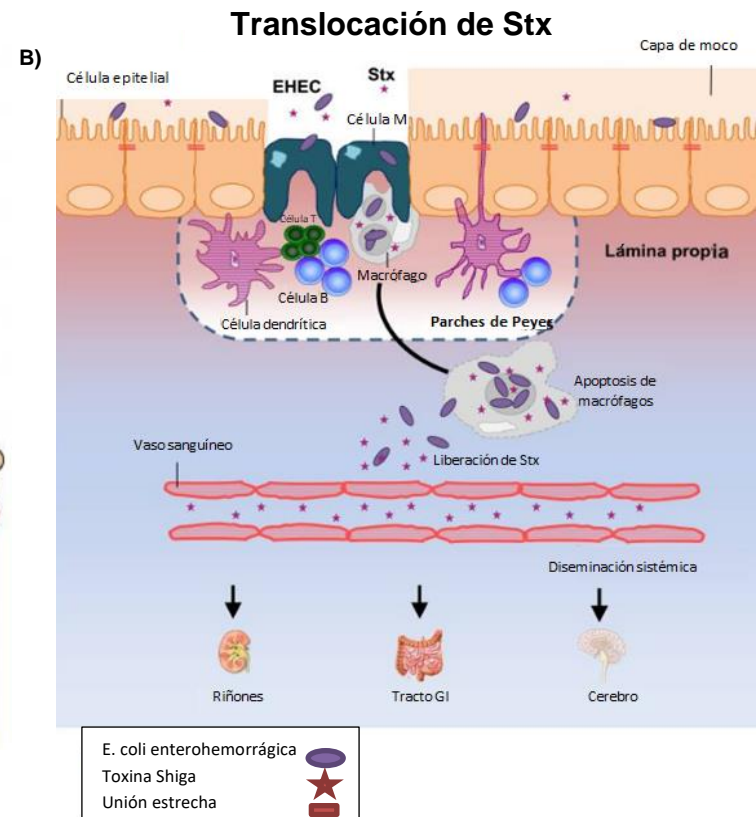
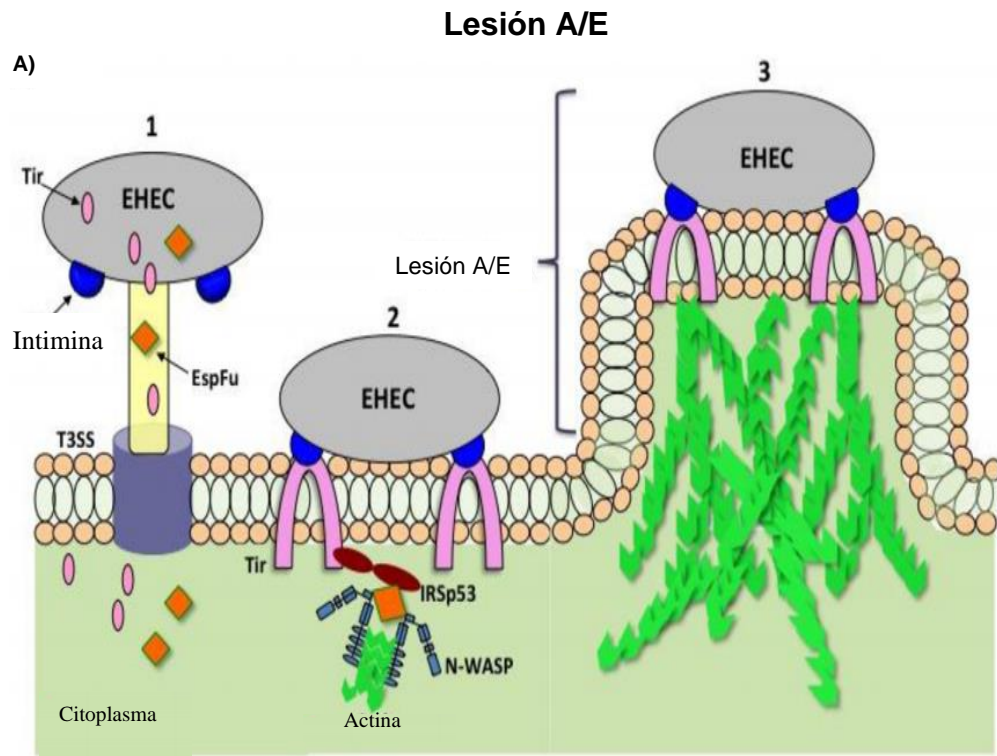


Figura 5. Esquema del mecanismo de patogenicidad de EHEC.

(A) EHEC inyecta proteínas efectoras como Tir y EspFu en el citoplasma del huésped a través del SST3. Tir se localiza en la membrana del huésped y se une a la Intimina para unir íntimamente la bacteria a la célula. Tir y EspFu reclutan factores del huésped para subvertir el citoesqueleto del huésped y la polimerización de actina. Tomado y modificado de (Nguyen and Sperandio 2012). B) Se muestra un esquema de la monocapa de células epiteliales intestinales infectadas por EHEC. Las bacterias atraviesan la barrera intestinal a través de las células M. En la lámina propia, las células entran, sobreviven y producen Stx dentro de los macrófagos residentes. Tras la replicación de bacterias en macrófagos, la producción extensa de Stx induce la muerte de la célula huésped. Posteriormente, Stx liberado podría atravesar los vasos sanguíneos para llegar a los riñones, el intestino y el cerebro. Tomado y modificado de (Etienne-Mesmin et al. 2011).

2. ANTECEDENTES

2.1 Antecedentes generales

Las biopelículas se definen como agregados de microorganismos en donde las células están frecuentemente embebidas en una matriz auto-producida de sustancias poliméricas extracelulares que favorecen la adherencia entre ellas o sobre una superficie (Figura 6) (Watters et al. 2016). Pueden formarse sobre una amplia variedad de superficies, incluidos tejidos vivos, dispositivos médicos, tuberías de sistemas de agua potable o sistemas acuáticos naturales (Garnett and Matthews 2012) .

Representan una de las formas de vidas más exitosas y ampliamente distribuidas sobre la Tierra y son responsables de conducir procesos biogeoquímicos importantes para el mantenimiento de la vida de todos los organismos (Garnett and Matthews 2012).

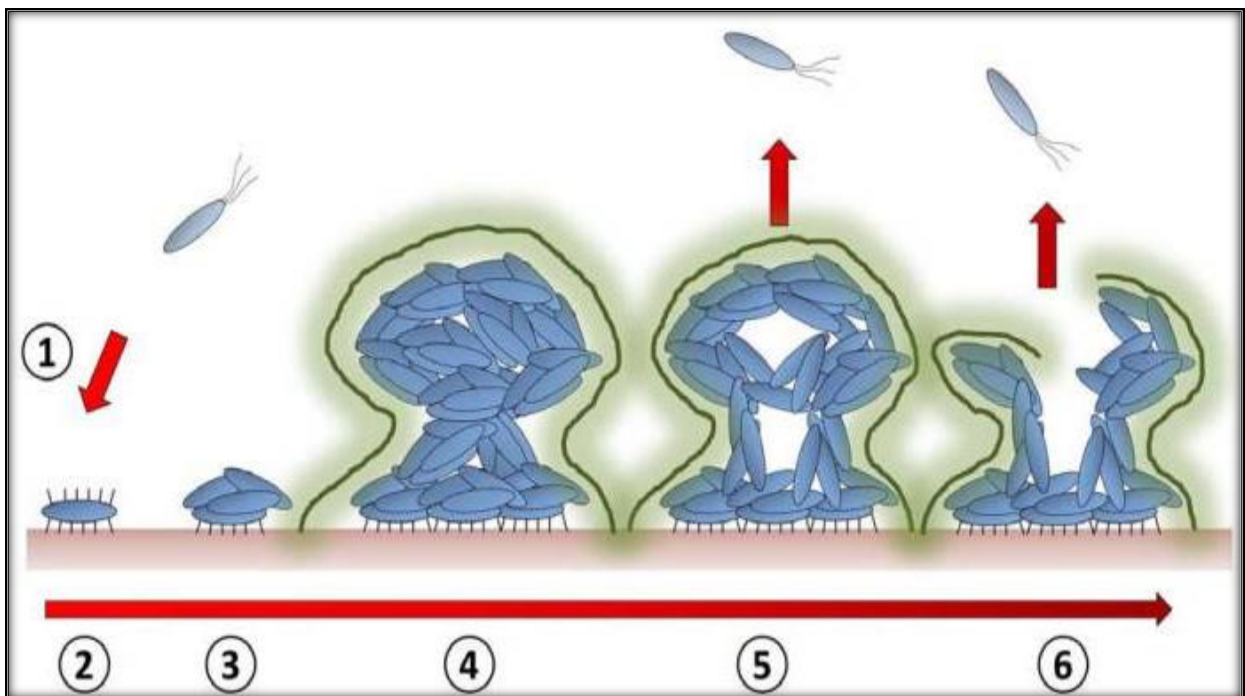


Figura 6. Ciclo de vida de la biopelícula.

Las bacterias de vida libre (1), se adhieren a una superficie usando adhesinas exhibidas en la superficie celular (2), las bacterias comienzan a dividirse y la expresión de macromoléculas adicionales les permite unirse en pequeñas microcolonias (3). A medida que estas colonias crecen, comienzan a secretar una mezcla compleja de carbohidratos, proteínas y lípidos que encapsulan a las bacterias (4). Esta matriz de biopelícula proporciona protección y estabilidad para la biopelícula que madura, cuando la biopelícula alcanza la madurez, varios factores habrán desarrollado una disposición heterogénea de células y moléculas dentro de la biopelícula y dado lugar a cavidades y canales llenos de solvente (5). Esto puede conducir a la dispersión de las células de la masa celular. A la señal del medio ambiente (acumulación de residuos o demanda de nutrientes), se liberan moléculas que causan lisis celular y diseminación de la matriz. Muchas células planctónicas ahora se liberan y pueden encontrar un nuevo hábitat (6) (Garnett and Matthews 2012).

Las biopelículas son sistemas complejos que están conformados por un gran número de células (10^8 a 10^{11} células por gramos de peso seco) y comprende una amplia variedad de especies. Además, las células se encuentran recubiertas de una matriz extracelular compuesta principalmente de polisacáridos, proteínas, lípidos y DNA extracelular. Su formación es un proceso altamente dinámico y depende de la disponibilidad de nutrientes, síntesis y secreción de material extracelular, estrés y competencia con otros microorganismos. Estas estructuras tienen un tremendo impacto en la salud pública y la seguridad alimentaria. En la industria de la carne, las biopelículas siguen siendo una gran preocupación porque muchos patógenos transmitidos por alimentos, pueden formar biopelículas que son difíciles de desinfectar adecuadamente y, además, son más tolerantes a la desinfección que sus contrapartes planctónicas (Watters et al. 2016).

Todos los organismos superiores, incluyendo, humanos, son colonizados por microorganismos que forman biopelículas, los cuales están asociados con infecciones persistentes en plantas y animales, así como con la contaminación de aparatos médicos e implantes. Al respecto, existen patógenos con una gran capacidad para formar biopelículas como *Staphylococcus aureus*, un patógeno oportunista en humanos, en gran parte debido a la producción de enterotoxinas a temperaturas entre 10 y 46°C. Esta especie puede multiplicarse en la mucosa, piel y también puede formar biopelículas tanto en superficies bióticas y abióticas, así

como a lo largo de la cadena de producción de alimentos, un problema importante para las fábricas dedicadas a esto (Giaouris et al. 2015). Otro patógeno con esta gran habilidad es *Salmonella entérica* que es transmitido por alimentos causando gastroenteritis o septicemia. La carne de aves de corral es un reservorio común para estas bacterias en los alimentos procesados, su importancia como patógeno alimentario queda demostrada por el hecho de que la formación de biopelículas en las superficies de los alimentos fue la primera reportada (Duguid et al. 1966). *S. entérica* puede crecer sobre superficies de acero inoxidable, lo que da como resultado una estructura en 3D con varias capas de células que pueden presentar diferentes morfologías según los nutrientes disponibles. De particular importancia es que en ambientes secos, *S. entérica* puede sobrevivir en una biopelícula sobre acero inoxidable durante más de un año (Morita et al. 2011).

Existen diversas estructuras ubicadas en la superficie de las bacterias como las fimbrias, flagelos, adhesinas no fimbriales, cápsulas, etc; que representan elementos esenciales relacionados con su capacidad para adherirse sobre las superficies y formar biopelículas (Watters et al. 2016). En este sentido, existe un grupo de proteínas que son secretadas a través del SST1 presentes en una gran variedad de patógenos Gram-negativos y que cumplen diversas funciones que incluyen, desde adhesinas asociadas a células hasta toxinas secretadas. El ejemplo más estudiado de adhesinas no fimbriales secretadas a través del SST1 es Bap (biofilm associated protein), un grupo de proteínas multidominio de alto peso molecular que contienen un dominio central de unidades repetidas de larga longitud y secuencia variable (Figura 7). La familia Bap cuentan con características estructurales comunes: 1) están presentes en la superficie de la bacteria, 2) muestran un alto peso molecular, 3) contienen un dominio central de repeticiones en tándem, 4) confieren a las bacterias la capacidad de formar una biopelícula, 5) desempeñan un papel relevante en los procesos infecciosos bacterianos y 6) ocasionalmente se encuentra en elementos genéticos móviles (Yousef and Espinosa-Urgel 2007).

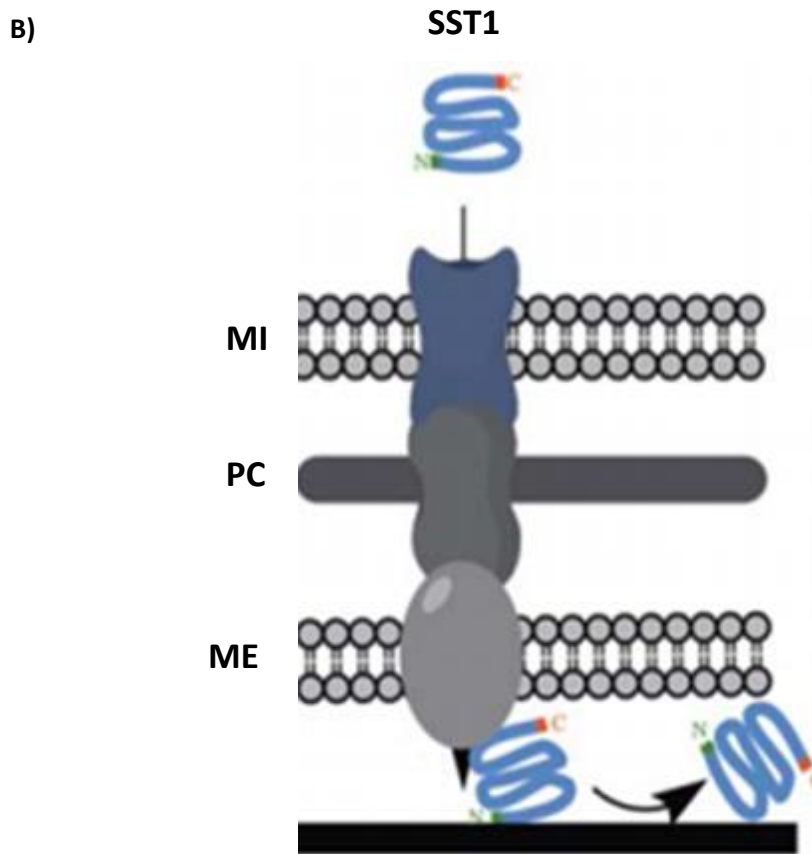
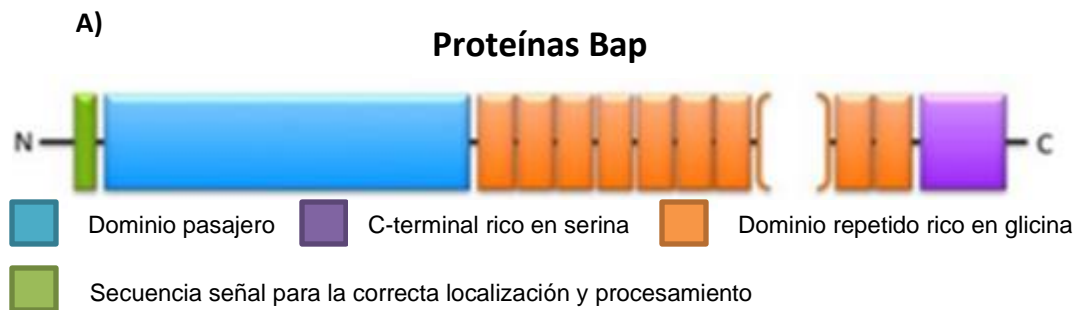


Figura 7. Organización general de Bap y el SST1.

