



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE  
PUEBLA**



**FACULTAD DE MEDICINA  
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA**

**Papel de la proteína ANREP sobre la función de  
PerA en *Escherichia coli* enteropatógena**

**Para obtener el título de:  
Licenciado en Biomedicina**

**Presenta:  
Amin Mora García**

**Directora de tesis:  
M. en C. Cristina Lara Ochoa**

Heroica Puebla de Zaragoza, 2022

*“Con voluntad, humildad y resiliencia se puede hacer posible  
lo imposible”*

*Enrique Llimona*

# AGRADECIMIENTOS

A la vida por existir, ser feliz, esforzarme, ser resiliente y no rendirme sin luchar.

A mí mismo por ser perseverante y luchar cada día por mis objetivos y metas.

A mis padres: Silvia y Mario por darme toda la fortaleza, apoyo, cariño y el amor para seguir adelante en mi vida. Gracias al apoyo económico que me brindó mi madre durante los cinco años de la carrera logré culminar mi formación académica universitaria y cumplir uno de los objetivos en mi vida. También por enseñarme el duro esfuerzo para ganarse el dinero. A mi padre por ser un buen padre y enseñarme a ser humilde, darme amor, por la educación que me inculcó y sobre todo a valorar a las personas por lo que son y no por lo que tienen.

A mis hermanos: Michel y Mary por su compañía y por apoyarme en mis objetivos y metas en mi vida.

A mis amigos Javi, Obeth, Chris y mis demás amigos: a abonar en mi vida, escucharme cuando lo necesite, a apoyarme en uno de los momentos más difíciles de mi vida y al ser verdaderos amigos en las buenas y las malas.

A la Fundación Espinosa Rugarcía por brindarle un apoyo económico a mi padre y a mí, para concluir exitosamente mi formación universitaria.

A mis compañeros de laboratorio por ayudarme, apoyarme en la parte académica y aquellos con los que tuve más acercamiento a olvidarme un rato de mis problemas y a divertirme entre momentos.

A mis compañeros de biomedicina de la generación 2015 del eje terminal de microbiología por ser unidos y ayudarnos, a pesar de nuestras diferencias.

Al Centro de Detección Biomolecular y al personal administrativo por acogerme como un miembro más y apoyarme con lo de mi padre. En especial a Doña Rosy, por sentirme apoyado y escucharme en los momentos difíciles. Y a la Dra. Lilia Cedillo por sus ánimos, su bondad y su respeto.

A la Mtra. Cristina por aceptarme como miembro del laboratorio, por su apoyo en mi formación terminal y por enseñarme su pasión en la regulación bacteriana. Además, por su paciencia (de las veces que la regaba en el lab). Por enseñarme varias cosas importantes: anotar hasta el mínimo detalle en mi bitácora, a aprenderme el fundamento de las técnicas, a no hablar sin ningún fundamento y, por último, a ser directo con los problemas personales y académicos.

A la Dra. Claudia y la Dra. Baca, por dedicarle tiempo en la revisión de este trabajo, por enseñarme su pasión y entusiasmo por los microorganismos.

A todas aquellas personas malas y buenas que ha pasado en mi vida y de las cuales he aprendido un poco.

Finalmente, a Sele por ser un excelente ser humano, apoyarme en las buenas y en las malas, a ser una mejor versión de mí mismo, escucharme, darme consejos, a respetar y querer a los animales (perros y gatos) y por compartir momentos felices y tristes.

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	4
LISTA DE FIGURAS .....	6
LISTA DE TABLAS .....	7
RESUMEN .....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
1.1 <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC) .....	11
1.1.2 Mecanismo de patogenicidad de EPEC .....	14
ANTECEDENTES .....	19
2.1 Antecedentes generales .....	19
2.1 Antecedentes específicos .....	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	31
4. HIPÓTESIS .....	32
5. OBJETIVOS.....	32
5.1 Objetivo general .....	32
5.2 Objetivos particulares.....	32
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	33
6.1 Cepas y condiciones de crecimiento .....	33
6.2 Análisis bioinformáticos .....	34
6.3 Sobreexpresión y purificación de proteínas MBP-PerA y ANREP-6XH.....	34
6.4 Diálisis y concentración de la proteína MBP-PerA y ANREP-6XH .....	35
6.5 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford .....	36
6.6 Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA) .....	36
6.7 Ensayo de interacción proteína-proteína por “pull-down”.....	37
6.8 “Western Blot” .....	37

6.9 Generación de anticuerpos policlonales para detectar a ANREP .....	38
7. RESULTADOS .....	39
7.1 Análisis bioinformáticos .....	39
7.1.1 Búsqueda <i>in silico</i> de la interacción entre ANREP y PerA .....	39
7.1.2 Búsqueda de los posibles sitios de interacción entre ANREP y PerA .....	41
7.1.3 Estimación de la afinidad entre ANREP y PerA.....	43
7.1.4 Predicción de las estructuras terciarias de ANREP y PerA .....	44
7.1.5 Estudios de acoplamiento molecular de ANREP y PerA.....	47
7.2 Interacción entre ANREP y PerA por “Pull-down” .....	50
7.2.1 Purificación de la proteína MBP-PerA .....	50
7.2.2 Purificación de la proteína ANREP-6XH .....	51
7.3 Evaluación de la funcionalidad de MBP-PerA .....	52
7.3.1 PCR de la región reguladora de <i>bfpA</i> .....	52
7.3.2 Ensayo de movilidad electroforética (EMSA) .....	53
7.4 Evaluación de la interacción proteína-proteína entre ANREP y PerA .....	55
7.5 Efecto de la interacción entre ANREP y PerA sobre la capacidad de esta última para unirse al ADN.....	56
7.6 Generación de anticuerpos policlonales para detectar a ANREP .....	59
8. DISCUSIÓN.....	60
9. CONCLUSIONES.....	67
10. PERSPECTIVAS .....	68
11. BIBLIOGRAFÍA .....	69
12. ANEXOS .....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS

**A/E:** Adherencia y destrucción (Attaching and Effacing)

**AAF:** Fimbria de adherencia agregativa (Aggregative Adherence Fimbriae)

**Aar:** Regulador activado por AggR (AggR-activated regulator)

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**AL:** Adherencia Localizada

**ANR:** Regulador negativo de la familia AraC (AraC Negative Regulator)

**ATPasa:** Adenosina trifosfatasa

**BFP:** Pili formador de mechones (Bundle forming pilus)

**DMEM:** Medio de Eagle modificado por Dulbecco (Dullbecco's Modified Eagle Medium")

**EAF:** Factor de adherencia de EPEC (EPEC Adherence Factor)

**ECP:** Pili común de *E. coli* (E. coli common pilus)

**Esc:** Proteínas de secreción de *E. coli* (E. coli secretion)

**Esp:** Proteínas secretadas por EPEC (EPEC secreted proteins)

**GrlA:** Regulador global de LEE-activador (Global Regulator of LEE Activator)

**GrlR:** Regulador global de LEE-represor (Global Regulator of LEE Repressor)

**H-NS:** Proteína estructural del nucleoide parecido a histonas (Histone-like nucleoid-structuring protein)

**HTH:** Hélice-vuelta-Hélice (Helix-turn-helix)

**kDa:** KiloDalton

**LEE:** Locus de borrado y destrucción del enterocito (Locus of Enterocyte Effacement)

**Ler:** Regulador codificado en LEE (LEE encoded regulator)

**Map:** Proteína asociada a la mitocondria (Mitochondrion-associated protein)

**MBP:** Proteína unidora de maltosa (Maltose Binding Protein)

**mg:** Miligramos

**ml:** Mililitros

**mM:** Milimolar

**Nle:** Proteína no codificada en LEE (Non-LEE encoded effector)

**ORF:** Marco de lectura abierto (Open reading frame)

**pAA:** Plásmido de adherencia agregativa (Aggregative adherence plasmid)

**pb:** Pares de bases

**PBS:** Regulador salino de fosfatos (Phosphate buffered saline)

**PBST:** Regulador salino de fosfatos-Tween (Phosphate buffered saline/Twen)

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase chain reaction)

**per:** Regulador codificado en plásmido (Plasmid-encoded regulator)

**SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)

**SEP:** Proteínas de Secreción de *E. coli* (Secretion E. coli proteins)

**SST2:** Sistema de secreción tipo II

**SST3:** Sistema de secreción tipo III

**Tir:** Receptor de la Intimina translocado (Translocated intimin receptor)

**Tm:** Temperatura de alineamiento (Melting temperature)

**WT:** Cepa silvestre (Wild type)

**µg:** Microgramos

**µl:** Microlitros

**°C:** grados centígrados

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Patotipos de <i>E. coli</i> diarreogénicas. ....	10
Figura 2. Principales elementos genéticos que contribuyen a la virulencia de EPEC.....	13
Figura 3. Mecanismo de patogenicidad de EPEC. ....	18
Figura 4. Modelo de regulación actual en EPEC sobre los genes de virulencia codificados en la isla LEE y pEAF.....	20
Figura 5. Esquema representativo de la estructura general de miembros de la familia AraC/XylS .....	23
Figura 6. Árbol filogenético de homólogos de Aar en patógenos Gram negativos.....	25
Figura 7. Modelo de regulación de los genes de virulencia de EAEC .....	27
Figura 8. Comparación entre ANREP y Aar. ....	29
Figura 9. Efecto de ANREP sobre el perfil de proteínas secretadas de EPEC.....	30
Figura 10. Efecto de ANREP sobre la expresión de BfpA y EspA en EPEC .....	30
Figura 11. Predicción de la interacción proteína-proteína entre ANREP y PerA mediante PSOPIA .....	40
Figura 12. Sitios probables de interacción entre ANREP y PerA .....	42
Figura 13. Predicción de las estructuras terciarias de ANREP y PerA .....	46
Figura 14. Modelo de acoplamiento molecular de ANREP-PerA y Aar-AggR.....	48
Figura 15. Modelo de predicción de la interacción proteína-proteína de ANREP-PerA y Aar-AggR.....	49
Figura 16. Purificación de la proteína MBP-PerA .....	50
Figura 17. Purificación de la proteína ANREP-6XH .....	52
Figura 18. PCR de las región reguladora de <i>bfpA</i> . ....	53
Figura 19. Ensayo de movilidad electroforética (EMSA).....	54
Figura 20. Ensayo de “pull-down” entre ANREP-6XH y MBP-PerA.....	55

Figura 21. Modelo de la interacción entre ANREP y PerA sobre la capacidad de esta última para unirse al ADN blanco. ....	58
Figura 22. Modelo de la actividad de ANREP en el mecanismo de regulación de los genes de virulencia de EPEC.....	66

## **LISTA DE TABLAS**

Tabla 1. Proteínas efectoras traslocadas por el SST3 de EPEC .....	16
Tabla 2. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo. ....	33
Tabla 3. Oligonúcleotidos empleados en este trabajo .....	33
Tabla 4. Concentración estándar para cuantificación por Bradford. ....	36
Tabla 5. Sitios probables de interacción entre ANREP con reguladores de virulencia detectados por “iFrag” .....	43

## RESUMEN

*Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) es uno de los principales causantes de diarrea en niños menores de 5 años en países en vías de desarrollo. La colonización de EPEC en el epitelio intestinal induce dos fenotipos característicos: la adherencia localizada (AL) y la lesión de adherencia y destrucción (A/E). Los componentes genéticos requeridos para el desarrollo de estos fenotipos están codificados en el plásmido EAF (EPEC adherence factor) y en la isla de patogenicidad LEE (Locus of Enterocyte Effacement). La expresión de los genes de virulencia, ubicados en estos elementos genéticos, responden a una gran variedad de factores ambientales y están bajo el control de diversas proteínas reguladoras, una de ellas es PerA (Plasmid Encoded Regulator A), una proteína perteneciente a la familia AraC/XylS que activa su propia expresión y la del operón *bfp* involucrado en la formación de la fimbria BFP (Bundle Forming Pilus). PerA activa también la expresión a nivel transcripcional del regulador PerC y éste a su vez modula de manera positiva a los genes de la isla LEE, a través del regulador Ler (LEE Encoded Regulator).

De manera interesante, existe una familia de anti-activadores identificada como ANR (AraC Negative Regulators) que tienen un efecto represor sobre los reguladores de la familia AraC/XylS. El miembro prototipo de esta familia es Aar (AggR-activated regulator), presente en *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y que tiene la función de interactuar directamente con AggR (Aggregative Regulator), un regulador AraC/XylS que activa a nivel transcripcional la expresión de más de 112 genes, de los cuales la mayoría están implicados en la virulencia de EAEC. Tal interacción evita que AggR se una al ADN suprimiendo su función como activador.

