

Evaluación de la capacidad de promotores eucariotas bacteriofágicos en organismos eucariotas

Rivero, CI(3); Alipio, A(1); Simonin, JA(4); Motta, LF(4); Cuccovia, FU(4); Henrot, C(2); Cerrudo, CS(4); Belaich, MN(4); Goldstein, J(1); Petit, MA(2); Bentancor, L(3).

(1) Instituto de Fisiología y Biofísica “Houssay”; (IFIBIO), Laboratorio de Neurofisiopatología, Universidad de Buenos Aires-CONICET; (2) INRAE, AgroParisTech, Micalis institute, Université Paris-Saclay; (3) Instituto de Estudios para el Desarrollo Productivo y la Innovación, Universidad Nacional de José Clemente Paz; (4) Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Molecular, Instituto de Microbiología Básica y Aplicada, Universidad Nacional de Quilmes.
Contacto: carlairivero@gmail.com

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) es una consecuencia de las infecciones por *Escherichia coli* productora de toxina Shiga (STEC). La toxina shiga (Stx) es el principal factor de virulencia en STEC, cuyos genes, *stxA* y *stxB*, se encuentran codificados en el profago 933W. Previamente, se identificó un promotor putativo eucariota *upstream* del gen *stxA* en 933W (pr1), sobre el cual se realizó una mutación en el elemento TATAbox predicho, que derivó en la pérdida de su funcionalidad en células eucariotas, previniendo así la expresión de Stx en un entorno eucariota. Mediante estudios en un modelo animal, pudimos observar que el rol del reconocimiento de dicho promotor es relevante en el desarrollo del SUH (Bentancor *et al.*, 2013b; Del Cogliano *et al.*, 2018). Para continuar estos estudios, se infectaron ratones *germ-free* con una cepa de *E. coli* no patógena portadora del bacteriófago 933W (C600?933W) y con otra cepa portadora del bacteriófago 933W con el promotor pr1 mutado (C600?933W:?pr1). En estudios *in vivo* se observó un aumento significativo en la detección de partículas de fago y Stx en los cerebros de los ratones infectados con C600?933W, en comparación con C600?933WT:?pr1. Además, los marcadores de daño cerebral por inmunofluorescencia también aumentaron significativamente en los ratones con un promotor pr1 intacto. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la expresión de Stx desde el promotor pr1 en las células huésped podría ser importante en el desarrollo del SUH. Debido a la importancia de los promotores funcionales en células eucariotas en bacteriófagos asociados a infecciones, de importancia en la salud pública, se procedió al estudio del bacteriófago (Pf) de *Pseudomonas aeruginosa* (Pa). *Pseudomonas aeruginosa* es una especie de bacteria gram-negativa que se encuentran en infecciones de heridas, úlceras por presión y quemaduras, responsables de una gran morbilidad y mortalidad. Previamente, se demostró que en los sitios de infección por Pa, se produce en abundancia el bacteriófago filamentoso Pf (Webb *et al.*, 2004; Secor *et al.*, 2016). Considerando que anteriormente se describió la expresión de Stx en células eucariotas después de que se transfectaran *in vitro* con el gen *stx2* clonado en un plásmido procariota (Bentancor *et al.*, 2013), se procedió a identificar potenciales promotores

eucariotas presentes en el genoma del bacteriófago Pf. Se identificaron tres regiones de interés que fueron evaluadas como posibles promotores eucariotas, transfectando células HEK-293 con plásmidos que codificaban GFP bajo el control de dichas secuencias. Se observó actividad promotora mediante la expresión de GFP en células eucariotas. Estos resultados confirman la importancia de un análisis exhaustivo de secuencias de bacteriófagos portadores de toxinas y los utilizados en fagoterapia. Por este motivo nos encontramos desarrollando un software que permitirá identificar posibles promotores eucariotas en genomas de bacteriófagos.