A) Organización general de dominios identificados en miembros de la familia Bap. Se muestra en código de colores cada uno de los dominios contenidos en las proteínas Bap. B) Organización del SST1. En el SST1 la adhesina se exporta directamente desde el citoplasma al medio extracelular a través de un poro compuesto de tres proteínas. Abreviaturas, MI, membrana interna; PC, pared celular; ME, membrana externa. Tomado y modificado de (Berne et al. 2015).

Bap fue inicialmente identificada en *Staphylococcus aureus* mediante mutagénesis por transposón, está formada por 2276 aminoácidos y contiene una secuencia señal amino terminal presente en Gram positivas para la secreción extracelular (primeros 44 aa), un segmento C-terminal que contiene un motivo LPXTG y una serie de residuos cargados positivamente típicos de las proteínas de superficie ancladas a la pared celular de bacterias Gram-positivas (Navarre and Schneewind 1994). Su presencia está asociada a cepas causantes de mastitis bovina y a la capacidad para producir biopelículas altamente adherentes (Cucarella et al. 2001). Latasa et al., en 2005 identificaron en *Salmonella entérica* 2 ORFs que codifican proteínas con homología a Bap de *S. aureus*. El primero, *bapA* exhibe homología con una gran familia de exoproteínas con dominios RTX repetitivos (repeats in toxin), implicados en la adhesión y virulencia. Contiene tres repeticiones VCBS en el extremo C-terminal, es un dominio de aproximadamente 100 residuos que se encuentra en múltiples copias en proteínas largas de varias especies de *Vibrio*, *Colwellia*, *Bradyrhizobium* y *Shewanella* (de ahí el nombre VCBS), además de encontrarse en varias proteínas grandes aparentemente relacionadas con funciones de adhesión. Cepas mutantes en *bapA* mostraron la pérdida de la capacidad de formar biopelícula, mientras que la sobreexpresión de este gen aumentó la formación de biomasa de biopelículas. Además, una cepa mutante de *bapA* muestra una tasa de colonización significativamente más baja en la barrera celular intestinal y, en consecuencia, una eficiencia disminuida para la invasión de órganos en comparación con la cepa de tipo silvestre (Latasa et al. 2005).

BapA se secreta a través de un sistema de secreción tipo I (BapBCD) situado “rio” abajo del gen *bapA*, SST1 está débilmente asociado con la superficie celular. Además, experimentos con poblaciones bacterianas mixtas positivas y negativas para BapA mostraron que las células deficientes en BapA no se reclutan en la matriz de la biopelícula (Latasa et al. 2005).

El segundo gen *siiE*, tiene una longitud de 16680 pb y codifica para la proteína más grande (595 kDa) codificada por *S. Typhimurium*. La secuencia comprendida

entre los aminoácidos 1263-3374 de la región central contiene 6 repeticiones BNR (bacterial neuraminidase repeat), generalmente encontradas en glicosil hidrolasas. SiiE también posee dos dominios FN3 (fibronectina tipo 3), que se unen a una amplia variedad de ligandos (Skorstengaard et al. 1986). Además, la región central contiene repeticiones con homología a la secuencia consenso característica de las exoproteínas RTX (Coote 1992). No obstante, la eliminación de *siiE* en esta cepa no provocó ninguna alteración en la formación de biopelícula, lo que sugiere que aunque *siiE* también codifica una proteína que presenta homología con la proteína Bap y se ha implicado en la colonización del hospedador, no está fuertemente involucrado en la formación de biopelículas como BapA (Latasa et al. 2005). Por otra parte, otro grupo demostró el papel de esta proteína en la adhesión al establecer que SiiE actúa en el primer contacto con la célula huésped uniéndose de manera similar a la lectina (Barlag and Hensel 2015).

SiiE es una molécula lineal con una longitud de 175 ± 5 nm que es suficiente para sobresalir la capa LPS de la membrana externa, el resto C-terminal media el primer contacto con la membrana apical de la célula huésped y esta función puede permitir el posicionamiento adecuado del SST3 que expresa *Salmonella* en el proceso de infección (Barlag and Hensel 2015). Tales aportaciones sobre esta proteína indican que la familia Bap son un grupo de adhesinas que están involucradas no solo en las interacciones célula-superficie sino también en la adhesión célula-célula (Barlag and Hensel 2015).

En EHEC O157:H7 el papel de Bap en la adherencia y formación de biofilm está siendo analizado en el laboratorio por el grupo del Dr. Girón, estudios preliminares identificaron un gen putativo similar a miembros de la familia Bap, una mutante por delección de este gen no afecta el desarrollo de biopelículas pero sí disminuye la capacidad de adherencia de EHEC sobre un cultivo de células epiteliales. La cuantificación de las bacterias unidas a las células confirmó que EHEC Δbap se adhirió un 62% menos que la cepa de tipo silvestre, esta reducción en la adherencia es significativa teniendo en cuenta que EHEC produce muchas otras

adhesinas fimbriales y no fimbriales (Figura 8). Asimismo, ensayos de RT-qPCR indicaron que la expresión de *bap* es 7 veces mayor cuando EHEC es cultivada en medio DMEM respecto de cuando es cultivada en medio LB a 37°C (Figura 8). Sin embargo, en presencia de células HeLa la expresión de *bap* es 15 veces mayor que en medio LB y 2 veces mayor que en DMEM. Estos datos sugieren que *bap* se expresa durante la colonización en el intestino.

Por otra parte, el papel de Bap de EHEC también fue evaluada en la adherencia y colonización sobre hojas de espinaca, experimentos cuantitativos realizados por el mismo grupo de trabajo revelaron que mutantes deficientes en *bap* se adhieren 32% menos a las hojas de espinaca a diferencia de EHEC WT, indicando que Bap es requerida también para la colonización sobre hojas de espinaca.

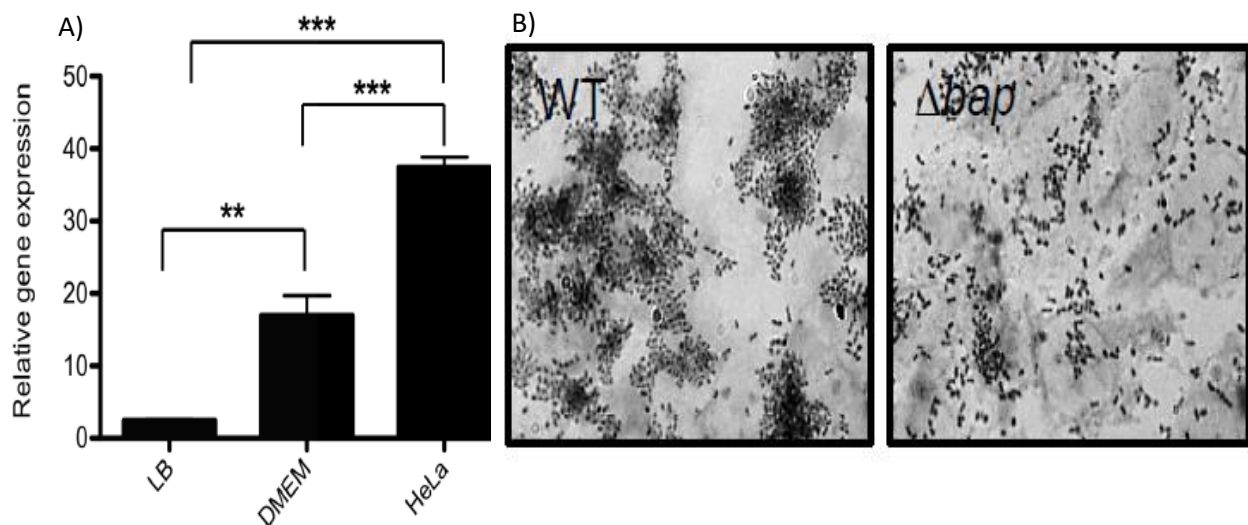


Figura 8. Papel de Bap en la adherencia de EHEC sobre células epiteliales.

A) RT-qPCR de *bap* en EHEC EDL933 crecida en los medios LB y DMEM y sobre un cultivo de células HeLa. El ARN se usó en ensayos de RT-qPCR para medir la transcripción de *bap*. Estadísticamente significativo ***($p < 0.001$); **($p < 0.01$). B) Ensayo de adherencia de EHEC WT y EHEC $\Delta bapA$ sobre células HeLa. Las células HeLa se infectaron con la cepa EDL933 WT y la cepa EDL933 $\Delta bapA$ (MOI 50, 4 h). Después de la incubación, las células se lavaron y se prepararon para la tinción con Giemsa. Girón et al., Datos no publicados.

Tales datos preliminares sugieren que Bap es otro miembro de la familia de adhesinas de EHEC con especificidad para células humanas y vegetales que contribuyen a la persistencia en diversos ambientes dentro y fuera del huésped humano. Sin embargo, se requieren más estudios moleculares que permitan analizar la expresión de la proteína Bap y corroborar su papel en la adherencia, formación de biofilm y desarrollo de la enfermedad causada por EHEC.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

E. coli enterohemorrágica O157:H7 es un patógeno de gran importancia médica causante de enfermedades gastrointestinales en seres humanos a nivel mundial. La enfermedad se caracteriza por diarrea sanguinolenta que suele desaparecer sin complicaciones en la mayor parte de los casos. Sin embargo, aproximadamente 5 a 7% de los pacientes desarrollan una complicación conocida como síndrome urémico hemolítico (SUH). SUH es la secuela más seria de la infección por esta bacteria y su incidencia es más alta en niños y ancianos; contribuye al 5% de la mortalidad que se presenta en pacientes infectados por EHEC. La toxina Shiga es el principal factor de virulencia responsable de SUH aunque también contribuye al desarrollo de colitis hemorrágica debido a que provoca la lisis de las células endoteliales de la mucosa intestinal. La expresión y liberación de la toxina shiga forma parte de las etapas tardías del mecanismo de patogenicidad de EHEC, pero para que esto suceda primero la bacteria requiere adherirse de manera específica sobre la célula epitelial. Al respecto, se han descrito una gran diversidad de adhesinas, SST3, flagelos y proteínas de membrana en EHEC responsables de la adhesión y que contribuyen al establecimiento y desarrollo de la enfermedad.

En *S. aureus*, *S. enterica* y otros patógenos importantes se ha identificado una nueva familia de adhesinas llamada Bap, con miembros involucrados en adherencia, invasión y formación de biofilm. EHEC O157:H7 contiene en su genoma un gen con homología a esta familia de proteínas, estudios preliminares con una cepa mutante de este gen sugieren que tiene un papel muy importante en la adherencia de esta bacteria sobre células epiteliales incluso mayor que las principales adhesinas previamente identificadas. Sin embargo, el análisis de la proteína y su función en la adherencia no ha sido analizado en detalle. Por lo anterior, en este trabajo nuestro interés se centró en generar anticuerpos para la detección de Bap con la finalidad de generar información sobre el papel de esta proteína en la adherencia y el desarrollo de la enfermedad generada por EHEC. El conocimiento de los factores de virulencia que están implicados en las etapas tempranas de la infección por EHEC es de gran importancia debido a que permite diseñar estrategias terapéuticas que bloqueen dichas etapas y evitar las consecuencias fatales de la enfermedad.

4. HIPÓTESIS

El papel de la proteína Bap como una nueva adhesina de EHEC puede ser evaluado mediante la generación de anticuerpos policlonales que permitirán detectar las condiciones de expresión de la proteína así como su función en la adherencia y desarrollo de la enfermedad.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Estudiar el papel de la proteína Bap de EHEC mediante la generación de anticuerpos policlonales para identificar las condiciones de expresión de la proteína así como su función en la adherencia y desarrollo de la enfermedad.

5.2 Objetivos particulares

- Analizar mediante herramientas bioinformáticas la secuencia de Bap de EHEC.
- Clonar la región VCBS de *bap* de EHEC en el vector pBAD/Myc-His A.
- Expresar y purificar la proteína Bap(4696-4826)-6XH a partir de un vector de expresión en una cepa de *E. coli*.
- Generar anticuerpos policlonales contra la proteína Bap(4696-4826)-6XH.
- Evaluar las condiciones de expresión de Bap y su papel en la adherencia.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 3. Las cepas se cultivaron de forma rutinaria en medio Luria-Bertani (LB) que contiene peptona de caseína (1%), extracto de levadura (0.5%) y cloruro de sodio (1%), a 37°C en un baño de agitación a 220 rpm. Para los ensayos de formación de biopelícula, las cepas bacterianas se crecieron en Medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco-BRL Life Technologies, Grand Island, N.Y) que contiene glucosa (0.45%) y L-glutamina (584 mg); adicionado con 1% de LB a 37°C en condiciones estáticas. A los medios se les agregó ampicilina (100 mg/ml) o arabinosa (0.2%) según fuera requerido.

Tabla 3. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Cepa	Características	Referencia
EHEC EDL933	Cepa silvestre de EHEC O157:H7.	Riley et al.,1983
EAEC 042	Cepa silvestre de EAEC O44:H18	Okeke and Nataro, 2001
EPEC E2348/69	Cepa silvestre de EPEC O127:H6	J.B. Kaper
<i>E. coli</i> DH5 α	Cepa no patógena de <i>E. coli</i> con el genotipo <i>F-80dlacZM15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17 (rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA.</i>	Woodcock et al.,1989
<i>E. coli</i> BL21 TUNER	Mutante por delección BL21 <i>lacZY</i> ; permite el control preciso con IPTG. Y tiene el Genotipo <i>F- ompT hsdSB (rB-mB-) gal dcm lacY1(DE3)</i>	NOVAGEN

<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Cepa no patógena de <i>E. coli</i> con el genotipo <i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHlo ΔEcoRI-B int::(lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i> , deficiente en proteasas usada para producir eficientemente proteínas recombinantes.	New England Biolabs
Plásmidos	Características	Referencia
pBAD/Myc-His A	Plásmido optimizado para su expresión en <i>E. coli</i> regulado por el promotor <i>araBAD</i> . Contiene un sitio de multiclonación con diversos sitios de restricción para varias de las principales enzimas del mercado. También contiene fusionados el epítotope Myc y una etiqueta de 6 histidinas en el C-terminal. ApR	Thermo Fisher Scientific
pBap(4696-4826)EH	Construcción generada al clonar una región VCBS del <i>orfZ0615</i> comprendida de los aminoácidos 4696-4826 con una secuencia que codifica 6 histidinas de pBAD/Myc-His A, en los sitios <i>NcoI</i> y <i>HindIII</i> . ApR	Este trabajo

6.2 Manipulación de DNA

Las manipulaciones del DNA fueron realizadas de acuerdo a protocolos estándar de biología molecular (Sambrook and Russell 2001). Las enzimas fueron obtenidas de Thermo Fisher Scientific y usadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos utilizados en ensayos de PCR, indicados en la tabla 4, fueron sintetizados en la empresa T4 oligo.

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este estudio.

Nombre	Secuencia 5' a 3'	Descripción	Referencia
BAPIFN	gtt ccatgg ccgctatgagcagcagcgtttc	Amplifica la región VCBS del <i>orf Z0615</i> , usados para clonar en pBAD, se indican los sitios de restricción <i>Nco</i> I y <i>Hind</i> III junto con un sitio codificante para 6 histidinas en el rv	Este trabajo
BAPIRN	gcgta aagctt cgactgtttggacaccagcac		
pBADfw	atgcatagcattttatcc	Amplifica la región de multiclonación del vector pBAD para caracterizar a las clonas.	Thermo Fisher Scientific
pBADrv	tctgattaatctgtatcagg		

6.3 PCR punto final

La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó con el kit “DreamTaq Green PCR Master Mix” (2X) (Thermo Fisher Scientific), los oligonucleótidos se utilizaron a una concentración de 0.5 μ M, ~1 μ g de DNA cromosomal y ~100 ng de DNA plasmídico. La reacción se realizó en un termociclador “Veriti 96-well” (Applied Biosystems), bajo las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial	10 min a 95 °C	} 35 ciclos
Desnaturalización	1 min a 95 °C	
Alineamiento	T ^o m de oligonucleótido	
Extensión	1 min a 72 °C	
Extensión final	10 min a 72 °C	

6.4 Electroforesis en gel de agarosa para la separación de DNA

Las muestras de DNA se mezclaron con buffer de carga (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 60% glicerol, 0.03% azul de bromofenol, 60 mM EDTA) y se cargaron en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (40 mM Tris, 19 mM Ácido Acético, 1 mM EDTA). Las muestras se separaron a 90 volts por 60-80 min, luego se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en un fotodocumentador de luz ultravioleta (Carestream Gel Logic 2200 PRO).