En este sentido, en nuestro grupo de trabajo nos interesamos en el estudio de una proteína que pertenece a esta familia ANR y que nombramos como ANREP, presente en la bacteria EPEC. A través de estudios previos, identificamos que ANREP tiene un efecto negativo sobre la transcripción de *perA*, de genes regulados por PerA, así como de genes ubicados en la isla LEE. Además, el mismo comportamiento represivo de ANREP se observó a nivel de la expresión de proteínas sobre algunos de los componentes del SST3 y de la fimbria BFP. De manera adicional, la transcripción del gen que codifica para ANREP ocurre a niveles mayores cuando EPEC es cultivada en presencia de sales de amonio, lo que sugiere un papel importante de ANREP como represor de PerA en dichas condiciones.

Por lo anterior, debido al efecto que ejerce ANREP sobre un regulador de virulencia esencial de EPEC como lo es PerA, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el papel que tiene ANREP sobre la función de PerA mediante el análisis de la interacción proteína-proteína. Para ello, primero se realizaron análisis bioinformáticos para predecir la posible interacción entre ANREP y PerA, así como para determinar los probables sitios de interacción entre ambas proteínas. Asimismo, se realizaron ensayos de “pull-down” para investigar experimentalmente la interacción proteína-proteína. Los resultados obtenidos de los análisis *in silico* arrojaron valor predictivos altos que sugieren que ANREP y PerA interactúan, los sitios probables de dicha interacción comprenden del aminoácido 21 a 67 en ANREP, en donde se encuentran residuos (A22, W26, A29, W43 y R47) que muestran un alto grado de conservación entre los miembros de la familia ANR. Respecto de PerA, se obtuvo que la región que incluye de los aminoácidos 116 a 172 podrían estar involucrados en la interacción con ANREP, dicha región comprende el sitio conector, así como la parte final del extremo amino y la parte inicial del carboxilo terminal de PerA.

Adicionalmente, estos análisis bioinformáticos sugieren que ANREP podría también interactuar con otros reguladores de virulencia importantes en esta bacteria como: Ler, GrlA y H-NS; respecto de H-NS coincide con lo reportado para Aar en EAEC.

Finalmente, los resultados del ensayo de interacción proteína-proteína por “Pull-down” sugieren que ANREP reprime la expresión de los genes de virulencia regulados por PerA, a través de la interacción proteína-proteína con este miembro de la familia AraC/XylS y, probablemente dicha interacción también impacte sobre la expresión de los genes ubicados en el operón *bfp* y la isla LEE.

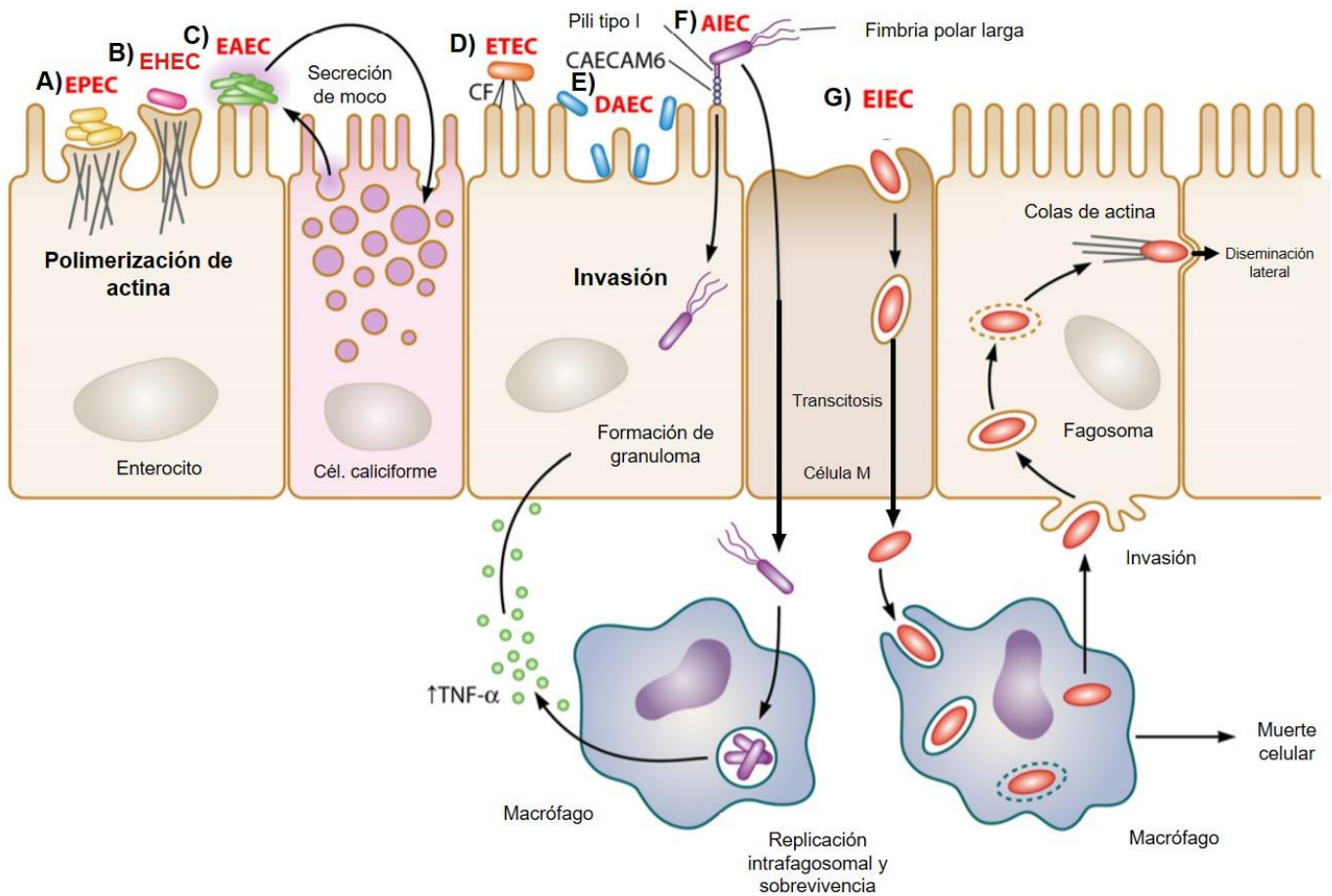
En resumen, los datos obtenidos por análisis bioinformáticos y experimentales en este trabajo, sugieren que ANREP ejerce un efecto negativo sobre la expresión de los genes de virulencia de EPEC porque atrapa a PerA, dicho mecanismo generaría como consecuencia tres posibilidades: 1) evitar que PerA interactúe con la ARNP (ARN Polimerasa) para activar la transcripción, 2) pérdida de la conformación nativa de PerA evitando que se una al ADN de los genes que regula, o 3) evitar que una molécula efectora se una al amino terminal de PerA lo que generaría una conformación inactiva para su función; en cualquiera de los casos la formación del complejo ANREP-PerA tendría como consecuencia la represión de los genes *bfp* y, de manera indirecta, de los genes LEE.

## 1. INTRODUCCIÓN

La diarrea es una causa importante de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, se estima que cada año ocurren entre 2000 a 4000 millones de episodios de diarrea (Hodges & Gill, 2010). Se define como un movimiento alterado de iones y agua por un gradiente osmótico en el epitelio intestinal (World Health Organization, 2016). Existen diferentes tipos de agentes infecciosos asociados al desarrollo de diarrea tales como: bacterias, parásitos, hongos y virus. Entre las bacterias que principalmente causan diarrea se incluyen a: *Vibrio cholerae*, *Clostridium difficile*, *Shigella flexneri*, *Escherichia coli*, entre otros (Santamaría & Toranzos, 2003).

*Escherichia coli* es un microorganismo anaerobio facultativo, no esporulante, Gram negativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Se encuentra formando parte de la microbiota intestinal del humano y de diversos animales de sangre caliente (Kaper et al. 2004). En el intestino humano, *E. coli* asegura nutrientes y un hogar; además de producir vitamina K y vitamina B12, las cuales son aprovechadas por el hospedero. En contraste, algunas cepas de *E. coli* han adquirido genes con funciones de virulencia a través de diversos mecanismos de transferencia horizontal, lo que les ha permitido colonizar nuevos nichos, causar daño y finalmente generar enfermedad (Chang et al. 2004; Kaper et al. 2004).

En la actualidad, se han descrito diez patotipos de *E. coli* que se clasifican en dos categorías: *E. coli* extraintestinal (ExPEC) y *E. coli* diarreogénicas (DEC). En el primer grupo se incluyen: *E. coli* uropatogénica (UPEC), *E. coli* asociada a sepsis (SEPEC) y *E. coli* asociada a meningitis (NMEC). Los patotipos DEC incluyen a: *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* difuso adherente (DAEC), *E. coli* adherente invasiva (AIEC) y *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) (Figura 1) (Gomes et al. 2016; Nataro & Kaper, 1998).



**Figura 1. Patotipos de *E. coli* diarreogénicas.** **A)** *E. coli* enteropatogénica (EPEC) y **B)** *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) se adhieren al epitelio intestinal y eliminan las microvellosidades, formando lesiones características A/E. Debido a la presencia de pili formadores de haces, EPEC es capaz de formar microcolonias, lo que da como resultado un patrón de adherencia localizada (AL). **C)** *E. coli* enteroagregativa (EAEC) forma biopelículas en la mucosa intestinal y las bacterias se adhieren entre sí, así como a la superficie celular para formar un patrón de adherencia agregativa (AA) conocido como "ladrillo apilado". **D)** *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) usa factores de colonización (CFs) para unirse a las células intestinales del huésped. **E)** *E. coli* difuso adherente (DAEC) se dispersa sobre las superficies de las células intestinales, lo que da como resultado un patrón de adherencia difusa (AD). **F)** *E. coli* adherente invasiva (AIEC) coloniza la mucosa intestinal de pacientes con enfermedad de Crohn, es capaz de invadir las células epiteliales y de replicarse dentro de los macrófagos. AIEC utiliza un pilus de tipo I para adherirse a las células intestinales y a las fimbrias polares largas que contribuyen a la invasión. **G)** *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) es un patógeno intracelular que penetran en el epitelio intestinal a través de las células M para acceder a la submucosa. EIEC escapa de los macrófagos submucosos mediante la inducción de la muerte celular de los macrófagos seguida de la invasión basolateral de los enterocitos y la diseminación lateral. Imagen tomada y modificada de: (Croxen et al. 2013).

### 1.1 *E. coli* enteropatógena (EPEC)

EPEC es uno de los principales patotipos causante de diarrea en niños menores de 5 años que habitan en países en vías de desarrollo, incluyendo a México (Canizalez-Roman et al. 2016). La diarrea suele estar acompañada de fiebre, vómito, pérdida de absorción de líquido, inflamación intestinal y disminución de la absorción de nutrientes (Croxen et al. 2013; Kotloff et al. 2013).

En México existen escasos estudios sobre la epidemiología de EPEC. Entre los pocos estudios, uno realizado en el estado de Sinaloa detectó 1037 casos diarreicos de los cuales el 22% correspondieron a casos de diarrea causada por EPEC, siendo el segundo patógeno mayormente aislado sólo superado por EAEC. Adicionalmente, el 70% de las cepas totales de EPEC y EAEC mostraron resistencia a algún antibiótico (Canizalez-Roman et al. 2013).

EPEC se clasifica en típicas y atípicas basado en la presencia o ausencia del plásmido de virulencia llamado EAF (EPEC Adherence Factor). Este plásmido contiene los genes *per* y *bfp* que codifican para reguladores de virulencia y para una fimbria tipo IV conocida como BFP (Bundle Forming Pili) (Donnenberg & Finlay, 2013).

La colonización de EPEC sucede en el intestino delgado, sitio en el que genera un patrón de adherencia característico basado en la formación de microcolonias conocido como "adherencia localizada" (AL), esta etapa es dependiente de la fimbria BFP. Otro fenotipo característico causado por EPEC es la capacidad para formar lesiones intestinales conocidas como de adherencia y destrucción (A/E) (Ataching and Effacing), las cuales se distinguen por la adherencia íntima de las bacterias en la parte apical de los enterocitos, formación de pedestales ricos en actina debajo de los sitios de unión de la bacteria y destrucción de las microvellosidades; todo esto contribuye a la pérdida de la superficie de absorción en el intestino y como consecuencia a la aparición de diarrea (Gomes et al. 2016; Kaper et al. 2004; Sohel et al. 1996).

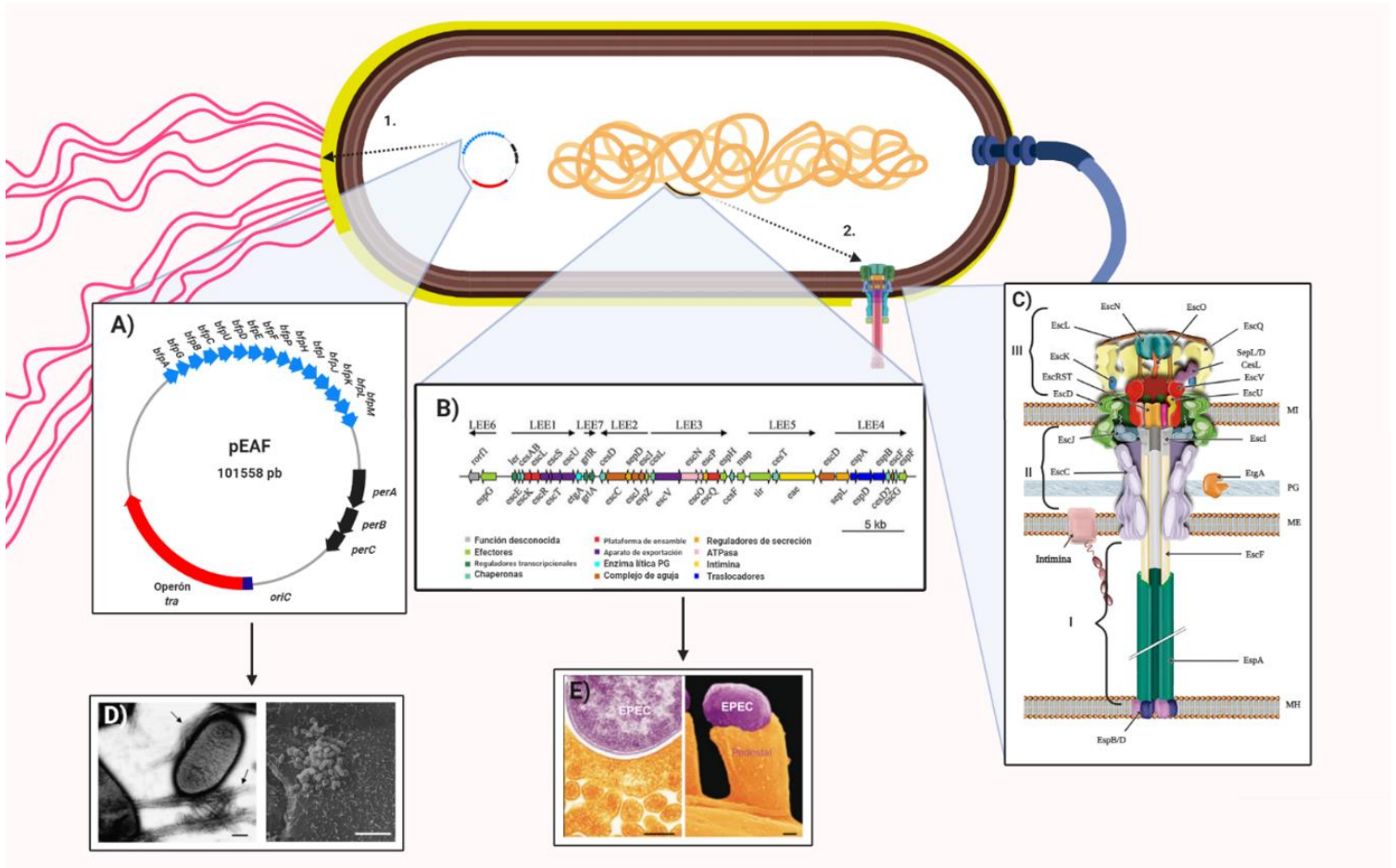
Los fenotipos AL y A/E formados por EPEC típicas son consecuencia de dos elementos genéticos presentes en esta bacteria: el plásmido EAF y la isla de patogenicidad cromosomal LEE, respectivamente (Figura 2) (Kaper et al. 2004).

La isla LEE tiene un tamaño de 35 kb y contiene cerca de 41 marcos de lectura abiertos organizados en cinco operones policistrónicos *LEE1*, *LEE2*, *LEE3*, *LEE4* y *LEE5* que codifican los elementos estructurales de un sistema de secreción tipo III (SST3), proteínas

reguladoras, chaperonas y proteínas efectoras translocadas por este sistema. *LEE1*, *LEE2* y *LEE3* contienen los genes *esc* y *sep* que codifican para los componentes principales del SST3. *LEE1* contiene también al gen *ler* que codifica una proteína de unión al ADN que modula positivamente la expresión de los operones de la isla LEE. *LEE4* contiene genes como *espA*, *espB*, *espD*, entre otros; los cuales codifican para proteínas translocadoras del SST3. Por último, *LEE5* contiene al gen *eae* y *tir* que codifican para una adhesina llamada intimina y su receptor conocido como Tir (Franzin & Sircili, 2015).

Otro elemento genético importante en las cepas de EPEC típicas es el plásmido EAF también conocido como pMAR2, tiene un tamaño de 101 kb y contiene dos operones importantes además de otros genes: los operones *bfp* y *perABC*. El operón *bfp* está organizado en 14 genes que codifican para la fimbria BFP. Entre ellos destacan, *bfpA*, que codifica la subunidad principal de BFP; *bfpP* un gen que codifica para una prepilin peptidasa que utiliza diversos sustratos codificados por los genes *bfpA*, *bfpI*, *bfpJ* y *bfpK*; además *bfpD* y *bfpF* que codifican para ATPasas de ensamblaje y retracción de la maquinaria de la fimbria, respectivamente (Sohel et al. 1996; Tobe et al. 1999).

El operón *per* (Plasmid-Encoded Regulator) está integrado por 3 genes *perA*, *perB* y *perC* (Gómez-Duarte & Kaper, 1995; Sohel et al. 1996). El primer gen estructural codifica para la proteína PerA que tiene la capacidad de funcionar como un autoactivador transcripcional de la expresión del operón *per*, además de regular positivamente la expresión del operón *bfp* (Martinez-Laguna et al. 1999; Sohel et al. 1996). El producto del segundo gen, PerB, está asociado en un fenómeno de bimodalidad colonial que junto con PerA funcionan como un interruptor de histéresis, favoreciendo la virulencia y la persistencia de EPEC en el hospedero (Ronin et al. 2017). El último gen estructural del operón *per*, codifica para PerC, el cual funciona como un regulador positivo para la transcripción de la isla LEE a través de *ler* (Gómez-Duarte & Kaper, 1995; Porter et al. 2004).



**Figura 2. Principales elementos genéticos que contribuyen a la virulencia de EPEC.** El plásmido EAF y la isla de patogenicidad cromosomal LEE determinan los fenotipos AL y A/E, respectivamente. **A)** Esquema simplificado del plásmido EAF, se muestran principalmente 2 operones: *bfp* y *perABC*, el primero codifica para el pilus BFP causante del fenotipo AL (**D**) y el segundo para el activador transcripcional PerA que regula el fenotipo AL (a través de la expresión de *bfp*), y en forma indirecta la lesión A/E (**E**) (a través de su autorregulación y del efecto sobre *ler*). **B)** Isla de patogenicidad LEE conformada por siete operones policistrónicos (*LEE1-LEE7*). Los genes codifican para el SST3, además de los reguladores de la virulencia *ler*, *grlA* y *grlR*. La regulación positiva de la isla LEE a través de PerC y/o GrlA (no mostrada) resulta en la generación de la lesión A/E que se caracteriza por la destrucción de las microvellosidades y la formación del pedestal (**E**). **C)** Esquema del sistema de secreción tipo III, implicado en la traslocación de efectores. Las flechas discontinuas señalan la estructura que se codifica. MI: Membrana interna, PG: Peptidoglicano, ME: Membrana externa, MH: Membrana del huésped. Imagen basada en: (Brinkley et al. 2006; Frankel, 2001; Gaytán et al. 2016; Ugalde-Silva et al. 2016). Imagen creada en: BioRender.com.

### 1.1.2 Mecanismo de patogenicidad de EPEC

El esquema de patogenicidad de EPEC que genera como consecuencia la destrucción de las microvellosidades, la formación del pedestal y la diarrea consta de tres etapas para su estudio: adherencia inicial, transducción de señales y adherencia íntima (Figura 3) (Nataro & Kaper, 1998).

Durante la etapa de adherencia inicial, EPEC establece un contacto no íntimo con la superficie del epitelio intestinal mediado por el flagelo y principalmente por BFP junto con otra fimbria llamada ECP (*E. coli* Common Pilus) (Saldaña et al. 2009). BFP se une específicamente a fosfatidiletanolamina, un fosfolípido de la membrana plasmática que se encuentra en las células epiteliales y bacterianas (Khursigara et al. 2001; Saldaña et al. 2009). Adicionalmente, BFP puede unirse a disacáridos de la membrana de la célula huésped como: N-acetil lactosamina (Hyland et al. 2007). Por su parte, ECP funciona como una adhesina alternativa al mediar la unión de EPEC a las células epiteliales y favorecer la interacción bacteria-bacteria (Rendon et al. 2007).

Las fimbrias BFP, ECP y el flagelo se sincronizan para formar haces, enlaces y puentes tridimensionales interbacterianos, causando la agregación y la formación de microcolonias en la superficie de los enterocitos generando el fenotipo AL (Girón et al. 2002; Girón et al. 1991; Saldaña et al. 2009).

Tan pronto como EPEC ha logrado adherirse a la superficie de las células epiteliales se induce la expresión de los genes ubicados en la isla LEE que codifican para los componentes que estructuran el SST3. Este aparato de secreción está formado por más de 20 proteínas. Usualmente, los componentes del SST3 se pueden agrupar desde afuera hacia adentro en: apéndices extracelulares, cuerpo basal y componentes citoplasmáticos (aparato de exportación y plataforma de membrana interna) (Gaytán et al. 2016; Slater et al. 2018). A través del SST3 son inyectadas a la célula huésped una gran variedad de proteínas efectoras, codificadas dentro de la isla LEE (Tir, EspB, EspD, EspF, EspG y Map) así como no codificadas dentro de la isla (NleA, NleB1/2, NleC, entre otras); dentro de la célula causan el comienzo de la segunda etapa del mecanismo de patogenicidad de esta bacteria. Esta etapa se caracteriza por la alteración de las vías de transducción de señales que conducen a rearrreglos del citoesqueleto y a la acumulación de actina justo debajo del sitio donde la

bacteria se adhiere, ocasionando la pérdida de homeostasis de sus vías de señalización (Cleary, 2004; Nataro & Kaper, 1998; Ugalde-Silva et al. 2016).

En la tercera etapa, las bacterias se adhieren íntimamente a la célula huésped mediante la interacción entre intimina y Tir. Este último es traslocado por el SST3 hacia el interior de la célula donde es fosforilado por una proteína cinasa del hospedero (c-Fyn) en un residuo de tirosina (Y474), desencadenando su inserción en la membrana de la célula huésped y funcionando como el receptor de la intimina, una proteína de membrana externa de la bacteria (Phillips et al. 2004). La interacción entre intimina y Tir es indispensable para la formación de las lesiones A/E al reclutar otras proteínas implicadas en la acumulación de filamentos de actina y proteínas del citoesqueleto resultando en la formación de copas o pedestales (Kaper et al. 2004).