6.5 Extracción y purificación de DNA

6.5.1 Extracción de DNA genómico (DNAg)

La extracción de DNAg se realizó con el kit “Universal Quick-DNA MiniPrep kit” (ZYMO RESEARCH). Las cepas se cultivaron en 5 ml de medio LB, las células se concentraron a 12,000 rpm/2 min y al botón bacteriano se le agregaron 400 µl de buffer de lisis y se resuspendieron con vortex, se dejó incubar a temperatura ambiente (TA) por 10 minutos. El lisado se transfirió a una columna ensamblada en su tubo colector y se centrifugó a 12,000 rpm/1 min, se desechó el contenido del tubo, posteriormente se agregaron 200 µl de buffer de pre-lavado a la columna, se centrifugó nuevamente y se desechó el contenido del tubo. La columna se lavó con 500 µl de buffer de lavado, se centrifugó en las mismas condiciones y finalmente se pasó a un tubo de 1.5 ml, se agregaron 100 µl de buffer de elución a la matriz de la columna, se incubó por 5 min a TA y se centrifugó en las condiciones anteriores. El ADNg se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.5.2 Extracción de DNA plasmídico

Para la extracción de DNA plasmídico se utilizó el kit “Zyppy PlasmidMiniprep kit” (ZYMO RESEARCH). Las cepas se cultivaron en 5 ml de LB toda la noche y se concentraron las células en microtubos de 1.5 ml por centrifugación a 12,000 rpm/2 minutos. Posteriormente, se agregaron 100 µl de buffer de lisis 7x (color azul), se mezcló suavemente y se dejó incubando a temperatura ambiente 2 minutos. Una vez que se lisaron las células se agregaron 350 µl de buffer de

neutralización frío y se mezcló suavemente para después centrifugar a 12,000 rpm/4 min. Se transfirió el sobrenadante a una columna con su respectivo tubo colector y se centrifugó a 12,000 rpm/15 segundos desechando el sobrenadante. Se agregaron 200 µl de buffer de lavado Endo-Wash y se centrifugó 30 segundos a 12,000rpm descartando el sobrenadante. Se adicionó 400 µl de Zyppy™ Wash Buffer y se centrifugó a 12,000 rpm/1 minuto. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo limpio y se colocaron 50 µl de buffer de elución directamente sobre la columna para después incubar a 55°C durante 5 minutos y se centrifugó a 12,000 rpm/30 segundos. El DNA plasmídico fue almacenado a -20°C hasta su uso.

6.5.3 Purificación de fragmentos de DNA a partir de gel de agarosa

El estuche de reactivos utilizado en este procedimiento fue QIAquick® Gel Extraction Kit (QIAGEN). Fragmentos de DNA separados en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio fueron cortados en un transiluminador de luz UV y colocados en un tubo de 1.5 ml. Se agregaron 3 volúmenes del reactivo QG y se incubó a 50°C hasta homogenizar la banda cortada. Posteriormente se adicionó 1 volumen de isopropanol, se vortexeó y se transfirió a una columna con su correspondiente tubo colector para centrifugar durante a 12,000 rpm/1 minuto, descartando el sobrenadante. Después, se adicionó a la columna 750 µl de buffer PE y se centrifugó a 12,000 rpm/1 minuto y se descartó el sobrenadante. Finalmente, se eluyó el DNA en un tubo nuevo con 50 µl de buffer EB (10 mM Tris-cl, pH 8.5) y se centrifugó a 12,000 rpm. El DNA purificado se almacenó a -20°C.

6.6 Generación de células químicamente competentes por CaCl₂

A partir de un cultivo de toda la noche de la cepa de *E. coli* requerida, se inoculó en una proporción 1:100 en un matraz con 100 ml de medio LB con el antibiótico respectivo. Los cultivos fueron incubados a 37°C/220 rpm hasta llegar a una D.O.₆₀₀ de entre 0.4-0.6. Posteriormente, el cultivo se enfrió 10 minutos en hielo y se centrifugó a 6000 rpm/10 minutos a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió suavemente en 20 ml de regulador de

transformación frío (100 mM CaCl₂, 5 mM MgCl₂, 5 mM Tris-HCl; pH 7.5). Se concentraron las células por centrifugación como se mencionó anteriormente y se resuspendió nuevamente en 20 ml de regulador de transformación, se dejaron incubar 30 min en hielo. Las células se concentraron nuevamente por centrifugación y se desechó el sobrenadante. Finalmente, las bacterias se resuspendieron en 2 ml de regulador de transformación, se adicionó glicerol a una concentración final de 20% (v/v), se hicieron alícuotas de 50 µl y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

6.7 Transformación por choque térmico

A 50 µl de células químicamente competentes, se le agregaron 2 µl (~0.2 µg) de plásmido y se incubaron en hielo por 30 min. Se dio un choque de calor a 42°C por 2 minutos, después se incubó 5 min en hielo, se agregaron 200 µl de medio SOC (0.5% extracto de levadura, 2% triptona, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM MgSO₄, 0.4% glucosa) y se incubaron en agitación a 37°C/220 rpm por 1 h. Las células se concentraron por centrifugación a 6000 rpm durante dos minutos y se desecharon 100 µl del sobrenadante. Finalmente, se sembraron en una placa de agar LB suplementado con el antibiótico requerido y se incubaron a 37°C durante toda la noche.

6.8 Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Extractos proteicos o la proteína Bap(4696-4826)-6XH obtenidos del proceso de sonicación a 35% de amplitud, pulsos de 5 segundos de actividad con 5 segundos de descanso durante 10 minutos fueron mezclados con buffer Laemmli (50% Glicerol, 10% β mercaptoetanol, 4% SDS, 0.125M Tris-HCl pH 6.8, 0.004% bromofenol) y se hirvieron por 10 min. Se cargaron en un gel de poliacrilamida con buffer Tris-Glicina-SDS (Tris 0.025M, glicina 0.192M, SDS 0.1%). La electroforesis se hizo a 15 mA por 2 a 3 horas y se tiñeron con azul de Coomassie.

6.9 Construcción de pBap(4696-4826)EH

Para construir el plásmido pBap(4696-4826)EH, la secuencia de DNA que codifica para la región VCBS del *orfZ0615* (dominio conservado de *Vibrio*, *collwellia*, *Bradyrhizobium* y *Shewanella*) fue amplificada por PCR con los oligonucleótidos BAPIFN y BAPIRN, ocupando como molde DNAg de EHEC WT extraído con el kit “Universal Quick-DNA Mini Prep kit” (ZYMO RESEARCH). El fragmento amplificado fue purificado con el kit “QIAquick PCR purification Kit” (QIAGEN), a la par se purificó el vector pBAD/Myc-HisA con el kit “Zyppy Plasmid Mini prep kit” (ZYMO RESEARCH). Una vez purificados se prepararon reacciones para digerirlos usando las enzimas de restricción *NcoI* y *HindIII* (Thermo Fisher Scientific). Para cada digestión se utilizaron las condiciones recomendadas por la compañía, que consisten en la siguiente reacción:

Reactivo	FRAGMENTO DE PCR	Plásmido
DNA	28 μ l (~2.0 μ g)	20.5 (~1.5 μ g)
Buffer (10X)	3.5 μ l	2.5 μ l
<i>NcoI</i>	1 μ l	1 μ l
<i>HindIII</i>	1 μ l	1 μ l
H ₂ O	1.5	----
Total	35 μ l	25 μ l

La reacción se incubó a 37°C/2 horas

Las reacciones se corrieron en un gel de agarosa al 1%, las bandas se cortaron y se purificaron con el “QIAquick gel extraction Kit” (QIAGEN). Los productos de PCR y el vector, digeridos y purificados se ligaron con la T4 ligasa (Thermo Fisher Scientific) utilizando las siguientes cantidades:

Reactivo	Cantidad
PCR	2 μ l (~30 ng)
Vector	2 μ l (~30 ng)
Buffer 10X	1 μ l
T4 ligasa	0.3 μ l
H ₂ O	4.7 μ l
Total	10 μ l

La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante toda la noche.

La reacción de ligación se introdujo por transformación química en células competentes de *E. coli* DH5 α . Las clonas obtenidas se caracterizaron por PCR de colonia, para esto se prepararon reacciones de 10 μ l con la proporción de componentes que se indica a continuación:

Reactivo	Cantidad
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	5 μ l
Oligonucleótido delantero (pBADFw)	0.4 μ l (0.4 μ M)
Oligonucleótido reverso (pBADRv)	0.4 μ l (0.4 μ M)
H ₂ O	4.2 μ l
Total	10 μ l

Después se tomaron colonias candidatas al azar y se replicaron en una placa con agar LB y ampicilina, el resto de la colonia se inoculó en el tubo con la reacción de PCR. Los productos obtenidos fueron separados por electroforesis en gel de

agarosa y visualizados con bromuro de etidio, las clonas que amplificaron el fragmento del tamaño esperado fueron cultivadas en medio LB hasta llegar a una $D.O_{600}=0.5$ para ser almacenadas a $-80^{\circ}C$ en glicerol al 75%. Para saber si la región VCBS clonada del *orfZ0615* se expresaba correctamente y se encontraba en fase con las 6 histidinas, las construcciones candidatas fueron transformadas en BL21(DE3) y BL21(DE3) TUNER, las cepas con los plásmidos fueron cultivados en medio LB/ $37^{\circ}C$ hasta alcanzar un $D.O_{600} = 0.5$, se agregó 0.2% de arabinosa y se dejó incubando por 4 horas más. Las células fueron lisadas por sonicación a 35% de amplitud, pulsos de 5 segundos de actividad con 5 segundos de descanso durante 10 minutos y el extracto total fue procesado para western blot usando la sonda His Probe HRP (Thermo Fisher Scientific), para identificar la etiqueta de histidinas. Para finalizar se seleccionó una construcción que expresó la proteína del tamaño esperado. La región clonada fue secuenciada por el método de Sanger en el Centro de Detección Biomolecular para confirmar su identidad.

6.10 Sobreexpresión y purificación de la proteína Bap(4696-4826)-6XH

La cepa BL21(DE3) Tuner o DH5 α portando el pBap(4696-4826)EH fue cultivada en 3 ml de medio LB con ampicilina e incubadas a $37^{\circ}C$ en agitación toda la noche. Al día siguiente, se subcultivó en una proporción de 1:100 en 1 L de medio LB suplementado con ampicilina y se incubó a $37^{\circ}C$ en agitación, al llegar a una $D.O_{600} = 0.5-0.6$ se agregó 0.2% de arabinosa y se dejó incubar por 4 horas más. El cultivo se concentró por centrifugación a 8000 rpm durante 15 min a $4^{\circ}C$ y el botón bacteriano se resuspendió en 5 ml de urea (8M, pH 8). Las células fueron lisadas por sonicación a 35% de amplitud, pulsos de 5 segundos de actividad con 5 segundos de descanso durante 10 minutos y se centrifugó para separar el extracto proteico del resto del contenido celular.

La purificación de la proteína se hizo por cromatografía de afinidad empleando 3 ml de resina de níquel "Ni-NTA Agarose" (Invitrogen), el extracto proteico se colocó en una columna de purificación y se dejó interactuando con la resina de níquel por 2 horas en frio y en agitación, después se dejó pasar el contenido a

través de la columna y se recuperó en un tubo cónico de 50 ml, esta fracción fue llamada “fracción no unida”. Posteriormente, se hicieron lavados con 100 ml de urea 8M pH 6.5 para eliminar interacciones inespecíficas y fueron colectadas en tubos cónicos de 50 ml. Finalmente, la proteína se eluyó de la resina con 50 ml de urea 8M pH 4.5, se recuperaron las fracciones proteicas y se guardaron a -80°C hasta su uso. Este procedimiento se realizó con 7 litros LB en distintas ocasiones.

6.11 Diálisis y concentración de la proteína Bap(4696-4826)-6XH

La diálisis de la proteína purificada de Bap(4696-4826)-6XH se hizo con una membrana de diálisis “Spectra/Por®” MWCO: 6-8,000, en la cual se adicionaron los 50 ml de la proteína purificada y se sumergió en 500 ml de PBS 1X frío, se dejó dializar en agitación a 4°C con cambios de PBS 1X cada 2 h en tres ocasiones, esto con la finalidad de intercambiar la urea por PBS 1X y favorecer la re-naturalización de la proteína a sus condiciones nativas.

Una vez finalizado el proceso de diálisis, se colocó la membrana con la proteína dializada sobre un recipiente con azúcar convencional de mesa (sacarosa) hasta que el PBS 1X fuera absorbido por el azúcar y la proteína se concentrara en un volumen aproximado de 3 ml. Para finalizar, la proteína fue alicuotada y almacenada a -20°C.

6.12 Secuenciación de la proteína Bap (4696-4826) por Espectrometría de masas

Para la identificación de la proteína Bap(4696-4826)-6XH fue necesario la secuenciación por Espectrometría de masas debido a que la proteína obtenida de la purificación y su análisis por western blot el peso molecular resultó ser el doble del esperado. Por esta razón, la proteína purificada se corrió y fue separada en un gel de poliacrilamida y las bandas del tamaño de 30 kDa fueron cortadas con base a las directrices para el análisis en Espectrometría de Masas, donde se obtuvieron bandas con tamaños de 1-3 mm de alto por 5-7 mm de ancho. Para cortar el gel se llevó a cabo en un cuarto cerrado, sin corriente de aire y se utilizó equipo de protección para evitar contaminación con queratina o cualquier otra proteína. Se

cortaron 2 bandas, las bandas se colocaron por separado en un microtubos de 1.5 ml estériles y se agregaron 50 μ l de agua grado biología molecular, las bandas fueron enviadas a la Plataforma de Descubrimiento en Proteómica en el Instituto de Investigaciones Clínicas de Montreal, Canadá.

6.13 Western blot

6.13.1 Western blot para la detección de Bap(4696-4826)-6XH

Para la detección de Bap(4696-4826)-6XH se corrió la proteína purificada o extractos totales de cultivos en las condiciones deseadas en un SDS-PAGE al 12% durante 2 horas a 15 mA. Una vez terminada la corrida, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Thermo Fisher Scientific) la cual previamente fue tratada en metanol durante 15 seg, posteriormente en agua por 15 seg y finalmente, a la par que el gel, en buffer de transferencia (48 mM Tris-base, 39 mM glicina, 0.045% SDS, 20% metanol) por 20 min. La transferencia se realizó en una cámara de semi-seca "TRANS-BLOT" (BIORAD) en la que se colocó papel filtro humedecido con buffer de transferencia, encima se colocó la membrana de PVDF, luego el gel y finalmente otro filtro. La transferencia se realizó a 15 volts por 45 min. Una vez terminada la transferencia, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau (Thermo Fisher Scientific) para corroborar que la transferencia se haya realizado. La membrana se bloqueó con leche (SVELTY) al 10% baja en grasa durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la membrana fue lavada 3 veces de 10 minutos cada uno con PBS-T (PBS1X, 0.5 M NaCl y 0.1% Tween) y se incubó con sonda o con los siguientes anticuerpos:

Anti-Bap	1:6000	(Este trabajo)
His-Probe HRP	1:5000	(Thermo Fisher Scientific)
Anti-GroEL	1:80000	(José Luis Puente IBT-UNAM)
Anti-conejo	1:2000	(José Luis Puente IBT-UNAM)

La incubación se realizó durante 2 horas en agitación, posteriormente la membrana se lavó nuevamente 3 veces con PBS-T y se agregaron los reactivos “Luminol enhancer solution” y “peroxide solution” (Thermo Fisher Scientific) en proporción 1:1, finalmente se realizó el revelado de la membrana sobre una película “Kodak X-Omat LS film”.

6.13.2 Western blot para la detección de Bap

Para analizar las condiciones de crecimiento de EHEC en las que se expresa la proteína Bap nativa, las cepas EHEC, EAEC y como control negativo EPEC y *E. coli* DH5 α fueron cultivadas en los medios LB y DMEM a 37°C en agitación a una D.O.₆₀₀= 0.8. De los cultivos se tomaron 3 ml, las células se concentraron por centrifugación y se resuspendieron en urea 8M y se sonicaron a 35% de amplitud, pulsos de 5 segundos de actividad con 5 segundos de descanso durante 10 minutos.