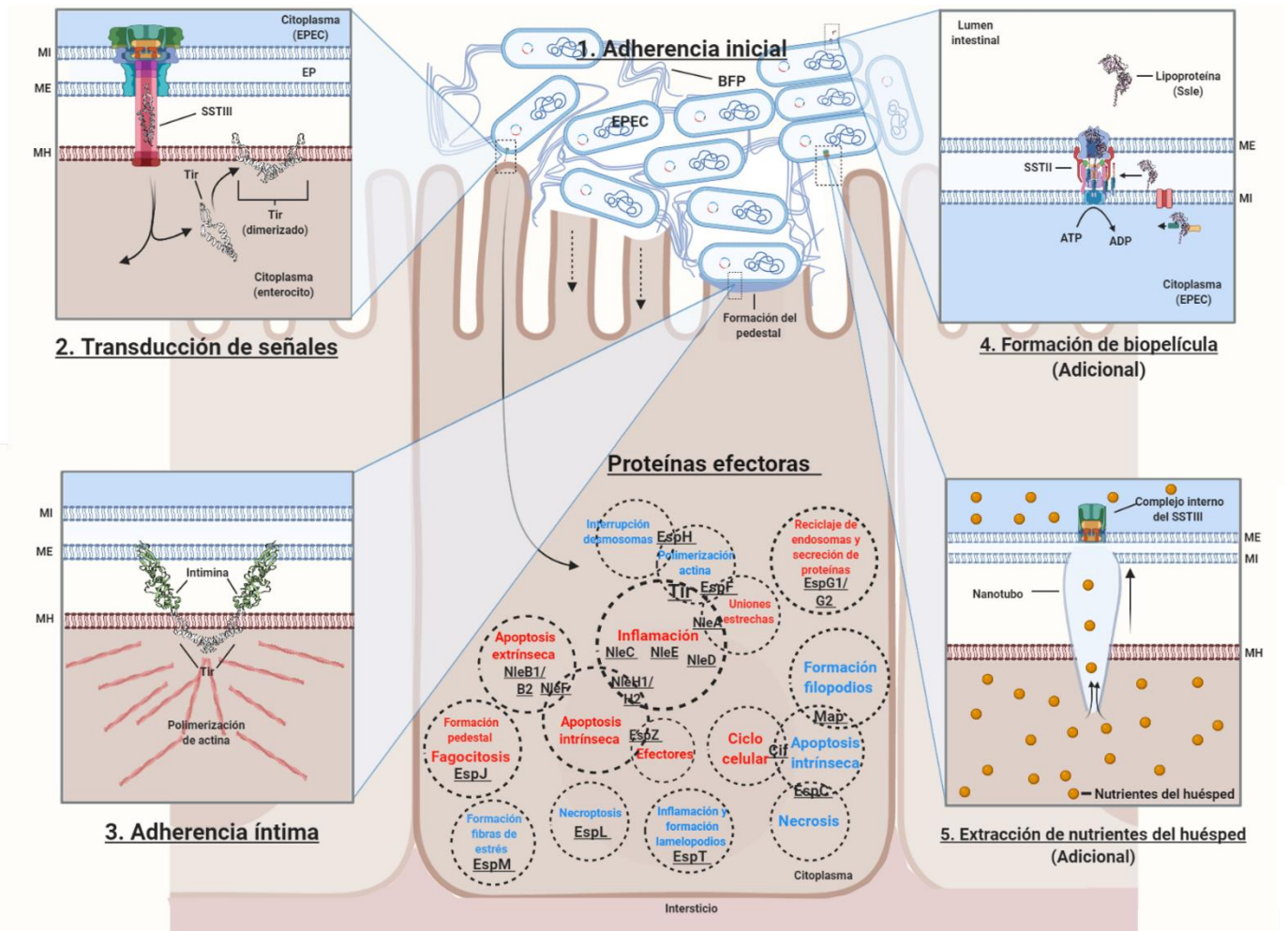
De manera adicional, en el mecanismo de patogenicidad de EPEC está involucrado otro sistema de secreción de proteínas pero de tipo II (SST2), este sistema favorece la secreción de la lipoproteína SsIE que le permite a EPEC persistir y formar una biopelícula madura, evitando ser eliminada por el sistema inmune y por la actividad mecánica del intestino (Baldi et al. 2012; Moreira et al. 2006).

En resumen, EPEC logra perdurar, sobrevivir y causar daño en el huésped principalmente por la actividad de las proteínas efectoras translocadas que subvierten una gran cantidad de procesos de la célula eucariota, tales como: la respuesta inmune, el equilibrio de los mecanismos de muerte celular (apoptosis, necroptosis y necrosis), vías de transducción de señales (NF- $\kappa$ B y MAPK), polaridad celular, integridad de las uniones celulares (uniones estrechas y desmosomas), tráfico vesicular (Rho GTPasas) y función mitocondrial (Tabla 1); que conducen principalmente a un desequilibrio hídrico, remodelación de la membrana celular y finalmente a la aparición de la diarrea (Croxen & Finlay, 2010; Pearson et al. 2016).

**Tabla 1. Proteínas efectoras traslocadas por el SST3 de EPEC**

Proteína	Funciones	Actividad bioquímica y objetivos
<b>Cif</b>	Inactivación del ciclo celular y activación de la apoptosis intrínseca.	Cif detiene la progresión del ciclo celular entre las fases G2/M, al bloquear la cinasa 1 dependiente de ciclina (CDK1) (Morikawa et al. 2010). Adicionalmente favorece la activación de la apoptosis por el aumento de la producción de las caspasas 3 y 6 (Yao et al. 2014).
<b>EspF</b>	Remodelación de la membrana celular y alteración de las uniones estrechas.	EspF posee dominios PDZ que le permiten unirse a la proteína nexina 9 (SNX9), a la proteína del síndrome neuronal de Wiskott-Aldrich (N-WASP), entre otras. La unión de EspF con N-WASP desencadena la activación del complejo Arp 2/3 que conduce a la polimerización de actina y remodelación de la membrana (Serapio-Palacios & Navarro-Garcia, 2016). Además, EspF participa en la internalización de claudina 1, 3 y 5 causando interrupción de las uniones estrechas (Alto et al. 2007; Roxas et al. 2018).
<b>EspG1/G2</b>	Inhibición del reciclaje de endosomas y secreción de proteínas.	EspG1 interactúa con las proteínas Arf y Pak. Mientras que EspG2 interactúa con la proteína GM130 del aparato del Golgi interrumpiendo su estructura (Glotfelty and Hecht 2012; Selyunin et al. 2011). En el caso de EspG1, se une a la proteína Arf activa, Arf-GTP y bloquea su inactivación por GAP. EspG1-Arf-GTP forman un complejo trimétrico con Rab1 interrumpiendo la vía secretora (Ugalde-Silva et al. 2016).
<b>EspH</b>	Interrupción de los desmosomas y reordenamiento del citoesqueleto.	EspH inhibe la actividad de RhoA y, en consecuencia, induce la internalización y degradación de las proteínas desmoglobina (DSG2) y desmocolina (DSC2). Esto da como resultado la pérdida de contactos intercelulares, interrupción de la función de barrera epitelial y del citoesqueleto (Roxas et al. 2018).
<b>NleA</b>	Inhibición de la inflamación y de la formación de las uniones estrechas.	NleA altera la desubiquitinación del inflamosoma NLPR3, reprime la activación de la caspasa 1 y ocasiona la inhibición del inflamosoma y de la secreción de IL-1 $\beta$ (Yen, Sugimoto, and Tobe 2015). Además, NleA interrumpe el transporte de las proteínas que conforman a las uniones estrechas de la célula huésped por la inhibición de las funciones del complejo COPII (Singh & Aijaz, 2016; Thanabalasurari et al. 2010; Ugalde-Silva et al. 2016).
<b>EspJ</b>	Inhibición de la fagocitosis y la formación de pedestales.	EspJ funciona como una ADP-ribosa al hacer una modificación postraduccional de Src y Abl (tirosinas cinasas del huésped), inhibiendo su autofosforilación y la fosforilación de proteínas adaptadoras (Young et al. 2014), lo que inhibe la polimerización de actina. Además EspJ, por la vía de Src inhibe la fagocitosis mediada por macrófagos, al evitar la activación del receptor Fc $\gamma$ RIIa (Young et al. 2014).
<b>EspT</b>	Activación de la inflamación, internalización a la célula huésped y formación de lamelopodios.	EspT pertenece a la familia de los efectores WxxxE funciona como una GEF activando a las Rho GTPasas Cdc42 y Rac1 causando la internalización de EPEC dependiente de filamentos de actina. Adicionalmente, la activación de Rac1 causa la activación de la vía de las MAPK cinasas, que ocasiona la secreción de la IL-1 $\beta$ que tiene actividad proinflamatoria. Curiosamente, EspT parece antagonizar la actividad antiinflamatoria de las otras proteínas efectoras traslocadas de EPEC (Raymond et al. 2011).
<b>EspZ</b>	Inhibición de la apoptosis intrínseca y traslocación de efectores.	EspZ interactúa con la translocasa pTIM17b de la membrana mitocondria, reduciendo la apoptosis intrínseca. Además, EspZ limita la translocación de proteínas efectoras bacterianas en las células epiteliales del huésped, a través de la interacción con componentes del SST3 como EspD (Berger et al. 2012).
<b>NleB1</b>	Inhibición de la apoptosis extrínseca.	NleB1 funciona como una glucosiltransferasa, inhibiendo la activación de NF-kB, mediante la transferencia de un residuo de N-acetil glucosamina al receptor de muerte FADD, evitando su interacción con el dominio de muerte (FAS) y la activación de la vía de la apoptosis extrínseca (Pollock et al. 2017).

<b>NleB2</b>	¿Inhibición de la apoptosis extrínseca?	NleB2 es glucosiltransferasa putativa. Tiene una posible superposición con la actividad de NleB1 (Gao et al. 2013; El Qaidi et al. 2017).
<b>NleC</b>	Inhibición de la inflamación.	NleC es una metaloproteasa que bloquea la activación de NF-κB escindiendo directamente la subunidad p65 de NF-κB, dentro del sitio de unión al ADN, NleC escinde en otros componentes de NF-κB como p50, p300, c-Rel y RelB (Pearson et al. 2011).
<b>NleD</b>	Inhibición de la inflamación.	NleD, es una metaloproteasa que actúa sobre la vía de las MAPK, escinde a AP-1 y evita su translocación al núcleo y la activación de genes que codifican para citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6) (Baruch et al. 2011).
<b>NleF</b>	Inhibición de la apoptosis.	NleF, este actúa directamente uniéndose al sitio activo de las caspasas 4, 8 y 9, inhibiendo la apoptosis intrínseca (inducida por estaurosporina) y la extrínseca (inducida por TRAIL) (Pollock et al. 2017).
<b>NleE</b>	Inhibición de la inflamación.	NleE es una metiltransferasa que modifica un residuo de cisteína en los dominios de las proteínas adaptadoras TAB2 y TAB3, evitando la unión, a las ubiquitina ligasas TRAF2 y TRAF6, necesarias para la activación del complejo NF-κB (Yao et al. 2014).
<b>NleH1/H2</b>	Inhibición de la inflamación y de la apoptosis intrínseca.	NleH1/H2 previenen la degradación dependiente de ubiquitina de la proteína inhibidora IκB, evitando la activación y traslocación de NF-κB (Lacey & Miao, 2020). Además, ambas proteínas, reprimen la apoptosis intrínseca, al inhibir a la proteína proapoptótica Bax (Hemrajani et al., 2010). Adicionalmente, NleH1 interactúan con la vía MAPK (ERK1/2) reduciendo la actividad proinflamatoria (Kralicek et al. 2018).
<b>Tir</b>	Activación de la adherencia íntima, polimerización de filamentos de actina, formación del pedestal e inactivación de la inflamación.	Tir es un receptor traslocado por el SST3, que participa en la adherencia íntima en la célula huésped al interactuar con la intimina. Cuando Tir es traslocado es fosforilado en la posición Y474 por la cinasa del hospedero (c-Fyn). Una vez fosforilado, se inserta en la membrana y se une a la intimina. Posteriormente Tir se une a Nck1/Nck2 del hospedero. Estas proteínas adaptadoras poseen dominios SH3 que se unen y activan N-WASP que coopera con el complejo Arp2/3 para impulsar la polimerización de actina y la formación de pedestales (Campellone, 2010; Phillips et al. 2004). Adicionalmente, Tir se fosforila por una cinasa del hospedero (Src) en un motivo similar a ITIM en las posiciones Y483 y Y511 que favorece el reclutamiento de las fosfatasa SHP-1 y SHP-2, esto ocasiona la inhibición de la autoubiquitinación del complejo de TRAF6, la separación del complejo e inactivación de la vía de NF-κB (Campellone, 2010; Yan et al. 2013) causando una supresión de la actividad proinflamatoria.
<b>EspL</b>	Activación de necroptosis.	EspL es una cisteína proteasa que escinde a las proteínas RIPK1 y RIPK3, previniendo su oligomerización y la activación de la vía de la necroptosis (Lacey & Miao, 2020).
<b>Map</b>	Activación de la apoptosis intrínseca y formación de filopodios.	Map es una proteína importada a la matriz mitocondrial que desestabiliza a la mitocondria, libera al citocromo c y activa el proceso apoptótico. Además, Map contiene un motivo de unión a PDZ1 que interactúa con la proteína Ebp50/ NHERF1, la cual dirige a Map hacia la membrana plasmática. Una vez en la membrana, Map imita a una GEF para activar a GTPasa Cdc42, que estimula la formación de filopodios (Alto et al. 2007; Singh & Aijaz, 2016).
<b>EspC</b>	Activación de la apoptosis intrínseca y necrosis.	EspC es una serina proteasa que escinde la proteína antiapoptótica Bcl-2 inhibiéndola y aumentando la translocación de la proteína Bax. Asimismo, escinde a la procaspasa-3, que provoca el inicio de la vía de la apoptosis intrínseca. Además, EspC puede causar necrosis al inducir la activación de la calpaína (cisteína proteasa) al aumentar el calcio intracelular (Serapio-Palacios & Navarro-García, 2016).
<b>EspM</b>	Formación de fibras de estrés.	EspM contiene motivos WxxxE que le permiten funcionar como una GEF que induce la formación de fibras de estrés, y modula la dinámica de la actina a través de la activación de las Rho GTPasas (Arbeloa et al. 2009).



**Figura 3. Mecanismo de patogenicidad de EPEC.** El esquema clásico consta de tres etapas: adherencia inicial, transducción de señales y adherencia íntima. **1.** En la primera etapa, EPEC establece un contacto inicial no íntimo en la superficie del epitelio intestinal mediado por las fimbrias BFP, ECP y el flagelo que se sincronizan para formar haces, enlaces y puentes tridimensionales interbacterianos, causando la agregación y la formación de microcolonias en la superficie de los enterocitos y generando el fenotipo AL. **2.** Se ensambla el SST3 y se inicia la translocación de diferentes proteínas efectoras (Tir, EspB, EspD, EspF, EspG, Map, entre otras), alterando las vías de señalización del hospedero. Las proteínas efectoras actúan sobre los mecanismos de muerte celular, polaridad celular, rearrreglo del citoesqueleto, uniones celulares, etc. **3.** En la tercera etapa, las bacterias se adhieren íntimamente a la célula huésped mediante interacciones entre intimina y Tir que amplifica la acumulación de filamentos de actina y otras proteínas del citoesqueleto resultando en la formación de copas o pedestales. **4.** Adicionalmente, después de la última etapa puede haber expresión del SST2 y secreción de la lipoproteína (SslE), que le permite a EPEC persistir y formar una biopelícula madura. **5.** Además, en circunstancias de escasez de nutrientes, EPEC es capaz de realizar una extracción de nutrientes del huésped, mecanismo que es dependiente de contacto y del complejo interno del SST3. Como consecuencia, EPEC extrae nutrientes necesarios para su supervivencia, por un tiempo indefinido. Los nombres en **azul** indican activación y los nombres en **rojo** inhibición, además los diagramas de Venn indican sus principales efectos y funciones en común de cada proteína efectora. MI: Membrana interna, ME: Membrana externa, MH: Membrana del huésped. Imagen basada en: (Baldi et al. 2012; Girón et al. 1991; Nataro & Kaper, 1998; Pal et al. 2019). Imagen creada en: BioRender.com

## ANTECEDENTES

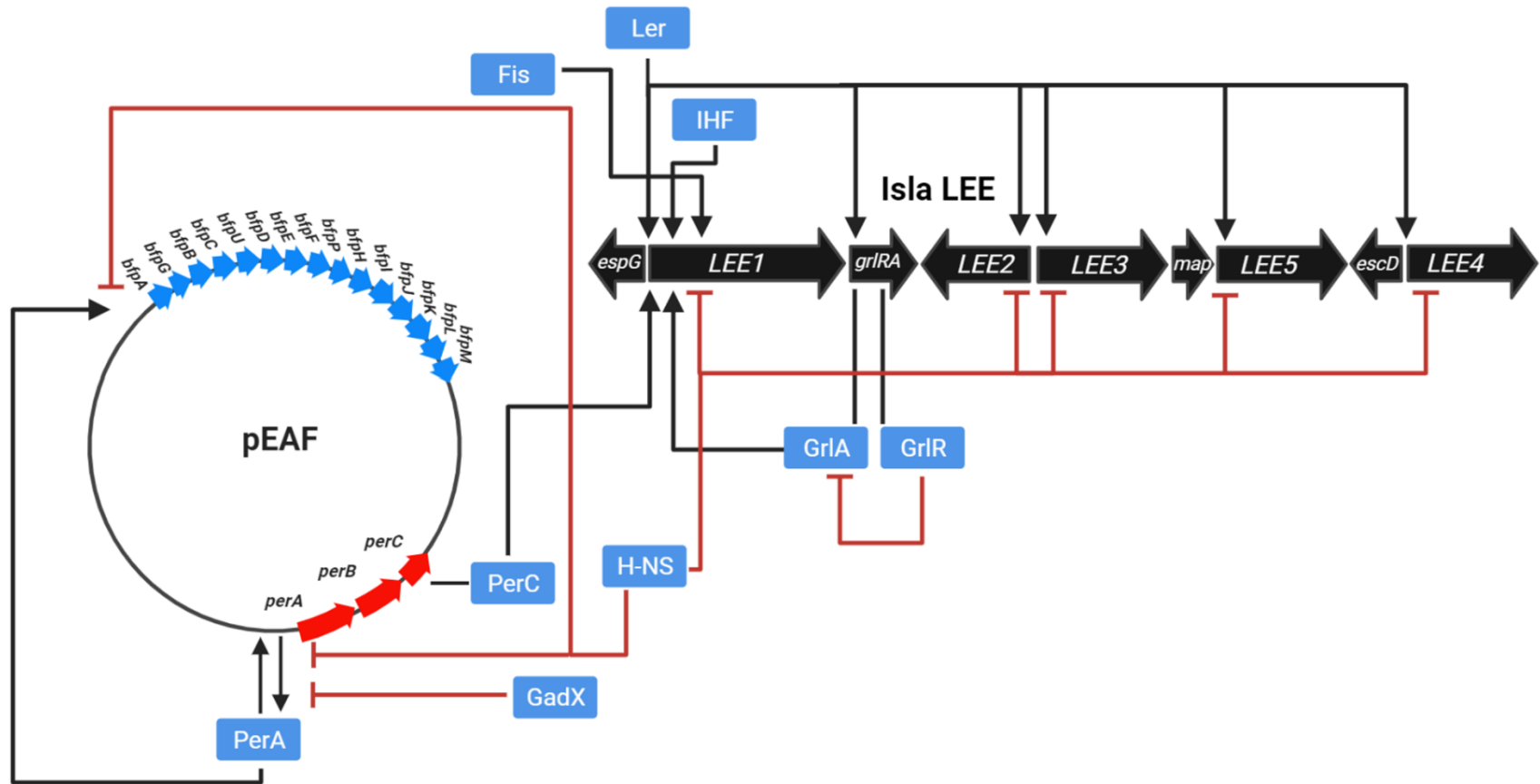
### 2.1 Antecedentes generales

EPEC posee la capacidad de detectar una gran diversidad de estímulos ambientales que favorece la adaptación de una respuesta adaptativa a los nichos ecológicos que coloniza, mediante mecanismos estrictos y altamente coordinados de la regulación de la expresión de su genoma. Tales mecanismos de regulación tienen como consecuencia que EPEC exprese los genes que requiere sólo bajo condiciones ambientales óptimas, evitando un gasto energético innecesario y la eliminación por el sistema inmunológico del huésped (Kaper et al. 2004; Pearson et al. 2016).

En EPEC se han caracterizado una gran cantidad de proteínas reguladoras que modulan la expresión de los factores de virulencia como: Fis, IHF, BipA, QseA, Cpx, Ler, H-NS, entre otras (Figura 4) (Abe et al. 2008; Platenkamp & Mellies, 2018).

Una de las más importantes es H-NS (Histone-like Nucleoid-Structuring protein) un regulador global que se une al ADN preferentemente sobre secuencias ricas en AT (adeninas y timinas) impidiendo el acceso del complejo de la maquinaria transcripcional. H-NS silencia la expresión de genes implicados en una gran variedad de procesos celulares, incluyendo la virulencia, al compactar el ADN para evitar la transcripción de los genes. Entre los genes que silencia H-NS se encuentran los que conforman a los operones de la isla LEE (*LEE1-5*) (Bustamante et al. 2001; Leh et al. 2017; Sperandio et al. 2000; Tapia et al. 2020).

En la isla LEE se encuentra el gen que codifica para el regulador maestro llamado Ler (LEE-encoded regulator) que controla positivamente la expresión de toda la isla. Ler ejerce un efecto positivo al contrarrestar el silenciamiento mediado por H-NS sobre los promotores de la isla LEE (Bustamante et al. 2001; Shin, 2017). Además, Ler tiene la capacidad de autorregular su expresión, así como la de otros genes que se encuentran codificados fuera de la isla LEE conocidos como *nle* (non-LEE encoded) (Elliott et al. 2002; Pearson et al. 2016). En este sentido, se conoce que H-NS normalmente reprime la expresión de los operones de la isla LEE incluyendo a *ler* a una temperatura de 27 °C. Sin embargo, a una temperatura de 37 °C esta represión es ineficiente por lo cual Ler se expresa y alivia la represión ejercida por H-NS (Umanski et al. 2002).



**Figura 4. Modelo de regulación actual en EPEC sobre los genes de virulencia codificados en la isla LEE y pEAF.** El operón *LEE1* codifica a Ler, que promueve la transcripción de todos los operones y auto-reprime su propio promotor. *LEE1* está regulado por una serie de proteínas (Ler, H-NS, Fis e IHF), PerC codificado en pEAF, GrlA/GrlR codificado en LEE, BipA y CpX (no mostrados). PerA promueve la transcripción de *bfp* y su autotranscripción a través de su operón y GadX un regulador negativo de PerA en condiciones ácidas (pH 5.5). Las flechas negras indican regulación positiva, las líneas de color rojo indican regulación negativa. Por simplicidad se omitieron algunos reguladores positivos y negativos de la red actual. Imagen basada en: (Bokal, 1997; Martínez-Laguna et al. 1999; Platenkamp & Mellies, 2018; Umanski et al. 2002; Bustamante et al. 2011; Weinstein-Fischer et al. 2002). Imagen creada en: Biorender.com

Extraordinariamente, la competencia de las concentraciones de Ler y H-NS dan lugar a la manifestación de un fenómeno denominado bimodalidad fenotípica poblacional, que tiene como consecuencia la generación de subpoblaciones en el curso de la infección, con tareas específicas para asegurar la supervivencia del genotipo compartido de EPEC (Leh et al. 2017; Platenkamp & Mellies, 2018; Ronin et al. 2017). Para una bacteria en una subpoblación de EPEC, el elemento clave de la regulación de LEE reside en la modulación de la expresión de *ler*. En consecuencia, la cantidad circundante de Ler y H-NS da como resultado diferentes estados: estado alto (Ler elevado), estado bajo (H-NS silenciando) y estado inestable (competencia entre Ler-H-NS). La transición a un estado alto (prendido) a un estado bajo (apagado) está modulado por H-NS. A medida que aumenta la unión de H-NS sobre los promotores del LEE, la expresión de los operones de la isla disminuye (se apagan), lo que resulta en el silenciamiento por H-NS (estado bajo). Sin embargo, cuando la expresión de Ler aumenta, la expresión de la isla LEE y los circuitos de retroalimentación positiva se activan y los genes LEE se expresan (estado alto). En las condiciones cuando Ler no está completamente activado, existe una competencia entre H-NS y Ler lo que da como resultado un estado inestable (Leh et al. 2017). A nivel poblacional, esta competencia genera subpoblaciones bacterianas, las cuales expresan diferencialmente los genes que codifican el SST3 (*eae*, *tir*, *cesT*, entre otros) y estratégicamente dicho fenómeno podría aportar una ventaja selectiva al aumentar la probabilidad de una infección exitosa o de propagación de un huésped a otro (Leh et al. 2017).

Interesantemente, en la isla LEE también se encuentran codificados otros reguladores globales, estos son: GrlA y GrlR. GrlA (Global Regulator of LEE-Activator) es un regulador transcripcional positivo de la expresión de *ler* uniéndose a su promotor y favoreciendo su transcripción. Mientras que GrlR (Global Regulator of LEE-Repressor) es un represor porque interactúa con GrlA evitando que active a *ler* (Deng et al. 2004). Sin embargo, GrlR puede también reprimir a *ler* y a los operones de la isla LEE por un mecanismo independiente alterno de la interacción con GrlA, el cual está todavía en estudio (Lara-Ochoa y cols. Datos no publicados).

En el plásmido EAF, se encuentra el operón *per* que codifica proteínas que funcionan como reguladores específicos de la virulencia de EPEC. El primer gen codifica para PerA que funciona como un regulador transcripcional positivo que se autorregula y activa la

expresión de los otros genes de su operón. Asimismo, PerA regula positivamente al operón *bfp*, resultando en la expresión de la fimbria BFP (Martinez-Laguna et al. 1999).

El segundo gen estructural codifica para PerB que ha demostrado su participación en el fenómeno de bimodalidad colonial, junto con PerA funciona como un interruptor de histéresis, favoreciendo la virulencia y el crecimiento de EPEC. La bimodalidad permite regular la expresión de genes de virulencia en condiciones de inducción (DMEM a 37 °C) y de represión (medio LB a 32°C), en dos subpoblaciones de bacterias coexistentes: agregantes y planctónicas con diferentes capacidades de colonización e invasión (Kenny et al. 1997; Ronin et al. 2017). Específicamente, en la primera subpoblación se expresan constitutivamente tanto BFP como el SST3 durante muchas generaciones, por lo que las bacterias se adhieren rápidamente, forman microcolonias, liberan proteínas efectoras e invaden a la célula huésped. Esta rápida invasión puede proteger a las bacterias contra el sistema inmunológico del huésped y establecer una infección persistente (Ronin et al. 2017). En la segunda subpoblación, los genes que codifican para las proteínas estructurales del SST3 y BFP, se encuentran apagados y en su lugar existe una alta expresión de los genes involucrados en la nutrición y el metabolismo de la bacteria que le favorece su dispersión y desalojo del lumen intestinal, para su posterior propagación a nuevos hospederos (Ronin et al. 2017).