Los extractos proteicos se separaron mediante SDS-PAGE al 8% durante 3 horas a 15 mA. Una vez terminada la corrida, el gel se transfirió a una membrana de PVDF (Thermo Fisher Scientific) la cual previamente fue tratada en metanol durante 15 seg, posteriormente en agua por 15 seg y finalmente, a la par que el gel, en buffer de transferencia (48 mM Tris-base, 39 mM glicina, 0.045% SDS, 7% metanol) por 20 min. La transferencia se realizó en una cámara de transferencia húmeda (C.B.S. SCIENTIFIC DCX-700) en la que se colocó papel filtro humedecido con buffer de transferencia, encima se colocó la membrana de PVDF, luego el gel y finalmente otro filtro. La transferencia se realizó a 55 volts por 22 h a 4°C. Una vez terminada la transferencia, la membrana se tiñó con rojo de Ponceau (Thermo Fisher Scientific) para corroborar que la transferencia se haya realizado.

Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-Bap diluidos 1:6000 se pre-absorbieron con 100 μ l de extractos totales proteicos de la cepa DH5 α +pBAD (cultivada en 5 ml de medio LB a 37°C/ 8 hrs), durante 30 minutos en agitación a temperatura ambiente para descartar todos aquellos anticuerpos inespecíficos que se unen a proteínas que no son de interés y de este modo solo captar a la proteína Bap.

La membrana fue bloqueada con leche al 10% baja en grasa (Svelty) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, la membrana fue lavada 3 veces de 10 minutos cada uno con PBS-T (PBS1X, 0.5 M NaCl y 0.1% Tween) y se incubó con los siguientes anticuerpos: anti-Bap pre-absorbidos 1:6000 durante 2 hr en agitación a temperatura ambiente. También se usó como control de carga anti-GroEL 1:80000, proteína indispensable para la viabilidad de *E.coli* involucrada en el plegamiento de proteínas (José Luis Puente IBT-UNAM) en las mismas condiciones (Walter 2002).

La membrana se lavó 3 veces con PBS-T (PBS 1X, 0.5M NaCl y 0.1% Tween) por 10 minutos cada uno y posteriormente se incubó con anticuerpo secundario anti-conejo 1:20000 (Thermo Fisher Scientific) durante 1 hora a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente se realizaron 3 lavados con PBS-T bajo las condiciones mencionadas anteriormente y se agregaron los reactivos “Luminol enhancer solution” y “peroxide solution” (Thermo Fisher Scientific) en proporción 1:1, finalmente se realizó el revelado de la membrana sobre una película “Kodak X-Omat LS film”.

6.14 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de la proteína Bap(4696-4826)-6XH se hizo por el método de Bradford. Se hizo una curva estándar con albúmina sérica bovina (Thermo Fisher Scientific) y PBS 1X como se indica en la tabla 5. Para cada dilución se adicionó 1 ml de solución de trabajo de Bradford (BioRad) y se mezcló, se dejó incubando por 5 minutos a temperatura ambiente y se midió a una longitud de onda de 595 nm en un nanofotómetro (Implen).

Tabla 5. Concentración estándar para cuantificación por Bradford.

Abs	0.036	0.122	0.256	0.363	0.446	0.526	0.595	0.636	0.717	0.747
BSA (µg)	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18

Posteriormente se tomaron 25 μ l de la proteína Bap(4696-4826)-6XH, se añadieron 75 μ l de PBS y 1 ml de solución de trabajo de Bradford. Se dejó interactuando 5 min a temperatura ambiente y se leyó a DO_{595nm}. Después, se hizo la relación de la absorbancia con respecto a la curva estándar para determinar la concentración de la proteína.

6.15 Generación de anticuerpos

De un conejo hembra Nueva Zelanda con 3 meses de edad se obtuvieron 0.2 ml de suero pre-inmune como control pre-inmune y se le inyectaron 0.5 ml de Bap(4696-4826) (240 microgramos) mezclado con 0.5 ml de adyuvante completo de Freund's (Sigma-Aldrich). En el día número 21 se inyectaron 0.5 ml del Bap(4696-4826) (240 microgramos) mezclado con 0.5 ml de adyuvante incompleto de Freund's (Sigma-Aldrich). En el día 30 se obtuvieron 0.2 ml de suero para monitorear el título de anticuerpos contra el antígeno. En el día 42 se inyectaron 0.5 ml de Bap(4696-4826) (240 microgramos) mezclado con 0.5 de adyuvante incompleto de Freund's. Finalmente, en el día 50 una vez concluido el esquema de inmunización se procedió a la extracción de sangre total del conejo colectándolos en tubos de 50 ml, y se dejó incubando a 37°C para separar el suero donde se encuentran todos los anticuerpos del conejo. Una vez obtenida esta fracción se procedió a centrifugar a 4500 rpm durante 15 minutos y así separar aún mejor la fracción de interés. Los anticuerpos se almacenaron a -20 °C hasta ser utilizados.

6.16 Ensayos de adherencia

Con la finalidad de conocer el papel de Bap sobre la adherencia, las cepas EHEC EDL933 y EAEC 042 fueron cultivadas en medio LB durante toda la noche a 37°C en baño de agitación a 220 rpm. Al día siguiente, las bacterias se incubaron con diferentes diluciones de anticuerpo anti-Bap en medio DMEM durante 30 minutos

en agitación. Las cantidades de cada componente utilizados en este ensayo se mencionan a continuación:

Dilución	Control	1:10	1:100
Anti-Bap	0 µl	100 µl	10 µl
EHEC/EAEC	33.3 µl	33.3 µl	33.3 µl
DMEM	966.7 µl	866.7 µl	956.7 µl
Total	1000 µl	1000 µl	1000 µl

El producto resultante se colocó en placas de poliestireno de 24 pozos (Corning Incorporated Cell Culture Plate Non-Pyrogenic Polystyrene) con o sin discos de vidrio y se incubaron a 37°C durante 2, 3, 4 y 6 horas en estático a 37°C.

Para cuantificar la masa de la biopelícula, se eliminó el medio de cultivo (succión con micropipeta) con el fin de eliminar todas las células que no se adhirieron y se lavaron los pozos 3 veces con PBS 1X. Se adicionaron 500 µl de formalina al 2% y se dejó incubar 20 minutos a temperatura ambiente, se hicieron 3 lavados con agua tridestilada estéril. Posteriormente, se añadió cristal violeta al 5% para teñir las bacterias adheridas dejándolo interactuar durante 20 minutos. Se retiró el cristal violeta, se realizaron 3 lavados con agua tridestilada estéril y se dejó secando a 37°C. El colorante se solubilizó con 1 ml de metanol al 100% durante 10 min. Por último, se midió la absorbancia a 620 nm en un nanofotómetro (Implen). La biopelícula formada sobre discos de vidrio se visualizó en un microscopio de luz (ROSSBACH-KYOWA No.754790) a 100X con aceite de inmersión.

6.17 Análisis bioinformáticos

Las secuencias de ADN fueron obtenidas del NCBI (National Center of Biotecnology Information). Los resultados de la secuenciación de DNA se analizaron en el programa Serial Cloner Lnk. versión 2.6.1. La predicción de

dominios de las proteínas similares a Bap se hizo con el programa SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) que es un recurso web (<http://smart.embl.de>). Los resultados obtenidos de la secuenciación de proteínas fueron analizados en el programa Scaffold versión 4.8.9, Proteome software Inc., Portland, OR., que valida la identificación de proteínas basadas en péptidos obtenidos por la espectrometría de masas.

6.18 Análisis Estadísticos

Las gráficas y análisis estadísticos se realizaron en “GraphPad Prism 8.1.1” (GraphPad Software, Inc., CA, USA), la diferencia significativa se calculó usando un método no paramétrico “Kruskal-Wallis” considerando diferencia significativa $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis bioinformáticos

7.1.1 Organización y ubicación de *bap* (*z0615*) en el cromosoma de EHEC

Para la caracterización de la proteína Bap de EHEC, se analizó la secuencia de nucleótidos del *orfZ0615* ubicado en el genoma de EHEC entre los nucleótidos 585,946 - 601,512, según lo indicado en la base de datos del NCBI. Este gen tiene un tamaño de 15,567 nt y se transcribe en la misma orientación que otros 4 genes (Figura 9) con los que podría estar formando un operón. Se analizaron dichos genes con la finalidad de saber si había alguna relación en cuanto a su funcionalidad y de este modo conocer más sobre sus posibles funciones.

Esto se realizó analizando la descripción de cada uno de los genes proporcionada en la plataforma de NCBI, que contiene información sobre la ubicación, tamaño, nombre, breve descripción de su función, secuencia de aminoácidos, secuencia de nucleótidos y dominios de la proteína que codifica.

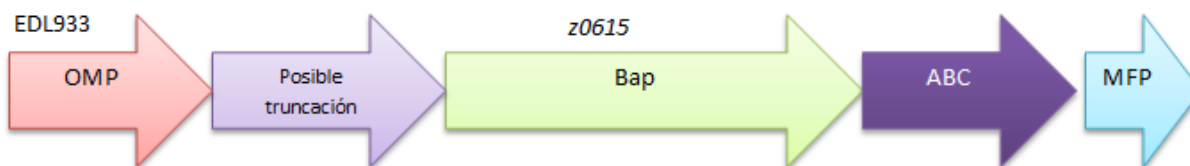


Figura 9. Ubicación de *bap* y orf's ubicados en los extremos en EHEC O157:H7.

Los genes adyacentes al gen *bap* son elementos de un supuesto sistema de secreción tipo 1. OMP, proteína de membrana externa; ABC, casete de unión a ATP; MFP, proteína de fusión a membrana.

Los resultados muestran que el gen *z0615* (*bap*) se encuentra contiguo a 4 genes que se transcriben en la misma dirección y son componentes del sistema de secreción tipo 1 con funciones específicas. La maquinaria de secreción tipo 1

consta de tres proteínas localizadas en la envoltura celular y todas son necesarias para la secreción: un cassette de unión a ATP (ABC), una proteína que se localiza en la membrana citoplasmática que reconoce el sustrato a través de su señal de secreción, una ATP y es responsable de la especificidad en dicho proceso. La proteína de fusión de membrana o adaptadora MFP (por sus siglas en inglés, membrane fusion protein), consiste en un dominio citoplasmático corto en el extremo N-terminal seguido de un ancla de membrana y un dominio periplásmico grande, establece vínculos específicos entre los componentes de la membrana externa e interna del sistema en respuesta a la unión del sustrato en el lado citoplásmico. Una proteína de membrana externa OMP (por sus siglas en inglés, outer membrane protein) que es una proteína trimérica que forma un canal a lo largo de la membrana externa al periplasma que se abre en gran medida hacia el medio extracelular y se contrae en su extremo periplásmico. La interacción inicial del sustrato con su señal de secreción con la proteína ABC desencadena el ensamblaje secuencial del complejo de secreción al generar interacciones específicas adicionales entre ABC, MFP y OMP. La proteína ABC asegura que solo se reconozcan sustratos específicos (Delepelaire 2004).

Estos resultados sugieren que el gen *bap* podría ser activado en conjunto con los componentes del sistema de secreción tipo I bajo un mismo promotor que se activa bajo condiciones específicas, utilizando este medio de exporte para ubicarse en el medio extracelular y favorecer su función.

7.1.2 Predicción de dominios de Bap (Z0615)

Una vez identificado la organización genética de *bap*, se realizó la predicción de dominios de las proteínas similares a Bap de las cepas EHEC EDL933, EAEC 042, *Staphylococcus aureus* V329 y *Salmonella* entérica PNUSAS050755 en el programa SMART. Esto con la finalidad de conocer el porcentaje de homología existente entre los dominios de las proteínas Bap mejor caracterizadas con Bap de EHEC y solo clonar una parte del gen, debido a que la clonación del gen completo en un vector no se ha logrado por otros grupos de investigación.

Para esto, las secuencias de aminoácidos de cada homólogo de Bap en las diferentes cepas se descargaron en formato fasta y se introdujeron de manera individual en el programa SMART que proporciona el número y tipo de dominios que se encuentran en la proteína analizada, posteriormente se ilustraron los dominios en Power point de manera manual. Para poder reconocer el porcentaje de identidad existente entre las proteínas de las cepas antes mencionadas, se realizó un BLASTP (alineamiento de proteínas) en la plataforma de NCBI el cual te brinda información sobre el porcentaje de identidad entre las distintas secuencias de aminoácidos analizadas y la posición en la que se encuentra dicha homología. Las proteínas similares a Bap son de alto peso molecular y comparten un alto porcentaje de identidad principalmente en los dominios de tipo Ig (Figura 10). Los dominios bacterianos similares a inmunoglobulina (Ig) 1 o dominio Big-1 son dominios de ~95 aminoácidos y se encuentran presentes en moléculas de adhesión bacteriana de la familia intimina de *E. coli* enteropatógena y en la invasina de *Yersinia pseudotuberculosis*, que son adhesinas con una repetición en tándem del dominio Big-1. Las proteínas Big-1 son expresadas en la superficie y median la invasión o unión a las células huésped de mamíferos. El tándem de dominios similares a Ig parece formar una varilla para el anclaje de la membrana externa bacteriana al dominio similar a lectina C-terminal para interactuar con sus receptores en la membrana de la célula huésped (Kelly et al. 1999). También se lograron detectar dominios de anclaje a la pared celular y una secuencia señal para el reconocimiento del sistema de secreción tipo 1, esto podría ser relacionado directamente con su función en EHEC. *Staphylococcus aureus* por otro lado muestra un péptido señal de la familia YSIRK, este dominio tiende a encontrarse en proteínas largas con baja complejidad, la mayoría de estas proteínas tiene un motivo de anclaje a la pared celular de tipo LPXTG en el extremo C-terminal. Además, es importante resaltar que las proteínas Bap analizadas cuentan con dominios VCBS, este es un dominio de aproximadamente 100 residuos con una amplia distribución entre bacterias y tiene como funciones predichas la adhesión,

ya que pertenecen a la familia de las lectinas y se sugiere que es uno de los principales mediadores de unión con otras bacterias favoreciendo la formación de biopelículas.

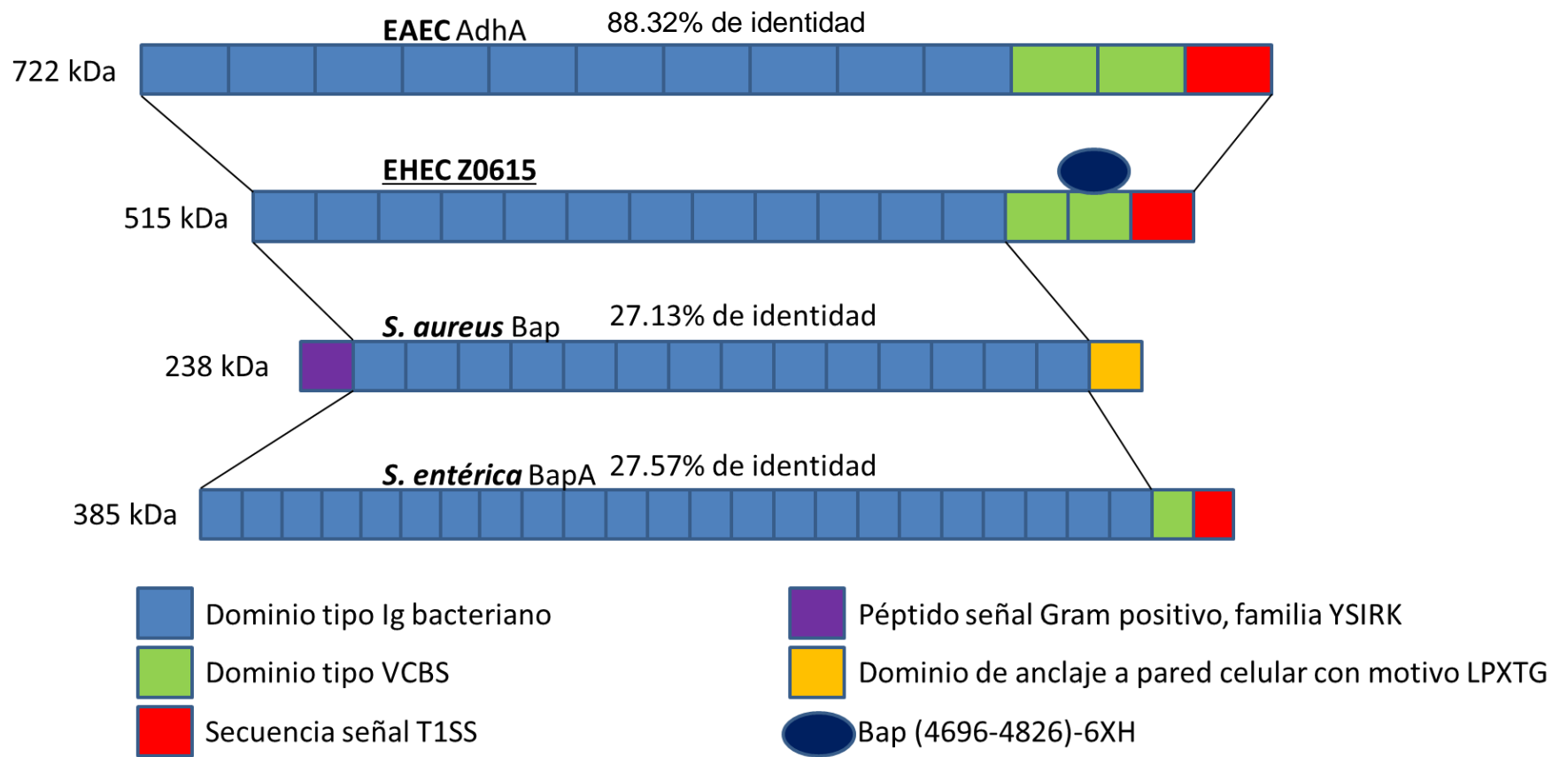


Figura 10. Representación gráfica de la predicción de dominios de la proteína Bap (Z0615) en EHEC O157:H7 comparado con proteínas similares a Bap en EAEC 042, *Staphylococcus aureus* V329 y *Salmonella entérica* PNUSAS050755 con sus porcentajes de identidad.