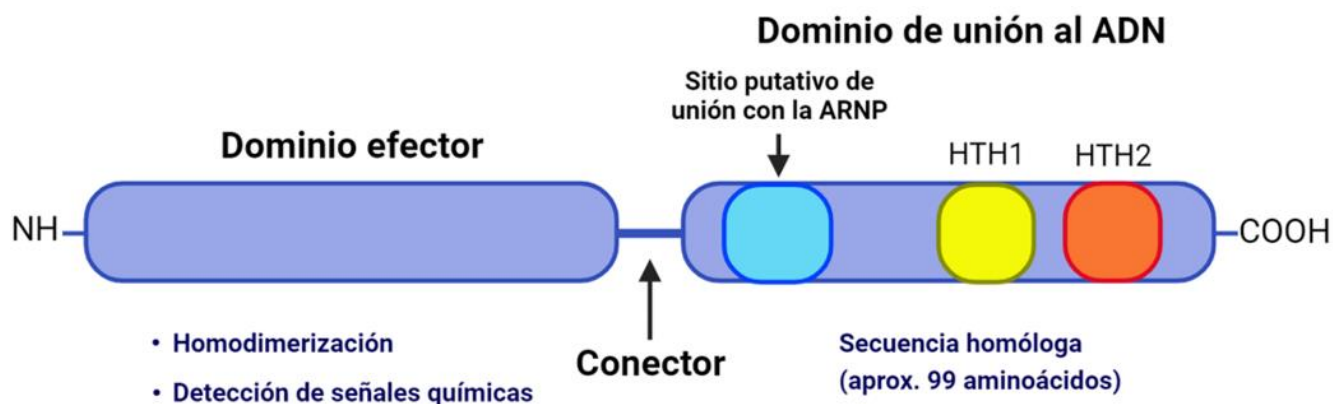
Por último, PerC funciona como un regulador positivo de la isla LEE a través de su interacción con la región promotora de *ler*, contrarrestrando el silenciamiento por H-NS, de una forma similar a GrlA (Bustamante et al. 2011). Además, PerC regula indirecta o directamente la transcripción de los genes *fim*, *napC*, *napH*, *napA*, etc. (Bingle et al. 2014; Mellies et al. 2017) encargados de la adherencia bacteriana, desintoxicación y la reducción a amoníaco, respectivamente; aumentando la sobrevivencia de la bacteria en condiciones anaeróbicas (Mellies et al. 2017).

## **2.1 Antecedentes específicos**

PerA pertenece a una familia de reguladores transcripcionales llamada AraC/XylS, los miembros de esta familia están involucrados en la regulación de genes relacionados con el metabolismo del carbono y/o nitrógeno, respuestas adaptativas a estrés y virulencia (Gallegos et al. 1997; Ibarra et al. 2008; Martinez-Laguna et al. 1999). Estructuralmente las proteínas de esta familia se caracterizan por poseer dos dominios: un dominio efector y un dominio de

unión al ADN (Figura 5). El dominio efector es una región escasamente conservada que se ubica hacia el extremo N-terminal, su función principal es la detección de moléculas efectoras y su autodimerización. Por otra parte, el dominio de unión al ADN es altamente conservado entre los miembros de la familia, lo conforman aproximadamente 99 aminoácidos y se ubica en el extremo C-terminal. Dicha región se estructura principalmente en dos motivos de unión al ADN tipo HTH (Helix-Turn-Helix) y además se encuentra un sitio probable de interacción con la ARN polimerasa (ARNP) (Gallegos et al. 1997).

Particularmente, PerA se une como monómero a una secuencia consenso de 29 pb rica en AT ubicada en las regiones reguladoras de *bfpA* y *perA*, esta secuencia abarca las posiciones -75 a -47 en *bfpA* y -83 a -55 en *perA* (Ibarra et al. 2003; Martínez-Laguna et al. 1999). Además, al igual que otros miembros de la familia AraC/XylS, PerA interactúa con la ARNP, específicamente con las subunidades  $\alpha$  y  $\sigma$ , permitiendo el anclaje de la maquinaria transcripcional sobre los promotores blanco para favorecer la transcripción de los genes (González, 2019; Lara-Ochoa et al. 2021).



**Figura 5. Esquema representativo de la estructura general de miembros de la familia AraC/XylS.** Los miembros de la familia AraC/XylS poseen dos dominios, el primero ubicado en el amino terminal se conoce como dominio efector que está asociado con la detección de señales químicas y homodimerización. Mientras que el segundo, ubicado en el carboxilo terminal, consiste en dos motivos HTH que le permiten unirse al ADN de los genes blanco. Ambos dominios se encuentran unidos por un conector. Adicionalmente, en algunos miembros se encuentra en el C-terminal, un sitio de unión a la ARNP que favorece el anclaje de la maquinaria transcripcional en los promotores de los genes diana. Imagen creada en: Biorender.com

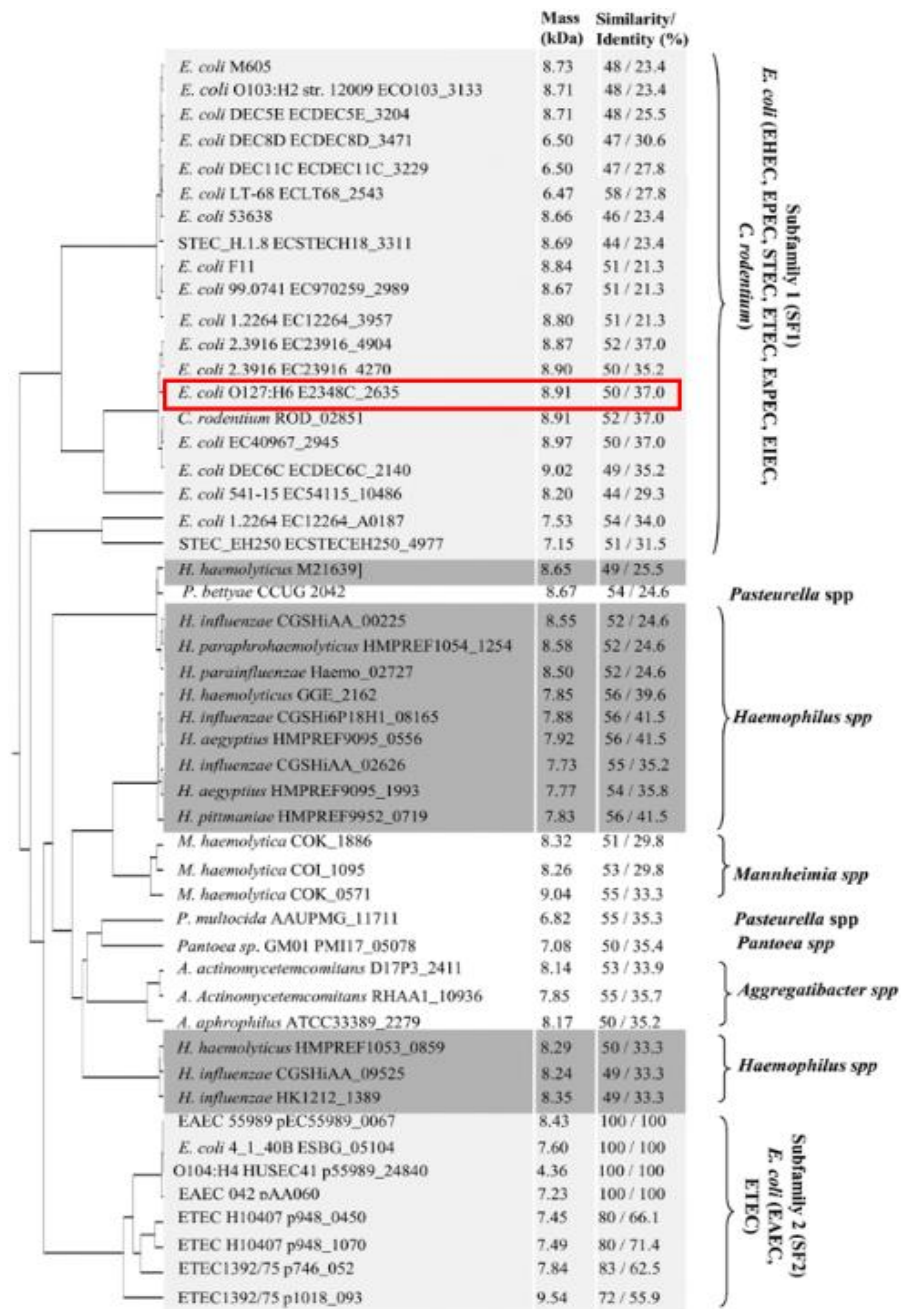
Los miembros de la familia AraC/XylS son proteínas que están presentes en una amplia diversidad de bacterias donde cumplen funciones esenciales en el control adecuado de la

expresión espacio temporal de los genes en respuesta a señales específicas. Una de las características interesantes de estos reguladores es la capacidad de autoactivación, lo que desencadena la rápida activación de su regulón en un ambiente propicio, estableciendo así un mecanismo de retroalimentación positiva (Porter et al. 2004). Sin embargo, las señales y mecanismos que conducen a la inactivación de los miembros de esta familia y a los genes blanco que regulan son todavía poco estudiados.

En este sentido, Santiago et al. 2014 identificaron una nueva familia de reguladores anti-virulencia que actúan como reguladores negativos de los miembros de la familia AraC/XylS. Esta familia denominada ANR (AraC-family Negative Regulators), está integrada por al menos 282 miembros distribuidos en una gran variedad de bacterias patógenas, principalmente en enterobacterias (Figura 6). Estos miembros comparten características comunes como: un peso molecular <10 kDa y una estructura secundaria formada por tres hélices  $\alpha$  que contienen una secuencia consenso de siete aminoácidos altamente conservados (A10, E14, A22, W26, A29, W43 y R47) (Santiago et al. 2014, 2016).

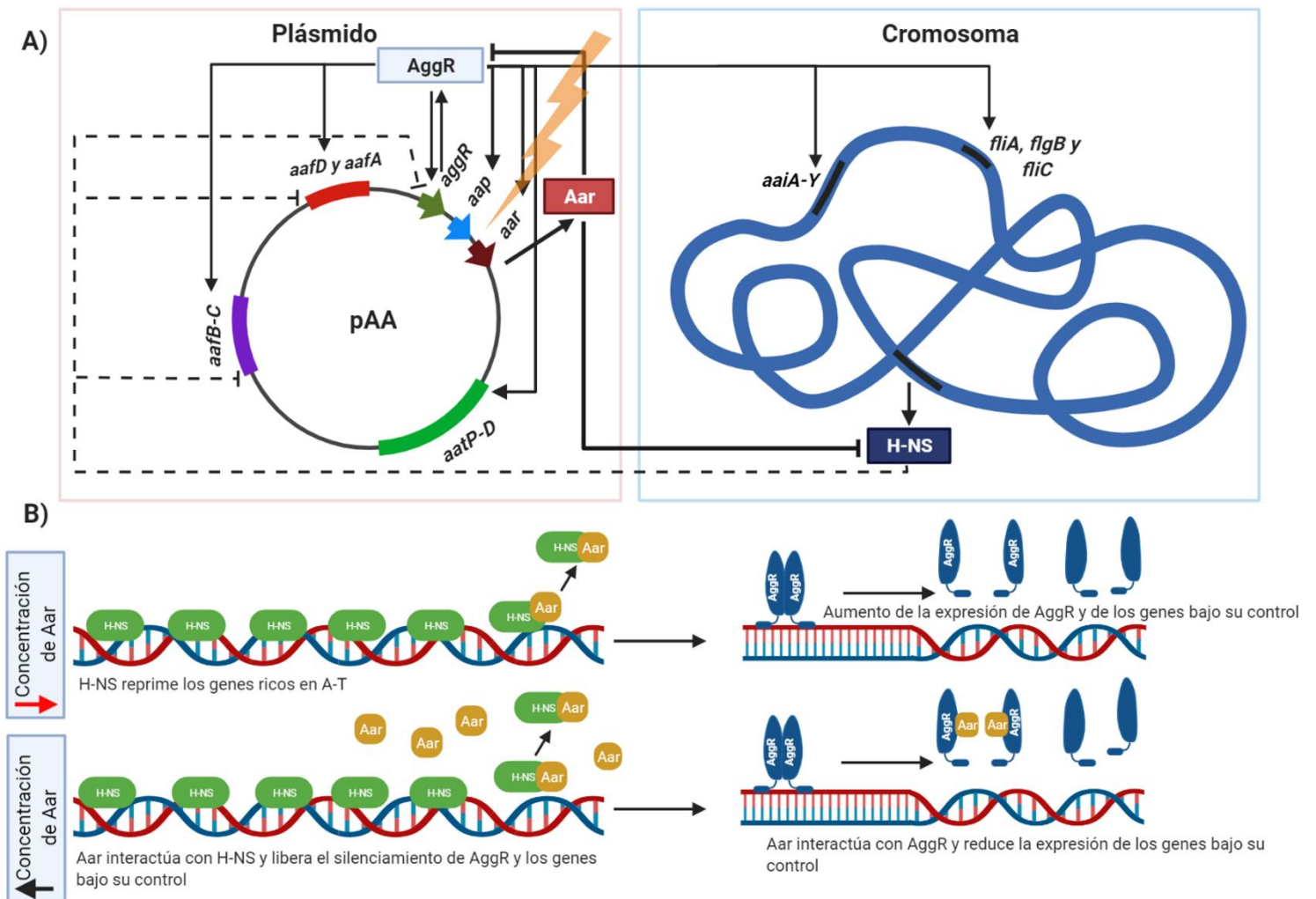
El miembro prototipo de la familia ANR es Aar (AggR activated regulator) una proteína que se encuentra en el patotipo de EAEC. Aar es una proteína de 7.23 kDa que regula negativamente la expresión de AggR (Aggregative Regulator) mediante la interacción proteína-proteína, reprimiendo así los genes bajo el control de AggR (Santiago et al. 2014, 2016). AggR es un regulador de virulencia importante de este patógeno, pertenece a la familia AraC/XylS y modula la expresión de 112 genes cromosomales y plasmídicos (Figura 7). Entre estos genes que modula se encuentran los que codifican para un sistema de secreción tipo VI, la fimbria AAF/II, el sistema de secreción Aap, entre otros (Morin et al. 2013; Yasir et al. 2019). De manera interesante, uno de los genes activados por AggR es *aar*, el gen que codifica para Aar, el prototipo de la familia anti-virulencia ANR. Lo anterior, sugiere que AggR y Aar funcionan como un mecanismo de “interruptor” molecular para asegurar una

modulación correcta de los genes de virulencia en las condiciones ambientales adecuadas (Santiago et al. 2014, 2016).