Se muestra en código de colores cada uno de los dominios contenidos en las proteínas similares a Bap de EHEC, su peso molecular aproximado y el porcentaje de identidad (en los dominios Ig) con respecto a la proteína Bap de EHEC. La elipse indica la región clonada de Bap en este trabajo.

En la figura 10, se muestra en una elipse en el dominio clonado de Bap que abarca un dominio VCBS completo el cual fue seleccionado por estar conservado entre las proteínas de la familia Bap y por contar con un alto porcentaje de identidad con EAEC que es un patógeno de interés médico y que también es trabajado en el Centro de Detección Biomolecular de la BUAP.

Se sugiere que generar anticuerpos a partir de un dominio VCBS puede servir como una herramienta para la detección de Bap de EHEC y patógenos relacionados debido a que juega un papel crucial en el contacto directo con diversas superficies.

7.2 Clonación y expresión de la proteína recombinante Bap(4696-4826)-6XH

Una vez analizada la secuencia de Bap, se procedió a clonar la región VCBS en un vector de expresión. Para esto, la región que comprende de los nucleótidos 600,033 al 600,423 con respecto del genoma de EHEC fue amplificada por PCR con los oligos BAPIFN y BAPIRN, que introducen los sitios de restricción *Nco*I y *Hind*III, respectivamente. El producto obtenido de 474 pb fue clonado en el vector pBAD/Myc-HisA y transformado en la cepa DH5 α . Las clonas candidatas se caracterizaron por PCR de colonia y se seleccionaron aquellas que contaran con la construcción pBap(4696-4826)EH. La construcción fue analizada por secuenciación tipo Sanger para verificar que no incluyera mutaciones y para comprobar que la secuencia se encontrara en fase con las 6 histidinas en su extremo C-terminal, que facilita su posterior purificación.

Una vez confirmada su identidad, se realizó la transformación en las cepas BL21(DE3) y BL21(DE3) TUNER para identificar en qué cepa se generaba una mayor expresión de la proteína Bap(4696-4826)-6XH. Para esto, las cepas con el plásmido se cultivaron en medio LB, hasta llegar a una D.O.₆₀₀ = 0.5 y se agregó 0.2% de arabinosa para inducir la expresión de la proteína Bap(4696-4826)-6XH durante 4 h. Los concentrados celulares obtenidos fueron lisados por sonicación y se corrieron en un gel de poliacrilamida al 12 %, junto con la proteína purificada, para posteriormente ser transferidos a una membrana de PVDF. La membrana se

incubó con sonda His-Probe durante 2 horas debido a su capacidad para reconocer proteínas con colas de 6 histidinas. Se hicieron 3 lavados con PBS-T de 10 minutos cada uno para retirar excesos de la sonda y posteriormente se realizó el revelado de la membrana sobre una película “Kodak X-Omat LS film”. Los resultados se muestran en la figura 11.

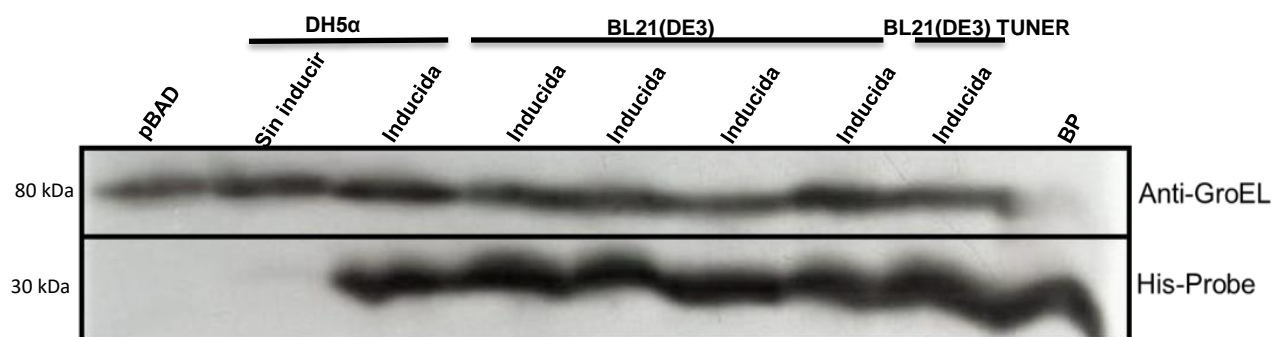


Figura 11. Expresión de Bap(4696-4826)-6XH en diferentes cepas de *E. coli*.

Extractos proteicos de cepas de *E. coli* transformadas con el plásmido pBap(4696-4826)EH. Se muestra la detección realizada por la sonda His-Probe HRP sobre extractos proteicos totales de cepas que contienen el plasmido pBap(4696-4826) sin inducir e inducidas con 0.2% de arabinosa. Se muestra como control negativo el vector pBAD y como control positivo la proteína Bap(4696-4826)-6XH purificada (BP). Anti-GroEL se utilizó como control de carga.

Los resultados muestran que la sonda His Probe HRP detecta una proteína con un peso molecular de 30 kDa en las cepas DH5α, BL21(DE3) y BL21 TUNER cuando son inducidas con arabinosa al 0.2% a diferencia de cuando no son sometidas a un proceso de inducción. Se usó como control negativo la cepa DH5α transformada con el vector pBAD/Myc-HisA. Como control positivo se usó la proteína previamente purificada con resina de níquel para comparar el peso molecular de las bandas detectadas en este ensayo. Se deduce que el plasmido pBap(4696-4826)EH se encuentra en fase con las 6 histidinas ya que se logra purificar con resina de níquel y la sonda logra detectar dicha proteína purificada. Sin embargo, la proteína detectada por la sonda tiene un peso molecular de 30 kDa mientras que el peso molecular teórico esperado de la proteína es de 16.64 kDa.

7.3 Purificación de la proteína Bap(4696-4826)-6XH

La purificación de la proteína recombinante Bap(4696-4826)-6XH se hizo a partir de la cepa DH5 α para ser utilizada como antígeno en conejos Nueva Zelanda ya que de esta cepa se obtuvo una mayor concentración de proteína en la purificación cuando se estandarizó este proceso.

La cepa DH5 α transformada con el plásmido pBap(4696-4826)EH fue cultivada en medio LB hasta llegar a una D.O.₆₀₀ = 0.5 y se agregó 0.2% de arabinosa para inducir su sobreexpresión durante 4 horas. El cultivo se centrifugó y el paquete celular se resuspendió en urea 8 M, esto con la finalidad de facilitar la lisis por sonicación. Posteriormente, se centrifugó para obtener el sobrenadante y eliminar restos celulares. El extracto fue procesado por cromatografía de afinidad utilizando resina de níquel para obtener la proteína purificada como se muestra en el panel A de la figura 12. Debido a que la fracción purificada (carril 6) presentaba bandas co-purificadas de mayor peso molecular, a diferencia del confirmado por Western blot (figura 11), se procedió a realizar una re-purificación. En este proceso se buscó la eliminación de proteínas inespecíficas co-purificadas (que no son de interés) por medio de lavados con urea 6.5 M, como se explica con mayor detalle en la metodología. La figura 12 muestra el resultado de los diferentes pasos de la purificación y re-purificación de Bap(4696-4826)-6XH, donde se puede observar nuevamente una banda de ~30 kDa. Al finalizar el proceso de purificación y re-purificación se procedió a renaturalizar la proteína, ya que al estar inmersa en urea 8M se encuentra en una conformación lineal y fue necesario recuperar su conformación nativa o parcialmente nativa para poder generar anticuerpos de mejor calidad contra esta proteína. Este proceso se realizó con una diálisis en el cual se hacen cambios graduales de urea por PBS 1X en frío.

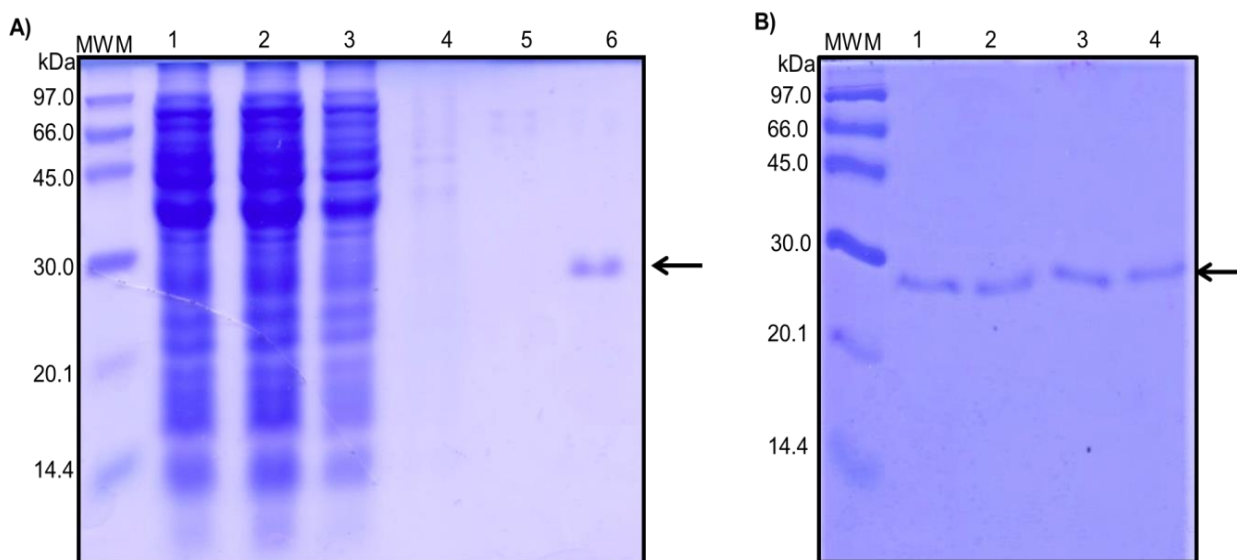


Figura 12. SDS-PAGE de muestras correspondientes a diferentes pasos de la purificación de proteínas por cromatografía de afinidad.

Se muestra la separación electroforética de la purificación de Bap(4696-4826)-6XH (A) carriles: MWM, marcador de peso molecular; 1, extracto total; 2, fracción insoluble; 3, fracción soluble; 4, fracción no unida; 5, lavado; 6, elución. (B). SDS PAGE con muestras de la repurificación. Carriles: MWM, marcador de peso molecular; 1-4 eluciones de la repurificación. La flecha indica la proteína purificada Bap(4696-4826)-6XH.

Como se puede observar en los resultados de este ensayo la purificación de la proteína detectada por Western blot cuenta con un peso molecular mayor al esperado y además cuenta con proteínas inespecíficas que no son eliminadas en el proceso de lavado, es por este motivo que se procedió a hacer una re-purificación. En la re-purificación se puede observar la eliminación de proteínas inespecíficas lo que favoreció el incremento de la pureza de la proteína Bap(4696-4826)-6XH. Estos resultados sugieren que la proteína purificada es Bap(4696-4826)-6XH debido a que tiene una alta afinidad por la resina de níquel y que a pesar de ser sometida a un proceso de repurificación no pierde la afinidad por dicha resina de níquel indicando que no se trata de una unión inespecífica. Es por este motivo que procedimos a confirmar la identidad de la proteína por secuenciación mediante espectrometría de masas.

7.4 Identificación de la proteína Bap(4696-4826)-6XH por Espectrometría de masas

Con la finalidad de confirmar la identidad de la proteína purificada se realizó la secuenciación por espectrometría de masas (Figura 13). Para llevar a cabo dicho procedimiento se cortaron por duplicado bandas de la proteína purificada previamente separada por SDS-PAGE bajo condiciones de esterilidad, para evitar contaminaciones que interfirieran en el resultado o provocaran la degradación de la proteína. Posteriormente, las bandas cortadas se enviaron a la Plataforma de Descubrimiento en Proteómica en el Instituto de Investigaciones Clínicas de Montreal, Canadá.

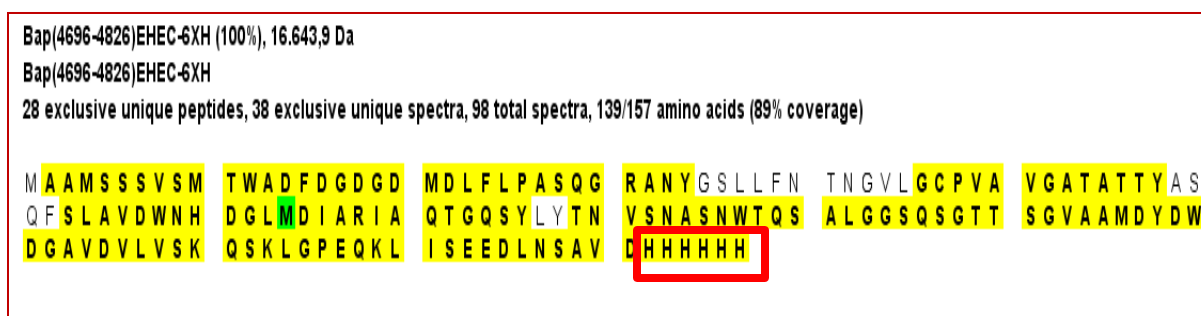


Figura 13. Principales péptidos obtenidos en la secuenciación por Espectrometría de masas.

En amarillo se muestran los péptidos obtenidos de la secuenciación de Bap(4696-4826)-6XH con 38 péptidos exclusivos y 89% de cobertura. El rectángulo rojo indica la cola de 6 histidinas.

Los resultados de la espectrometría de masas fueron analizados por el programa Scaffold versión 4.8.9, Proteome Software Inc., Portland OR. Los datos obtenidos muestran que la proteína purificada y separada por SDS-PAGE cuenta con un alto porcentaje de identidad con la proteína de interés. El resultado muestra 38 péptidos exclusivos y 89% de cobertura. Estos resultados confirman que la proteína purificada es Bap(4696-4826)-6XH, debido a que contiene la misma secuencia que fue clonada en el vector pBAD y que fue previamente confirmada

con secuenciación de DNA. Es probable que el peso mostrado mediante SDS-PAGE pueda deberse a que aún bajo condiciones desnaturalizantes (SDS y β -mercaptoetanol), la proteína esté formando dímeros (debido al tamaño observado) por las características propias de los dominios repetidos que contiene.

Finalmente, tales datos sobre la confirmación de la secuencia permitieron utilizar la proteína Bap(4696-4826)-6XH para los ensayos de generación de anticuerpos policlonales.

7.5 Evaluación de la funcionalidad de los anticuerpos Anti-Bap

Una vez confirmada la identidad de la proteína recombinante que sería usada como antígeno para la generación de anticuerpos, se procedió a llevar un esquema de inmunización en un conejo Nueva Zelanda. Para esto, primero se monitoreó el peso y las condiciones de salud del conejo durante 1 semana antes de iniciar el esquema de inmunización que se detalla en la metodología. Al finalizar dicho esquema, se procedió a hacer la extracción total de la sangre del conejo. Este procedimiento fue realizado con ayuda de veterinarios del bioterio Claude Bernard de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Una vez obtenida la sangre total del conejo, se incubó a 37°C durante 4 horas y se centrifugó para separar el suero de la fracción celular. El suero fue alicuotado y almacenado a -20°C.

Para probar la funcionalidad de tales anticuerpos, se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% en el que se cargaron 120 μ g de Bap(4696-4826)-6XH purificada y se analizó por Western blot probando diferentes diluciones de los anticuerpos anti-bap generados. Como se observa en la figura 14, el anticuerpo anti-Bap tiene la capacidad de reconocer a la proteína desde la dilución que va de 1:3000 hasta 1:10000 con ligeras diferencias en su afinidad, este análisis nos permitió identificar las diluciones que se podrían utilizar del anti-Bap para el reconocimiento de Bap nativa.

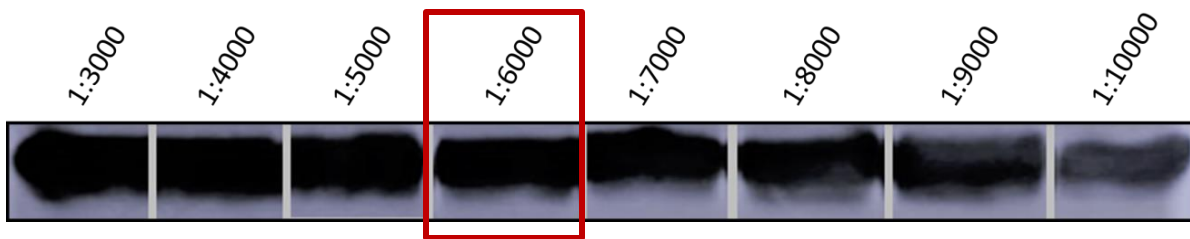


Figura 14. Western blot para evaluar la funcionalidad de los anticuerpos anti-Bap generados.

120 µg de Bap(4696-4826)-6XH fueron cargados en un pozo largo y separados mediante SDS-PAGE al 12%. El gel fue transferido a una membrana de PVDF y ésta fue cortada en 8 fragmentos para analizarlos de manera independientes por western blot usando las siguientes diluciones: 1:3000, 1:4000, 1:5000, 1:6000, 1:7000, 1:8000, 1:9000 y 1:10000 de anti-Bap. Se muestra en un rectángulo rojo la dilución que se seleccionó para evaluar la expresión de Bap nativa en ensayos posteriores.

El resultado obtenido nos muestra que los anticuerpos Anti-Bap se unen con una alta saturación a la proteína purificada cuando se trabajan en las diluciones de 1:3000, 1:4000 y 1:5000, esto se puede observar por el ancho y la intensidad de la banda revelada por Western blot. Por otra parte, las diluciones más grandes utilizada en este ensayo presentan una detección muy ligera y difusa en las diluciones que van de 1:7000-1:10000, lo que podría dificultar el reconocimiento de Bap nativa. Es por esto que se decidió utilizar la dilución 1:6000 ya que presenta un reconocimiento con mayor definición al ser revelado por Western blot.

7.6 Detección de Bap silvestre en EHEC y EAEC.

Previamente el grupo del Dr. Jorge Girón identificó que el gen *bap* de EHEC se expresa cuando la bacteria es cultivada en medio DMEM y sobre células HeLa, mientras que en medio LB el gen solo muestra una transcripción basal (Figura 8). Con base en estos datos y con la obtención de los anticuerpos anti-Bap, se evaluó la expresión de la proteína Bap de EHEC mediante Western blot bajo diferentes condiciones de crecimiento. Al mismo tiempo se analizó la expresión de Bap en la cepa EAEC que contiene en su genoma un gen putativo con homología a la familia de Bap y que no ha sido estudiado hasta el momento.

Para esto, las cepas de EHEC EDL933, EAEC 042 así como DH5 α y EPEC E2348/69 (como controles negativos), se cultivaron en medio DMEM y LB a 37°C hasta llegar a una D.O.₆₀₀= 0.8. Las células fueron concentradas y los extractos proteicos obtenidos se separaron en un gel de acrilamida al 8% durante 12 horas a 15 V. Posteriormente se realizo la transferencia de las proteínas a una membrana de PVDF en una cámara de transferencia húmeda durante 22 horas a 55 V a 4°C.

En la figura 15 se muestran los resultados del Western blot donde se observa que los anticuerpos anti-Bap reconocen una proteína de alto peso molecular (>97 kDa), en los carriles donde se cargaron extractos totales proteicos de EHEC EDL933 y EAEC 042 crecidas en medio DMEM a diferencia de cuando son crecidas en medio LB, donde dicha banda no fue observada. En los carriles que corresponden a extractos proteicos totales de las cepas DH5 α y EPEC no se detectó ninguna proteína en las dos condiciones de crecimiento probadas, esto coincide con la ausencia de Bap en estas cepas y sugiere que los anticuerpos anti-Bap obtenidos reconocen de forma específica a Bap.

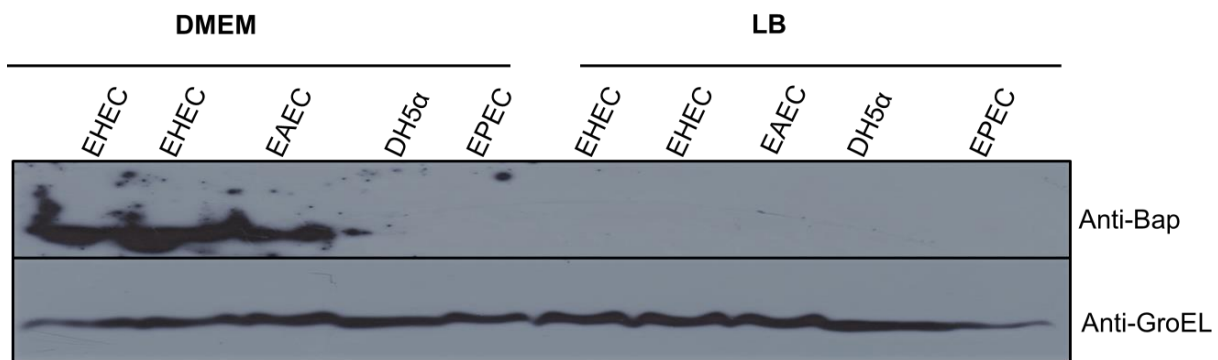


Figura 15. Expresión de Bap en EHEC O157:H7 y otras cepas de *E.coli* con los anticuerpos anti-Bap.

EHEC EDL933, EAEC 042, EPEC E2348/69 y DH5 α fueron crecidas en medio DMEM y LB a 37°C. Se tomaron alícuotas a una D.O.₆₀₀=0.8 y fueron lisadas por sonicación. Los extractos de proteínas fueron analizados por western blot utilizando anti-Bap en dilución 1:6000 (El extracto de EHEC se corrió en dos carriles con la finalidad de no tener un falso positivo). Anti-GroEL fue utilizado como control.

Los resultados obtenidos de este experimento coinciden con los generados por Girón y cols., sobre la expresión de *bap*, por RT-qPCR, que indican que este gen se expresa de manera preferencial cuando la bacteria es crecida en medio DMEM a 37°C respecto del crecimiento en medio LB. Esto sugiere que los anticuerpos anti-Bap pueden ser utilizados como una herramienta para la detección y estudio de Bap, debido a que muestran una alta especificidad para el reconocimiento de esta proteína de alto peso molecular de EHEC EDL933 y, de manera importante, también puede utilizarse en el estudio de Bap en la cepa EAEC 042.

7.7 Papel de Bap en la adherencia

7.7.1 Ensayo de adherencia de EHEC sobre vidrio

Para el estudio del papel de Bap sobre la adherencia de EHEC, se utilizaron los anticuerpos anti-Bap generados en este trabajo con la finalidad de bloquear la participación de Bap sobre la adherencia en EHEC.

Para esto, a partir de un cultivo de toda la noche en medio LB de la cepa de EHEC EDL933, se concentraron las células y se incubaron con el anticuerpo anti-Bap en diluciones 1:10 y 1:100 en microtubos de 1.5 ml durante 30 minutos en agitación. Posteriormente, las bacterias fueron adicionadas sobre placas de poliestireno de 24 pozos con discos de vidrio, que contenía medio DME, y las placas fueron incubadas a 37°C durante 6 horas.

Las placas fueron procesadas de acuerdo a lo establecido en materiales y métodos y las bacterias adheridas al vidrio fueron visualizadas al microscopio de luz con el objetivo 100X en presencia de aceite de inmersión. Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 16.

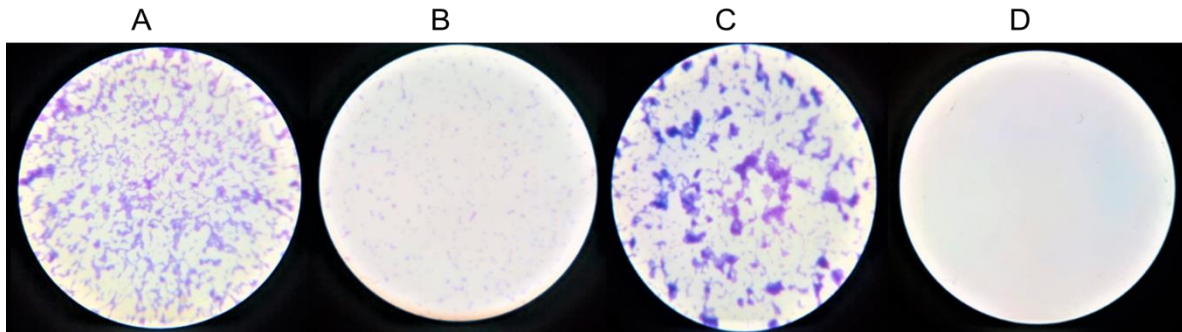


Figura 16. Papel de Bap en la adherencia de EHEC sobre vidrio.

La cepa EHEC EDL933 se incubó con diluciones 1:10 y 1:100 de los anticuerpos anti-Bap por 30 minutos en agitación. Posteriormente, las bacterias fueron cultivadas en medio DME en placas de poliestireno con discos de vidrio durante 6 horas. Las bacterias adheridas fueron visualizadas con el microscopio de luz con el objetivo 100X. Las imágenes muestran: adherencia de EHEC en ausencia de anticuerpos (A), incubada con anticuerpo en dilución 1:10 (B), incubada con anticuerpo en dilución 1:100 (C), control (sin bacterias) (D). Se realizaron dos experimentos independientes por triplicado.

Los resultados obtenidos sugieren que la adherencia de EHEC EDL933 es afectada por la presencia de los anticuerpos anti-Bap, debido a que EHEC mostró una adherencia extensa y uniforme sobre la superficie de vidrio cuando fue crecida en ausencia de los anticuerpos. En contraste, cuando las bacterias fueron incubadas con anti-Bap en una dilución 1:10 se observó una drástica disminución en la capacidad de adherirse a la superficie de vidrio por lo que se observó una menor cantidad de bacterias. Sin embargo, cuando se incrementó la dilución de los anticuerpos anti-Bap a 1:100 la biopelícula formada por EHEC sobre la superficie de vidrio mostró una morfología distinta versus en ausencia de anticuerpos, ya que fueron visibles una cantidad mayor de bacterias pero en forma de grandes agregados. Por último, se trabajó con un pozo control que sirvió como referencia del ensayo de adherencia y que estuvo sujeto al mismo tratamiento que el resto de los pozos.

Tales datos sugieren que Bap juega un papel importante en la capacidad de EHEC para adherirse sobre la superficie de vidrio y que los anticuerpos anti-Bap generados en este trabajo son capaces de unirse a la proteína Bap nativa

bloqueando su función como adhesina. Esto resalta la importancia de los anticuerpos anti-Bap para ser utilizados como una herramienta en el análisis profundo de esta nueva adhesina de EHEC.

7.7.2 Ensayo de adherencia y formación de biopelícula de EAEC sobre poliestireno.

Para indagar sobre el papel que juega la proteína Bap de EAEC 042 en su capacidad para la adherencia y formación de biopelículas, y debido a que previamente se identificó en este trabajo que esta adhesina se expresa en medio DME con los anticuerpos anti-Bap que se generaron (Figura 15); se decidió realizar un ensayo de adherencia y formación de biofilm aprovechando que EAEC es un patógeno que se caracteriza por ser un buen formador de biopelículas sobre placas de poliestireno y que además esto permite la cuantificación de su adherencia. Para lo cual, se realizó un cultivo de toda la noche de EAEC 042 en medio LB y al día siguiente las bacterias fueron incubadas con diluciones 1:10 y 1:100 del anticuerpo anti-Bap durante 30 min en agitación. Posteriormente, las bacterias fueron cultivadas en medio DME en placas de poliestireno de 24 pozos y fueron incubadas durante 2, 3, 4 y 6 horas a 37°C. Las placas fueron tratadas como se describe en materiales y métodos. Las bacterias adheridas fueron liberadas de los pozos con metanol y finalmente se midió la absorbancia de cada uno de los pozos con un nanofotómetro a 620 nm.

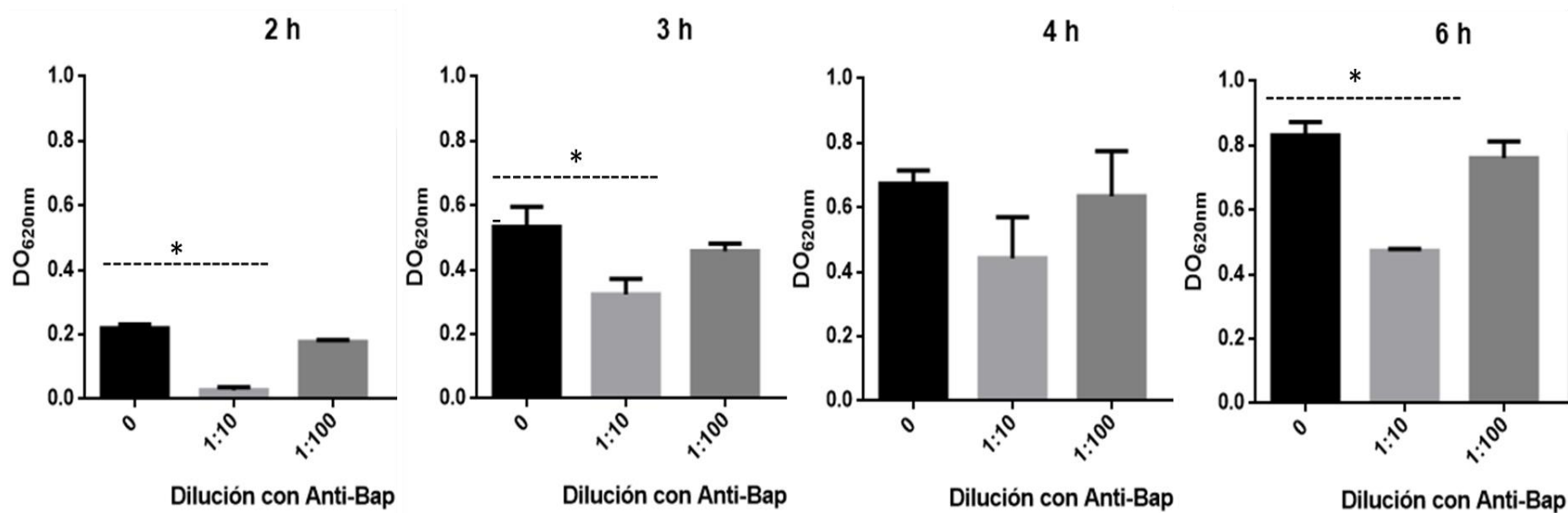


Figura 17. Papel de Bap en la adherencia y formación de biopelícula de EAEC sobre poliestireno.

La cepa EAEC O42 fue incubada con diluciones 1:10 y 1:100 de los anticuerpos anti-Bap por 30 minutos en agitación. Posteriormente, las bacterias fueron cultivadas en medio DME en placas de poliestireno de 24 pozos durante 2, 3, 4 y 6 horas a 37°C. La adherencia de las bacterias a los pozos fue analizada mediante la lectura de la absorbancia a D.O._{620nm}. Los datos representan el promedio de 3 experimentos realizados por triplicado. Los asteriscos señalan la diferencia significativa calculada por Kruskal Wallis (*p<0.05).