**Figura 6. Árbol filogenético de homólogos de Aar en patógenos Gram negativos.** Análisis filogenético de los homólogos de Aar utilizando el algoritmo ClustalW. La masa molecular de la proteína y el porcentaje de identidad y similitud con Aar de EAEC se determinaron para cada proteína predicha. Además, se distinguen dos subfamilias: SF1 que incluye EHEC, EPEC (modelo de estudio en este trabajo resaltado con un cuadro rojo) y otras bacterias diarreogénicas, y SF2 que incluye a EAEC y ETEC. Imagen tomada y modificada de: (Santiago et al. 2014).

De manera adicional, el mismo grupo de Santiago et al., 2017 identificaron que Aar modula la expresión de más de 200 genes, entre ellos los que codifican para las fimbrias LpfC, enzimas relacionadas con LPS, porinas, genes activados en respuestas adaptativas al estrés, entre otros. Increíblemente, la modulación de una buena parte de estos genes sucede mediante la regulación de algunos miembros de la familia H-NS a través de las interacciones entre Aar y H-NS (Mickey & Nataro, 2020; Santiago et al. 2017). Por si fuera poco, H-NS está implicado en el silenciamiento de los genes regulados por AggR y a sí mismo. Todo lo expuesto anteriormente indica un circuito molecular regulatorio entre Aar, AggR y el regulador global H-NS que funciona de la siguiente manera (Figura 7): en un entorno de represión (<37 °C, LB), H-NS silencia la expresión de *aggR*, cuando la bacteria alcanza su nicho de colonización y existen las condiciones adecuadas (37°C y moléculas inductoras) se induce la expresión de *aggR*. Posteriormente, AggR regula positivamente la expresión de *aar*, a niveles discretos Aar se une y libera el silenciamiento causado por H-NS. Esto da como resultado un incremento en la expresión de *aggR*. Conforme incrementa la expresión de *aar*, Aar se une a AggR y H-NS por interacción proteína-proteína previniendo la dimerización y activación de AggR y, en consecuencia, disminuyendo la capacidad de activación de los genes regulados por AggR. Esto indica que Aar tiene un papel dual en la regulación de los genes de virulencia de EAEC funcionando como anti-silenciador de H-NS y también como represor, contrarrestando la activación de AggR (Mickey & Nataro, 2020; Santiago et al. 2017).



**Figura 7. Modelo de regulación de los genes de virulencia de EAEC.** **A)** Los principales elementos reguladores de la virulencia de EAEC se encuentran en el plásmido AA y en el cromosoma: AggR regula la expresión de alrededor de 112 genes que codifican para múltiples estructuras (sistema de secreción tipo VI, la fimbria AAF/II, el sistema de secreción Aap, entre otros) y Aar regula la expresión de más de 200 genes de EAEC. Esto último relacionado con la regulación de la familia H-NS (simplificado). Las flechas negras delgadas indican activación, las líneas negras gruesas indican interacción proteína-proteína de Aar con Aggr y H-NS y las líneas negras discontinuas indican silenciamiento por H-NS. Se encuadraron las estructuras genéticas para mayor claridad. **B)** H-NS y Aar co-regulan diversos genes. En un entorno de represión (<37 °C, LB) H-NS (óvalos verdes) silencia la expresión de *aggR*. En condiciones de activación, (37 °C, DMEM y la presencia de moléculas inductoras) se induce la expresión de *aggR*. Posteriormente, AggR (óvalos azules) regula positivamente la expresión de *aar*. A niveles **discretos**, Aar (óvalos amarillos) se une y suprime el silenciamiento causado por H-NS. Esto da como resultado un incremento en la expresión de *aggR*. A nivel **elevados** de Aar, Aar se une a H-NS y alivia la represión, pero también se une a AggR previniendo su dimerización y activación, en consecuencia, se reprimen los genes que regula este activador tipo AraC/XylS. Imágenes basadas en: (Mickey & Nataro, 2020; Santiago et al. 2017). Imagen creada en: Biorender.com

De manera interesante, en EPEC existe un gen anotado como *RS14140* que codifica para un miembro de la familia ANR ubicado en el cromosoma de esta bacteria, la proteína putativa que codifica tiene un peso de 8.91 kDa y comparte una identidad del 28.8% y una similitud del 37.8% con respecto a la estructura primaria de Aar de EAEC (Figura 8) (Jaramillo, 2019).

En nuestro grupo de trabajo en el Centro de Detección Biomolecular nos interesamos en el estudio de esta proteína y su relación con la regulación de virulencia en EPEC, específicamente los genes controlados por PerA. Jaramillo (2019), identifica que el gen *RS14140*, más tarde renombrado como ANREP, se expresa en esta bacteria a niveles basales en las mismas condiciones ambientales que favorecen la expresión de los genes de virulencia (medio de cultivo DMEM a 37°C). Sin embargo, su máxima expresión se observa cuando EPEC es cultivada en presencia de sales de amonio, condiciones que reprimen la expresión de los genes de virulencia. Además, cuando ANREP es sobreexpresada a partir de un plásmido ejerce un efecto negativo sobre la transcripción de los genes regulados por PerA (*bfpA*, *perC* y el mismo *perA*) y algunos genes ubicados en la isla LEE (*espB* y *escJ*). El mismo efecto de represión se observa también a nivel de la expresión de las proteínas BfpA, EspA, entre otras; en presencia de ANREP en multicopia (Figuras 9 y 10) (Jaramillo, 2019).

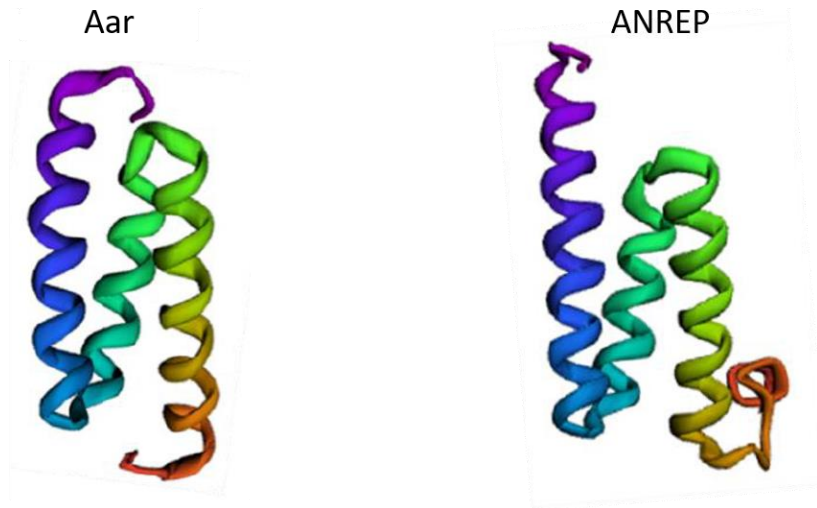
Tales datos sugieren que ANREP podría funcionar de manera similar a Aar de EAEC, es decir, a través de la interacción con un miembro de la familia AraC/XylS evitando su función como activador (Jaramillo, 2019). En este sentido, proponemos que el candidato principal por el que ANREP pueda funcionar como un regulador negativo sobre los genes analizados es mediante la interacción con el activador transcripcional PerA.

Por lo anterior, con el objetivo de analizar el mecanismo por el que funciona este miembro de la familia ANR en EPEC, en el presente trabajo se estudiará la posible interacción proteína-proteína entre ANREP y el activador transcripcional PerA, con la finalidad de comprender el papel que ANREP tiene en la red de regulación de los genes de virulencia de EPEC.

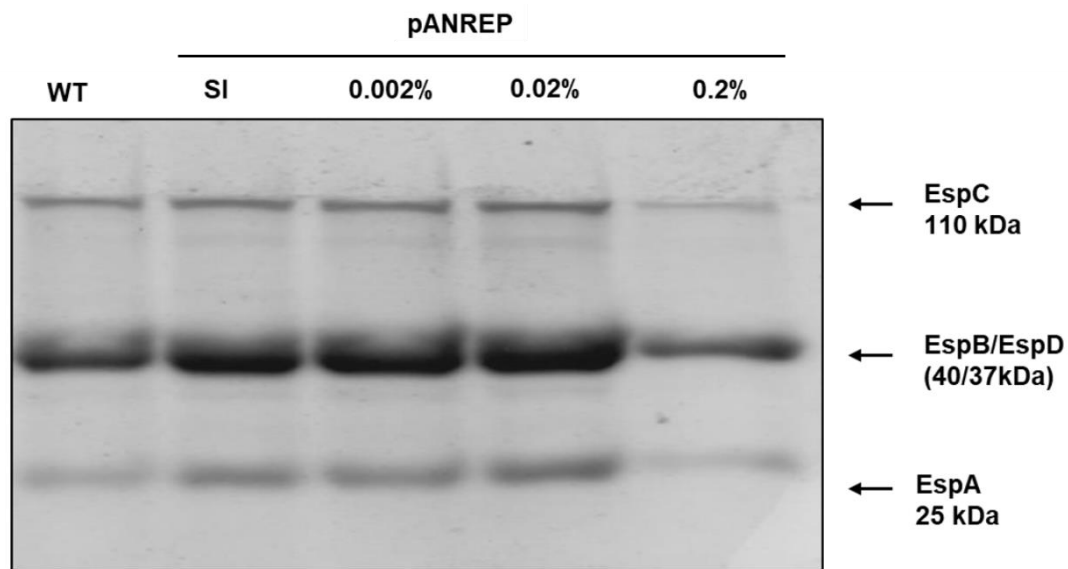
A)



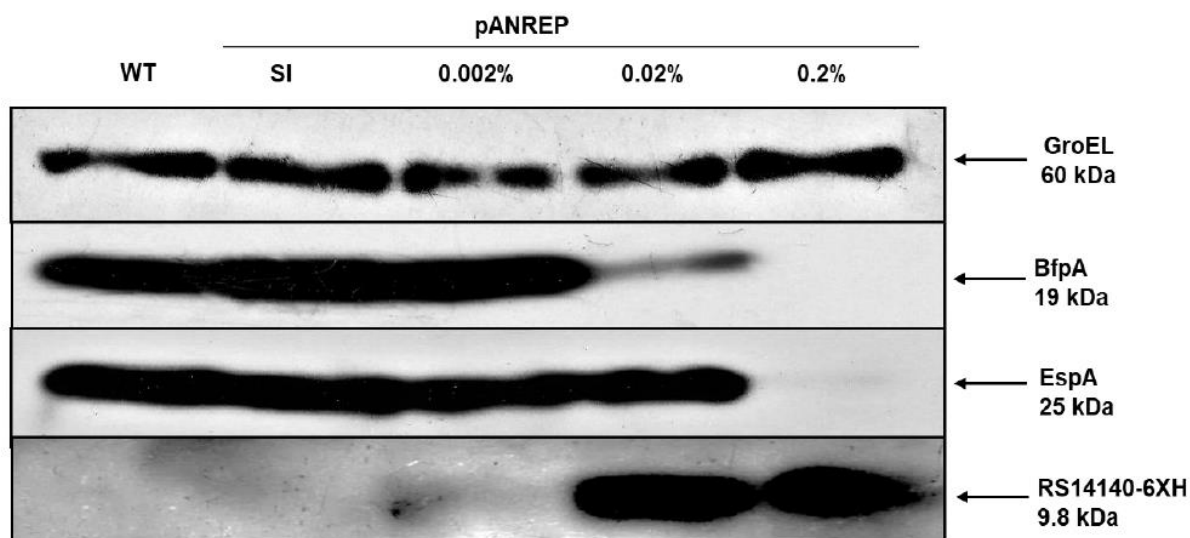
B)



**Figura 8. Comparación entre ANREP y Aar.** **A)** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre ANREP y Aar. Alineamiento realizado en el servidor EMBOSS Needle y predicción de las estructuras secundarias con Robetta®. Las líneas señalan los aminoácidos idénticos y los puntos (:) los aminoácidos similares entre ambas proteínas las cuales comparten 37.8% de similitud y 28.8% de identidad. En la secuencia de Aar se encuentran señalados con rojo, los aminoácidos necesarios para su actividad anti-virulencia (Santiago et al. 2016). Se indican en verde las coincidencias de estos aminoácidos entre ambas proteínas. **B)** Predicción de las estructuras terciarias de Aar (izquierda) y ANREP (derecha) generadas con el servidor Robetta®. Imagen tomada y modificada de: (Jaramillo, 2019).