En la figura 17 se muestran 4 gráficas que representan la adherencia y formación de biopelícula de EAEC después de 2, 3, 4 y 6 horas de incubación en presencia o no con las diluciones 1:10 y 1:100 de anti-Bap. Los resultados indican que cuando EAEC es incubada con los anticuerpos anti-Bap en una dilución 1:10 durante 2, 3 y 6 horas, no es capaz de adherirse con la misma eficiencia sobre el poliestireno respecto de cuando la bacteria es crecida sin los anticuerpos anti-Bap. Tal disminución en su capacidad de adherirse posee un valor significativo de acuerdo a los parámetros calculados por Kruskal Wallis que arrojó un valor $p < 0.05$. En contraste, la adherencia y formación de biopelícula de EAEC en presencia de una dilución 1:100 de anti-Bap no fue afectada de manera significativa al compararla con el pozo donde fue adicionado EAEC sin anticuerpos (Figura 17).

8. DISCUSIÓN

El impacto negativo que tienen muchos patógenos al desarrollar biopelículas en los humanos, ha estimulado la investigación destinada a proporcionar pistas para combatirlas, en diversos estudios se han encontrado requisitos genéticos necesarios por parte de las bacterias para la formación de biopelículas y gracias a su análisis se ha logrado la generación de herramientas para su detección. Además, se ha revelado una amplia diversidad de adhesinas que contribuyen a la colonización y maduración de una biopelícula. Asimismo, se ha concluido que los factores de adhesión son indispensables para el desarrollo de muchas enfermedades (Beloin et al. 2008).

En *E. coli* enterohemorrágica no se conocen todas las adhesinas involucradas en la formación de biopelículas tanto en superficies bióticas y abióticas, pero en particular, la manutención de genes que codifican para proteínas de alto peso molecular promueve el interés por dilucidar su función debido a que mantener y expresar genes de gran longitud y redundancia de secuencia representa un alto costo energético para las bacterias, su presencia en el genoma implica que existe

una presión selectiva significativa para retenerlas otorgando grandes ventajas para su sobrevivencia (Yousef and Espinosa-Urgel 2007).

Las adhesinas bacterianas que pertenecen a la familia Bap son bastante grandes y se encuentran en una amplia variedad de bacterias Gram-positivas y Gram negativas, como Bap de *Staphylococcus aureus* o BapA de *Salmonella entérica*. Estas proteínas son de gran relevancia debido a que están involucradas en la adherencia inicial y la adherencia intercelular (Lasa and Penades 2006; Cucarella et al. 2001). Su expresión se lleva a cabo solo bajo ciertas condiciones ambientales y sobre determinadas superficies como en el caso Bap de *Staphylococcus aureus* que fue una de las primeras proteínas Bap bien caracterizadas, destacando que exhibe una morfología de colonia rugosa asociada con buenos productores de biopelícula mientras que la cepa mutante en Bap producen una morfología de colonia suave que se encuentra comúnmente en cepas que no producen biopelícula (Cucarella et al. 2001).

En el presente estudio se generaron anticuerpos que ayudaran a dilucidar la función de Bap de EHEC apoyados en la clonación y purificación de una región conservada de dicha proteína. Para conocer el papel que desempeña en la formación de biopelículas, hemos utilizado el ensayo de biopelícula estándar en placas de poliestireno, en el cual se bloqueó a Bap con los anticuerpos generados en este trabajo. Sorprendentemente, a pesar de que EHEC cuenta con un amplio repertorio de adhesinas involucradas en la formación de biopelícula, el bloqueo de Bap afecto fuertemente dicha adherencia sobre discos de vidrio, de igual forma en EAEC cuando es crecida sobre poliestireno. También evaluamos su expresión por medio de western blot cuando son crecidas en dos medios de cultivo distintos destacando que tanto EHEC y EAEC tienen una mayor expresión de *bap* cuando son crecidas en medio DMEM apoyando lo descrito por el grupo de trabajo de Girón en 2016.

El análisis bioinformático de la proteína Bap de EHEC mostró poca similitud de secuencia con proteínas conocidas. Sin embargo; la proteína cuenta con una

organización muy parecida a proteínas Bap que ya han sido bien caracterizadas, lo cual nos ayuda a deducir su función y procesamiento. Una de las características estructurales más notables encontradas en Bap de EHEC es la presencia de una región con múltiples repeticiones de dominios de tipo Ig. Las adhesinas que contienen dominios Ig muestran una fuerte variación en el número de repeticiones, se ha asumido que el número de repeticiones esta correlacionado con el grosor de la membrana externa y la capa de antígeno O del LPS favoreciendo la extensión de la proteína desde la superficie celular hasta tener contacto con superficies abióticas, componentes de la célula huésped u otras bacterias (Griessl et al. 2013). Gerlach y col. en 2008 Observaron que la eliminación de hasta 5 dominios Ig en SiiE, resulto en una disminución de la invasión de células polarizadas por *Salmonella* (Gerlach et al. 2008). Los dominios Ig de las grandes adhesinas no fimbriales pueden considerarse homólogos funcionales de las subunidades del eje polimérico de las adhesinas fimbriales. El ensamblaje polimérico de subunidades unidas no covalentemente en fimbrias, permite la alteración de la longitud del eje, pero también es más propenso a romperse por fuerzas mecánicas o desintegrarse por condiciones externas severas (Griessl et al. 2013). De igual manera, la proteína Bap cuenta con un péptido señal que es reconocido por el SST1 lo que apoya su función en el medio extracelular además de la presencia de genes contiguos que se transcriben en la misma dirección que codifican para componentes del SST1.

Trabajar con proteínas de alto peso molecular representa un reto para muchos centros de investigación debido a que su manipulación requiere de técnicas moleculares de mayor especialización; por este motivo, se decidió clonar solo una región de la proteína Bap. El dominio VCBS se encuentra en un amplio grupo de bacterias Gram-negativas incluso en el patógeno EAEC que es de interés por parte de nuestro grupo de trabajo. Se encuentra en proteínas grandes asociada con funciones de adhesión como es el caso de BapA que contiene un dominio VCBC en el extremo C- terminal contiguo a un péptido señal de reconocimiento

por parte del SST1. Un análisis de los *ORF'S* presentes río debajo de *bapA* mostró un gen llamado *stm2690* que codifica una proteína homologa a la proteína de membrana externa TolC , *stm2691* que codifica una proteína homologa a SunT (un exportador de tipo ABC) y *stm2692* que codifica para una proteína homologa a HlyD, una proteína periplásmica anclada a la membrana (Latasa et al. 2005). Estos datos nos sugieren que Bap de EHEC podría activarse de manera similar en conjunto con el SST1.

La cepa DH5 α fue seleccionada para expresar a la proteína recombinante Bap(4696-4826)-6XH debido a que es el hospedero usado con mayor frecuencia y se ha descrito a menudo como un sistema eficiente para la producción de proteínas recombinantes. Si las proteínas heterólogas no requieren modificaciones postraduccionales complejas y se expresan en forma soluble, generalmente *E. coli* es la mejor opción para obtener suficiente material para estudios bioquímicos y/o estructurales. Sin embargo, no es raro que las proteínas recombinantes sobreexpresadas no logren una conformación correcta y sufran degradación proteolítica o se asocien entre sí para formar agregados insolubles de proteínas no nativas conocidas como cuerpos de inclusión (Baneyx and Mujacic 2004). Para una proteína heteróloga, el fracaso para alcanzar rápidamente una conformación nativa para interactuar con moduladores plegables de manera oportuna, tiene dos posibles consecuencias: 1) deposición parcial o completa en agregados insolubles conocidos como cuerpos de inclusión o 2) la degradación (Baneyx and Mujacic 2004). La probabilidad de plegamiento incorrecto se incrementa por el uso rutinario de promotores fuertes y altas concentraciones inductoras que pueden conducir a rendimientos del producto que exceden el 50% de la proteína celular total.

Un factor que contribuye a la formación del cuerpo de inclusión es la incapacidad de las bacterias para soportar todas las modificaciones postraduccionales que una proteína requiere para plegarse. Como se muestra en la figura 12, la proteína purificada presenta un peso de casi el doble del esperado, posiblemente a la

formación de dímeros por lo cual se decidió purificar en condiciones desnaturalizantes, además de que fue identificada en menores concentraciones cuando es purificada en condiciones nativas (resultados no mostrados) y se encontraba en mayores concentraciones en la que se denominó “fracción insoluble”, haciendo referencia al botón bacteriano obtenido después de centrifugar el lisado celular, que solo se logró solubilizar cuando se utilizaron concentraciones de urea 8 M.

La urea es un agente caotrópico, que se une a la proteína dependiendo de la concentración empleada, generando la formación de estructuras proteicas más flexibles y desorganizadas perdiendo su estructura nativa (Terpe 2003). Las proteínas solubilizadas se vuelven a plegar a su estado nativo durante la eliminación de reactivos caotrópicos. El replegamiento de las proteínas recombinantes se realizó mediante diálisis, la cual fue desarrollada a baja temperatura y con intercambios de PBS 1X en lapsos de 2 horas durante 6 horas totales.

Una vez finalizado el esquema de inmunización con la proteína purificada se hicieron ensayos de adherencia demostrando que tienen la capacidad para reconocer a Bap de EHEC y EAEC. Hemos observado que una dilución de anticuerpo 1:10 disminuye la formación de biopelícula tanto en EHEC como en EAEC. Por otro lado, una dilución 1:100 del anticuerpos afecta la morfología en la formación de biopelícula esto puede resultar del bloqueo parcial de Bap y es importante tener en cuenta que no es la única proteína involucrada en la adherencia. Esto respalda la hipótesis de que Bap podría desempeñar un papel complementario a otras adhesinas o permitiendo la interconexión de bacterias separadas por largas distancias algo muy parecido con BapA de *Salmonella entérica*.

Nuestros resultados indican que la expresión de *bap* en EHEC incrementa cuando es crecida en un medio DMEM. Aunque el modo en el cual interactúa la proteína con diferentes superficies aún se desconoce. Curiosamente, ensayos con estos

anticuerpos en la cepa EAEC 042 que contiene una proteína con un alto porcentaje de homología con Bap de EHEC también se ve afectada por el bloqueo en diferentes tiempos, lo que sugiere que Bap no solo es activada en la adherencia inicial sino que podría favorecer la acción de diferentes adhesinas en distintos tiempos.

Estos resultados sugieren la importancia que tiene Bap como una nueva adhesina de EAEC y su papel en la adherencia y desarrollo de biopelícula. Hallazgos que sirven como un antecedente importante para el análisis profundo de esta adhesina y su importancia en el desarrollo de la enfermedad causada por EHEC.

Finalmente, aunque no hemos encontrado evidencias contundentes sobre el papel exacto que desempeña Bap en la formación de biopelículas los anticuerpos generados en este trabajo ayudaran en gran medida a su caracterización.

9. CONCLUSIONES

- La proteína Bap(4696-4826)-6XH construída y purificada en este trabajo mostró ser inmunogénica en el modelo animal al inducir la producción de anticuerpos policlonales que reconocen de manera específica a la proteína purificada y a la proteína Bap silvestre de EHEC.
- La proteína Bap se expresa cuando EHEC es cultivada en medio DMEM a 37°C a diferencia de cuando es cultivada en medio LB, lo que sugiere que podría tener un papel importante en la colonización en el hospedero y desarrollo de la enfermedad.
- La proteína Bap posee un papel importante en la adherencia de EHEC sobre la superficie de vidrio debido a que la presencia de anticuerpos anti-Bap provocan una disminución significativa en la capacidad de adherencia de EHEC.
- Los anticuerpos anti-Bap generados sirvieron para analizar el papel de Bap en EAEC O42 y su uso permitió identificar que este miembro de la familia Bap se expresa cuando la bacteria es crecida en medio DME a 37°C. Además, los anticuerpos anti-Bap sugieren que Bap es funcional y tiene un papel importante en la adherencia y formación de biopelícula cuando la bacteria es crecida sobre placas de poliestireno.
- Los anticuerpos anti-Bap generados en este trabajo podrían funcionar como una herramienta importante para el estudio y caracterización profunda de las proteínas Bap en EHEC y EAEC, para revelar el papel de esta nueva adhesina y su participación en el desarrollo de las enfermedades generadas por estos poderosos patógenos del ser humano.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Baneyx, F., and M. Mujacic. 2004. Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 22 (11):1399-1408.
- Barlag, B., and M. Hensel. 2015. The giant adhesin SiiE of *Salmonella enterica*. *Molecules* 20 (1):1134-1150.
- Baumler, A. J., R. M. Tsois, and F. Heffron. 1996. The lpf fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1):279-283.
- Beloin, C., A. Roux, and J. M. Ghigo. 2008. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol* 322:249-289.
- Bergan, J., A. B. Dyve Lingelem, R. Simm, T. Skotland, and K. Sandvig. 2012. Shiga toxins. *Toxicon* 60 (6):1085-1107.
- Berne, C., A. Ducret, G. G. Hardy, and Y. V. Brun. 2015. Adhesins Involved in Attachment to Abiotic Surfaces by Gram-Negative Bacteria. *Microbiol Spectr* 3 (4).
- Bjork, S., M. E. Breimer, G. C. Hansson, K. A. Karlsson, and H. Leffler. 1987. Structures of blood group glycosphingolipids of human small intestine. A relation between the expression of fucolipids of epithelial cells and the ABO, Le and Se phenotype of the donor. *J Biol Chem* 262 (14):6758-6765.
- Brinton, C. C., Jr. 1965. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria. *Trans N Y Acad Sci* 27 (8):1003-1054.
- Brunder, W., H. Schmidt, and H. Karch. 1996. KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* 142 (Pt 11):3305-3315.
- Buist, G., A. Steen, J. Kok, and O. P. Kuipers. 2008. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans. *Mol Microbiol* 68 (4):838-847.
- Campellone, K. G., D. Robbins, and J. M. Leong. 2004. EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. *Dev Cell* 7 (2):217-228.
- Chagnot, C., M. A. Zorgani, T. Astruc, and M. Desvaux. 2013. Proteinaceous determinants of surface colonization in bacteria: bacterial adhesion and biofilm formation from a protein secretion perspective. *Front Microbiol* 4:303.

- Coburn, B., I. Sekirov, and B. B. Finlay. 2007. Type III secretion systems and disease. *Clin Microbiol Rev* 20 (4):535-549.
- Coote, J. G. 1992. Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 8 (2):137-161.
- Crane, J. K., B. P. McNamara, and M. S. Donnenberg. 2001. Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic Escherichia coli. *Cell Microbiol* 3 (4):197-211.
- Croxen, M. A., and B. B. Finlay. 2010. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8 (1):26-38.
- Cucarella, C., C. Solano, J. Valle, B. Amorena, I. Lasa, and J. R. Penades. 2001. Bap, a Staphylococcus aureus surface protein involved in biofilm formation. *J Bacteriol* 183 (9):2888-2896.
- Dahan, S., S. Wiles, R. M. La Ragione, A. Best, M. J. Woodward, M. P. Stevens, R. K. Shaw, Y. Chong, S. Knutton, A. Phillips, and G. Frankel. 2005. EspJ is a prophage-carried type III effector protein of attaching and effacing pathogens that modulates infection dynamics. *Infect Immun* 73 (2):679-686.
- Delepelaire, P. 2004. Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta* 1694 (1-3):149-161.
- Dong, T., and H. E. Schellhorn. 2009. Global effect of RpoS on gene expression in pathogenic Escherichia coli O157:H7 strain EDL933. *BMC Genomics* 10:349.
- Donnenberg, M. S. 2013. *Escherichia coli Pathotypes and Principles of Pathogenesis*. 2ND EDITION ed.
- Doughty, S., J. Sloan, V. Bennett-Wood, M. Robertson, R. M. Robins-Browne, and E. L. Hartland. 2002. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic Escherichia coli. *Infect Immun* 70 (12):6761-6769.
- Duguid, J. P., E. S. Anderson, and I. Campbell. 1966. Fimbriae and adhesive properties in Salmonellae. *J Pathol Bacteriol* 92 (1):107-138.
- Erdem, A. L., F. Avelino, J. Xicohtencatl-Cortes, and J. A. Giron. 2007. Host protein binding and adhesive properties of H6 and H7 flagella of attaching and effacing Escherichia coli. *J Bacteriol* 189 (20):7426-7435.

- Etienne-Mesmin, L., B. Chassaing, P. Sauvanet, J. Denizot, S. Blanquet-Diot, A. Darfeuille-Michaud, N. Pradel, and V. Livrelli. 2011. Interactions with M cells and macrophages as key steps in the pathogenesis of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *PLoS One* 6 (8):e23594.
- Evans, L. D., C. Hughes, and G. M. Fraser. 2014. Building a flagellum outside the bacterial cell. *Trends Microbiol* 22 (10):566-572.
- Falguieres, T., F. Mallard, C. Baron, D. Hanau, C. Lingwood, B. Goud, J. Salamero, and L. Johannes. 2001. Targeting of Shiga toxin B-subunit to retrograde transport route in association with detergent-resistant membranes. *Mol Biol Cell* 12 (8):2453-2468.
- Fatima, R., and M. Aziz. 2018. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC).
- Fink, R. C., E. P. Black, Z. Hou, M. Sugawara, M. J. Sadowsky, and F. Diez-Gonzalez. 2012. Transcriptional responses of *Escherichia coli* K-12 and O157:H7 associated with lettuce leaves. *Appl Environ Microbiol* 78 (6):1752-1764.
- Foster, J. W. 2004. *Escherichia coli* acid resistance: tales of an amateur acidophile. *Nat Rev Microbiol* 2 (11):898-907.
- Francis, D. H., J. E. Collins, and J. R. Duimstra. 1986. Infection of gnotobiotic pigs with an *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with an outbreak of hemorrhagic colitis. *Infect Immun* 51 (3):953-956.
- Franzin, F. M., and M. P. Sircili. 2015. Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation. *Biomed Res Int* 2015:534738.
- Fraser, M. E., M. M. Chernaia, Y. V. Kozlov, and M. N. James. 1994. Crystal structure of the holotoxin from *Shigella dysenteriae* at 2.5 Å resolution. *Nat Struct Biol* 1 (1):59-64.
- Fraser, M. E., M. Fujinaga, M. M. Cherney, A. R. Melton-Celsa, E. M. Twiddy, A. D. O'Brien, and M. N. James. 2004. Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* 279 (26):27511-27517.
- Garnett, J. A., V. I. Martinez-Santos, Z. Saldana, T. Pape, W. Hawthorne, J. Chan, P. J. Simpson, E. Cota, J. L. Puente, J. A. Giron, and S. Matthews. 2012. Structural insights into the biogenesis and biofilm formation

- by the Escherichia coli common pilus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109 (10):3950-3955.
- Garnett, J. A., and S. Matthews. 2012. Interactions in bacterial biofilm development: a structural perspective. *Curr Protein Pept Sci* 13 (8):739-755.
- Garred, O., B. van Deurs, and K. Sandvig. 1995. Furin-induced cleavage and activation of Shiga toxin. *J Biol Chem* 270 (18):10817-10821.
- Gaytan, M. O., V. I. Martinez-Santos, E. Soto, and B. Gonzalez-Pedrajo. 2016. Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* 6:129.
- Gerlach, R. G., N. Claudio, M. Rohde, D. Jackel, C. Wagner, and M. Hensel. 2008. Cooperation of Salmonella pathogenicity islands 1 and 4 is required to breach epithelial barriers. *Cell Microbiol* 10 (11):2364-2376.
- Gerlach, R. G., and M. Hensel. 2007. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol* 297 (6):401-415.
- Giaouris, E., E. Heir, M. Desvaux, M. Hebraud, T. Moretro, S. Langsrud, A. Doulgeraki, G. J. Nychas, M. Kacaniova, K. Czaczyk, H. Olmez, and M. Simoes. 2015. Intra- and inter-species interactions within biofilms of important foodborne bacterial pathogens. *Front Microbiol* 6:841.
- Griessl, M. H., B. Schmid, K. Kessler, C. Braunsmann, R. Ritter, B. Barlag, Y. D. Stierhof, K. U. Sturm, C. Danzer, C. Wagner, T. E. Schaffer, H. Sticht, M. Hensel, and Y. A. Muller. 2013. Structural insight into the giant Ca(2)(+)-binding adhesin SiiE: implications for the adhesion of Salmonella enterica to polarized epithelial cells. *Structure* 21 (5):741-752.
- Gruenheid, S., I. Sekirov, N. A. Thomas, W. Deng, P. O'Donnell, D. Goode, Y. Li, E. A. Frey, N. F. Brown, P. Metalnikov, T. Pawson, K. Ashman, and B. B. Finlay. 2004. Identification and characterization of NleA, a non-LEE-encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7. *Mol Microbiol* 51 (5):1233-1249.
- Henderson, I. R., and J. P. Nataro. 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* 69 (3):1231-1243.
- Herold, S., J. C. Paton, and A. W. Paton. 2009. Sab, a novel autotransporter of locus of enterocyte effacement-negative shiga-toxigenic

- Escherichia coli O113:H21, contributes to adherence and biofilm formation. *Infect Immun* 77 (8):3234-3243.
- Humphries, R. M., and A. J. Linscott. 2015. Laboratory diagnosis of bacterial gastroenteritis. *Clin Microbiol Rev* 28 (1):3-31.
- Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall, and J. B. Kaper. 1990. A genetic locus of enteropathogenic Escherichia coli necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 (20):7839-7843.
- Joly, B. S., P. Coppo, and A. Veyradier. 2017. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood* 129 (21):2836-2846.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley. 2004. Pathogenic Escherichia coli. *Nat Rev Microbiol* 2 (2):123-140.
- Kelly, G., S. Prasannan, S. Daniell, K. Fleming, G. Frankel, G. Dougan, I. Connerton, and S. Matthews. 1999. Structure of the cell-adhesion fragment of intimin from enteropathogenic Escherichia coli. *Nat Struct Biol* 6 (4):313-318.
- Kenny, B., and M. Jepson. 2000. Targeting of an enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) effector protein to host mitochondria. *Cell Microbiol* 2 (6):579-590.
- Kiarash, A., B. Boyd, and C. A. Lingwood. 1994. Glycosphingolipid receptor function is modified by fatty acid content. Verotoxin 1 and verotoxin 2c preferentially recognize different globotriaosyl ceramide fatty acid homologues. *J Biol Chem* 269 (15):11138-11146.
- Lasa, I., and J. R. Penades. 2006. Bap: a family of surface proteins involved in biofilm formation. *Res Microbiol* 157 (2):99-107.
- Latasa, C., A. Roux, A. Toledo-Arana, J. M. Ghigo, C. Gamazo, J. R. Penades, and I. Lasa. 2005. BapA, a large secreted protein required for biofilm formation and host colonization of Salmonella enterica serovar Enteritidis. *Mol Microbiol* 58 (5):1322-1339.
- Law, D. 2000. Virulence factors of Escherichia coli O157 and other Shiga toxin-producing E. coli. *J Appl Microbiol* 88 (5):729-745.
- Lee, M. S., and V. L. Tesh. 2019. Roles of Shiga Toxins in Immunopathology. *Toxins (Basel)* 11 (4).
- Levine, M. M. 1987. Escherichia coli that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* 155 (3):377-389.

- Lewis, S. B., V. Cook, R. Tighe, and S. Schuller. 2015. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* colonization of human colonic epithelium in vitro and ex vivo. *Infect Immun* 83 (3):942-949.
- Lim, J. Y., H. J. La, H. Sheng, L. J. Forney, and C. J. Hovde. 2010a. Influence of plasmid pO157 on *Escherichia coli* O157:H7 Sakai biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 76 (3):963-966.
- Lim, J. Y., J. Yoon, and C. J. Hovde. 2010b. A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol* 20 (1):5-14.
- Lin, J., M. P. Smith, K. C. Chapin, H. S. Baik, G. N. Bennett, and J. W. Foster. 1996. Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 62 (9):3094-3100.
- Lucchesi, P. M., A. Kruger, and A. E. Parma. 2006. Distribution of saa gene variants in verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from cattle and food. *Res Microbiol* 157 (3):263-266.
- Mahajan, A., C. G. Currie, S. Mackie, J. Tree, S. McAteer, I. McKendrick, T. N. McNeilly, A. Roe, R. M. La Ragione, M. J. Woodward, D. L. Gally, and D. G. Smith. 2009. An investigation of the expression and adhesin function of H7 flagella in the interaction of *Escherichia coli* O157 : H7 with bovine intestinal epithelium. *Cell Microbiol* 11 (1):121-137.
- Marches, O., T. N. Ledger, M. Boury, M. Ohara, X. Tu, F. Goffaux, J. Mainil, I. Rosenshine, M. Sugai, J. De Rycke, and E. Oswald. 2003. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Mol Microbiol* 50 (5):1553-1567.
- McWilliams, B. D., and A. G. Torres. 2014a. EHEC Adhesins. *Microbiol Spectr* 2 (2):EHEC00032013.
- . 2014b. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Adhesins. *Microbiol Spectr* 2 (3).
- Mokomane, M., I. Kasvosve, E. de Melo, J. M. Pernica, and D. M. Goldfarb. 2018. The global problem of childhood diarrhoeal diseases: emerging strategies in prevention and management. *Ther Adv Infect Dis* 5 (1):29-43.
- Morita, Y., E. Komoda, K. Ono, and S. Kumagai. 2011. Survival of biofilm-forming *Salmonella* on stainless steel bolt threads under dry conditions. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 52 (5):299-303.

- Moxley, R. A. 2004. Escherichia coli O157:H7: an update on intestinal colonization and virulence mechanisms. *Anim Health Res Rev* 5 (1):15-33.
- Navarre, W. W., and O. Schneewind. 1994. Proteolytic cleavage and cell wall anchoring at the LPXTG motif of surface proteins in gram-positive bacteria. *Mol Microbiol* 14 (1):115-121.
- Nguyen, Y., and V. Sperandio. 2012. Enterohemorrhagic E. coli (EHEC) pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol* 2:90.
- O'Brien, A. D., L. R. Marques, C. F. Kerry, J. W. Newland, and R. K. Holmes. 1989. Shiga-like toxin converting phage of enterohemorrhagic Escherichia coli strain 933. *Microb Pathog* 6 (5):381-390.
- O'Brien, A. D., J. W. Newland, S. F. Miller, R. K. Holmes, H. W. Smith, and S. B. Formal. 1984. Shiga-like toxin-converting phages from Escherichia coli strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. *Science* 226 (4675):694-696.
- Okeke, I. N., and J. P. Nataro. 2001. Enteroaggregative Escherichia coli. *Lancet Infect Dis* 1 (5):304-313.
- Olsen, A., A. Jonsson, and S. Normark. 1989. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on Escherichia coli. *Nature* 338 (6217):652-655.
- Paton, A. W., P. Srimanote, M. C. Woodrow, and J. C. Paton. 2001. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic Escherichia coli strains that are virulent for humans. *Infect Immun* 69 (11):6999-7009.
- Pawar, D. M., M. L. Rossman, and J. Chen. 2005. Role of curli fimbriae in mediating the cells of enterohaemorrhagic Escherichia coli to attach to abiotic surfaces. *J Appl Microbiol* 99 (2):418-425.
- Price, S. B., J. C. Wright, F. J. DeGraves, M. P. Castanie-Cornet, and J. W. Foster. 2004. Acid resistance systems required for survival of Escherichia coli O157:H7 in the bovine gastrointestinal tract and in apple cider are different. *Appl Environ Microbiol* 70 (8):4792-4799.
- Pruimboom-Brees, I. M., T. W. Morgan, M. R. Ackermann, E. D. Nystrom, J. E. Samuel, N. A. Cornick, and H. W. Moon. 2000. Cattle lack vascular receptors for Escherichia coli O157:H7 Shiga toxins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (19):10325-10329.

- Rendon, M. A., Z. Saldana, A. L. Erdem, V. Monteiro-Neto, A. Vazquez, J. B. Kaper, J. L. Puente, and J. A. Giron. 2007. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (25):10637-10642.
- Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 308 (12):681-685.
- Romling, U., Z. Bian, M. Hammar, W. D. Sierralta, and S. Normark. 1998. Curli fibers are highly conserved between *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* with respect to operon structure and regulation. *J Bacteriol* 180 (3):722-731.
- Rosove, M. H. 2014. Thrombotic microangiopathies. *Semin Arthritis Rheum* 43 (6):797-805.
- Ryu, J. H., and L. R. Beuchat. 2005. Biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel: effect of exopolysaccharide and Curli production on its resistance to chlorine. *Appl Environ Microbiol* 71 (1):247-254.
- Sambrook, J., and D. W. Russell. 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd ed. 3 vols. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schuller, S. 2011. Shiga toxin interaction with human intestinal epithelium. *Toxins (Basel)* 3 (6):626-639.
- Skorstengaard, K., M. S. Jensen, P. Sahl, T. E. Petersen, and S. Magnusson. 1986. Complete primary structure of bovine plasma fibronectin. *Eur J Biochem* 161 (2):441-453.
- Slater, S. L., A. M. Sagfors, D. J. Pollard, D. Ruano-Gallego, and G. Frankel. 2018. The Type III Secretion System of Pathogenic *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol* 416:51-72.
- Soto, G. E., and S. J. Hultgren. 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol* 181 (4):1059-1071.
- Terpe, K. 2003. Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60 (5):523-533.
- Thanabalasuriar, A., A. Koutsouris, A. Weflen, M. Mimee, G. Hecht, and S. Gruenheid. 2010. The bacterial virulence factor NleA is required for

- the disruption of intestinal tight junctions by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 12 (1):31-41.
- Thomas, D. E., and E. J. Elliott. 2013. Interventions for preventing diarrhea-associated hemolytic uremic syndrome: systematic review. *BMC Public Health* 13:799.
- Thompson, J. S., D. S. Hodge, and A. A. Borczyk. 1990. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype O157. *J Clin Microbiol* 28 (10):2165-2168.
- Torres, A. G., J. A. Giron, N. T. Perna, V. Burland, F. R. Blattner, F. Avelino-Flores, and J. B. Kaper. 2002. Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* 70 (10):5416-5427.
- Torres, A. G., K. J. Kanack, C. B. Tutt, V. Popov, and J. B. Kaper. 2004. Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *E. coli* strains. *FEMS Microbiol Lett* 238 (2):333-344.
- Torres, A. G., L. Milflores-Flores, J. G. Garcia-Gallegos, S. D. Patel, A. Best, R. M. La Ragione, Y. Martinez-Laguna, and M. J. Woodward. 2007. Environmental regulation and colonization attributes of the long polar fimbriae (LPF) of *Escherichia coli* O157:H7. *Int J Med Microbiol* 297 (3):177-185.
- Tu, X., I. Nisan, C. Yona, E. Hanski, and I. Rosenshine. 2003. EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 47 (3):595-606.
- Walter, S. 2002. Structure and function of the GroE chaperone. *Cell Mol Life Sci* 59 (10):1589-1597.
- Wang, G., and M. P. Doyle. 1998. Heat shock response enhances acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 26 (1):31-34.
- Wang, S., S. Zhang, Z. Liu, P. Liu, Z. Shi, J. Wei, D. Shao, B. Li, and Z. Ma. 2014. Molecular characterization of enterohemorrhagic *E. coli* O157 isolated from animal fecal and food samples in Eastern China. *ScientificWorldJournal* 2014:946394.
- Wasey, A., and P. Salen. 2019. *Escherichia Coli (E Coli 0157 H7)*. In *StatPearls*. Treasure Island (FL).

- Waterman, S. R., and P. L. Small. 1996. Characterization of the acid resistance phenotype and rpoS alleles of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* 64 (7):2808-2811.
- Watters, C., D. Fleming, D. Bishop, and K. P. Rumbaugh. 2016. Host Responses to Biofilm. *Prog Mol Biol Transl Sci* 142:193-239.
- Wells, T. J., O. Sherlock, L. Rivas, A. Mahajan, S. A. Beatson, M. Torpdahl, R. I. Webb, L. P. Allsopp, K. S. Gobius, D. L. Gally, and M. A. Schembri. 2008. EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. *Environ Microbiol* 10 (3):589-604.
- WHO. 2018. *Diarrhoeal disease* 2017 [cited 2018]. Available from <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>.
- Woodcock, D. M., P. J. Crowther, J. Doherty, S. Jefferson, E. DeCruz, M. Noyer-Weidner, S. S. Smith, M. Z. Michael, and M. W. Graham. 1989. Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* 17 (9):3469-3478.
- Xicohtencatl-Cortes, J., V. Monteiro-Neto, M. A. Ledesma, D. M. Jordan, O. Francetic, J. B. Kaper, J. L. Puente, and J. A. Giron. 2007. Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Clin Invest* 117 (11):3519-3529.
- Yousef, F., and M. Espinosa-Urgel. 2007. In silico analysis of large microbial surface proteins. *Res Microbiol* 158 (6):545-550.
- Yu, J., and J. B. Kaper. 1992. Cloning and characterization of the eae gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* 6 (3):411-417.