**Figura 9. Efecto de ANREP sobre el perfil de proteínas secretadas de EPEC.** Perfil de proteínas secretadas separadas por electroforesis en gel de acrilamida al 15% y teñido con azul de Coomassie. De izquierda a derecha se encuentran: EPEC WT, EPEC + pANREP sin inducir (SI) e inducida con 0.002%, 0.02% y 0.2% de arabinosa. Se indica con una flecha a EspC (110kDa), seguido por EspB/EspD (40/37 kDa) y EspA (25kDa). Las muestras fueron tomadas a D.O.<sub>600</sub> = 1.2. Imagen tomada de: (Jaramillo, 2019).



**Figura 10. Efecto de ANREP sobre la expresión de BfpA y EspA en EPEC.** “Western blot” de extractos totales de las cepas EPEC WT y EPEC + pANREP crecidas en medio DMEM a 37°C/220 rpm, los cuales fueron separados SDS-PAGE al 15% y transferidos a una membrana de PVDF. La membrana fue incubada con los siguientes anticuerpos: anti-BfpA, anti-EspA, anti-GroEL y con sonda His-Probe-HRP. De izquierda a derecha se encuentran: EPEC WT, EPEC + pANREP sin inducir (SI) e inducida con 0.002%, 0.02% y 0.2% de arabinosa. Las muestras fueron tomadas a D.O.<sub>600</sub> = 1.0. Imagen tomada de: (Jaramillo, 2019).

### 3. JUSTIFICACIÓN

EPEC es uno de los principales agentes etiológicos de diarrea infecciosa en niños menores de 5 años en países subdesarrollados. La regulación de los genes de virulencia en EPEC es un proceso fundamental para el desarrollo de la enfermedad que provoca porque asegura la colonización exitosa en el huésped.

PerA es una proteína esencial en la regulación de la virulencia de EPEC, porque activa su propia expresión y la de la fimbria BFP. Al mismo tiempo, PerA tiene un efecto indirecto positivo sobre la expresión de los genes de virulencia codificados en la isla LEE. El mecanismo que utiliza para activar la transcripción de sus genes blanco es mediante la unión como monómero a una secuencia consenso de 29 pb rica en AT ubicada río arriba de los promotores que regula, además, tal unión favorece la interacción con las subunidades  $\alpha$  y  $\sigma$  de la maquinaria transcripcional para inducir la transcripción de sus genes blanco.

Recientemente, en bacterias patógenas se identificó la presencia de una nueva familia de reguladores anti-virulencia llamada ANR que contrarrestan la función de los miembros de la familia AraC/XylS. Al respecto, en nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que un miembro de esta familia llamado ANREP también ejerce un efecto de represión sobre genes regulados por PerA y sobre genes ubicados en la isla LEE. Sin embargo, el mecanismo que emplea esta proteína para reprimir es aún desconocido.

Por tanto, estudiar el papel de ANREP como una proteína anti-virulencia que podría modular la función del activador transcripcional PerA es de gran interés debido a que representa una estrategia interesante que los patógenos usan para reprimir su propia virulencia y que, por lo consiguiente, representan una potencial alternativa al empleo de antibióticos para el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

#### **4. HIPÓTESIS**

ANREP es un modulador negativo de los genes de virulencia en *E. coli* enteropatógena porque interactúa con PerA y evita que ésta active la transcripción de los genes que regula.

#### **5. OBJETIVOS**

##### **5.1 Objetivo general**

- Estudiar el papel de ANREP sobre la función del activador transcripcional PerA en *E. coli* enteropatógena.

##### **5.2 Objetivos particulares**

- Analizar por herramientas bioinformáticas la posible interacción entre ANREP y PerA.
- Evaluar la interacción proteína-proteína entre ANREP y PerA.
- Evaluar el efecto de la interacción entre ANREP y PerA sobre la capacidad de ésta última para unirse al ADN de los genes que regula.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cepas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas 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 baño de agitación a 220 rpm. A los medios se les agregó ampicilina (100 mg/ml) y, estreptomicina (100 mg/ml), según fue requerido. Las cepas y plásmidos utilizados para este trabajo se indican en la tabla 2 y en la tabla 3 los oligonucleótidos empleados.

<b>Tabla 2. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.</b>		
<b>Cepa</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>
E2348/69	Cepa silvestre de EPEC O127:H6. St <sup>R</sup>	J.B. Kaper
BL21 (DE3) pLysS	Cepa no patógena de <i>E. coli</i> con el genotipo $\Delta ompT$ ( <i>lon</i> ) <i>hsdSB</i> (rB- mB-) <i>gal dcm</i> ( $\Delta DE3$ ) pLysS	New England Biolabs
<b>Plásmidos</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>
pMALC2xa	Plásmido para fusiones con MBP, Amp <sup>R</sup>	New England Biolabs
pMALT2	Plásmido para la expresión de la fusión MBP-PerA, derivado de pMALC2xa	Ibarra et al., 2003
pANREP	Plásmido con el gen clonado ANREP y una secuencia que codifica 6 histidinas en pBAD/Myc-His A en los sitios <i>NcoI</i> y <i>HindIII</i>	Jaramillo, 2019
pCAT201	Derivado del pKK232-8 con la región -201 a +76 del promotor del gen <i>bfpA</i>	Sohel et al., 1996

<b>Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo</b>			
<b>Nombre</b>	<b>Secuencia 5' a 3'</b>	<b>Descripción</b>	<b>Referencia</b>
pKK-8-BH1F	GGAATTCTCGGG GAT	Amplifica la región de unión de PerA en <i>bfpA</i> , usado para EMSA	Ibarra et al., 2003
pKK-8-H3R	GTTTTGTCCTACT CAAGG	Amplifica la región de unión de PerA en <i>bfpA</i> , usado para EMSA	Ibarra et al., 2003

## 6.2 Análisis bioinformáticos

Las secuencias primarias de las proteínas fueron obtenidas de NCBI (National Center of Biotechnology Information). Para la búsqueda preliminar de la interacción de ANREP-PerA se usó el servidor en línea “PSOPIA” (<https://mizuguchilab.org/PSOPIA/>); para la predicción de los sitios de interacción se utilizó el servidor web “iFrag” (<http://sbi.imim.es/iFrag/>); para predecir la afinidad de unión entre ambas proteínas se calcularon los valores en “PPA-Pred2” ([https://www.iitm.ac.in/bioinfo/PPA\\_Pred/index.html](https://www.iitm.ac.in/bioinfo/PPA_Pred/index.html)). Para la predicción de las estructuras terciarias se utilizó el servidor “I-TASSER” (<https://zhanglab.dcmf.med.umich.edu/I-TASSER/>); para predecir la interacción proteína-proteína por enhebrado se utilizó el programa “SPRING” ubicado en el servidor de “I-TASSER” (<https://zhanggroup.org/spring/>). El acoplamiento de los complejos proteicos fue evaluado en el servidor “ClusPro2” (<https://cluspro.bu.edu/login.php>). Finalmente, las estructuras terciarias y los modelos de acoplamiento fueron modificados en el programa “Pymol” (<https://pymol.org/2/>).

## 6.3 Sobreexpresión y purificación de proteínas MBP-PerA y ANREP-6XH

Para purificar MBP-PerA: la cepa BL21 (DE3) pLysS transformada con el plásmido pMalC2xa o con el plásmido pMALT2 se cultivaron a 37°C en baño de agitación a 220 rpm en medio LB suplementado con ampicilina durante toda la noche. De estos cultivos se inocularon en una proporción 1: 100 en medio LB con 0,2% de glucosa y ampicilina, se incubaron a 37°C en baño de agitación, al alcanzar  $DO_{600} = 0.4$  a  $0.6$ , se les agregó 0.3 mM de Isopropil  $\beta$ -D-1- tiogalactopiranosido (IPTG) y se dejaron incubando a 30°C durante 3 horas más. Posteriormente, los cultivos se concentraron por centrifugación y las células se resuspendieron en un buffer de columna (10 mM Tris-HCl [pH 7,4], 200 mM NaCl 200, 1 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -mercaptoetanol) y se guardaron a -70°C. Las células se lisaron por sonicación y se centrifugaron para obtener el extracto de proteínas soluble.

La purificación de la proteína MBP-PerA se llevó a cabo por cromatografía de afinidad empleando 3 ml de resina de amilosa (New England BioLabs), el extracto proteico soluble se dejó interactuando con la resina por 2 horas en frío, se recuperó todo el extracto y se dejó interactuando por 30 minutos, posteriormente se hicieron lavados con 300 ml de buffer de columna para eliminar las proteínas inespecíficas. Después, la proteína de interés se eluyó de la columna con 10 ml de buffer de columna adicionado con 10 mM de maltosa, se

recuperaron las fracciones proteicas, se realizaron alícuotas de 200  $\mu$ l y se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, se analizaron las distintas fracciones proteicas por SDS-PAGE.

Para purificar ANREP-6XH: la cepa BL21 (DE3) transformada con el plásmido pANREP se cultivó a  $37^{\circ}\text{C}$  en baño de agitación a 220 rpm en medio LB suplementado con ampicilina durante toda la noche. De estos cultivos se inocularon en una proporción 1:100 en medio LB con ampicilina, se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  en baño de agitación, al alcanzar  $\text{DO}_{600} = 0.4$  a 0.6, se le agregó arabinosa al 0.2% y se dejó incubando a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 4 horas más. Posteriormente, los cultivos se concentraron por centrifugación y las células se resuspendieron en un buffer de fosfatos salino (PBS 1X) a pH 7.4 (136.9 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) y se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Las células se lisaron por sonicación y se centrifugaron para obtener el extracto de proteína soluble.

La purificación de ANREP-6XH se llevó a cabo por cromatografía de afinidad empleando una resina de níquel “Ni-NTA Agarose” (Invitrogen), el extracto proteico soluble se dejó interactuando con la resina por 2 horas en frío, se recuperó todo el extracto y se dejó interactuando por 30 minutos, posteriormente se hicieron lavados con 300 ml de PBS 1X para eliminar las proteínas inespecíficas. Después, la proteína de interés se eluyó de la columna con 10 ml de PBS 1X adicionado con 250 mM de imidazol, se recuperaron las fracciones proteicas, se realizaron alícuotas de 200  $\mu$ l y se guardaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, se analizaron las distintas fracciones proteicas por SDS-PAGE.

#### **6.4 Diálisis y concentración de la proteína MBP-PerA y ANREP-6XH**

La diálisis de las proteínas purificadas MBP-PerA y ANREP-6XH, se hizo con una membrana de diálisis “Spectra/Por®” MWCO: 6,000-8,000.

Para MBP-PerA se adicionaron los 10 ml de la proteína purificada en la membrana y se sumergió en 500 ml de regulador de columna frío, se dejó dializar en agitación a  $4^{\circ}\text{C}$  con recambios de buffer de columna frío cada 2 horas en tres ocasiones con el objetivo de intercambiar la maltosa por el buffer de columna y para eliminar la interferencia de la maltosa en los ensayos interacción proteína-proteína.

Para ANREP-6XH se adicionaron los 10 ml de la proteína purificada en la membrana y se sumergió en 500 ml PBS 1X frío, se dejó dializar en agitación a  $4^{\circ}\text{C}$  con recambios de PBS 1X frío cada 2 horas en tres ocasiones, con el objetivo de intercambiar el imidazol por

PBS 1X y para eliminar la interferencia del imidazol como una sal, en los ensayos interacción proteína-proteína.

Una vez finalizado el proceso de diálisis, tanto MBP-PerA y ANREP-6XH fueron concentradas en la membrana, se colocaron en un recipiente con azúcar convencional de mesa (sacarosa) hasta que el buffer de columna o el PBS 1X fuera absorbido por la sacarosa, respectivamente. Adicionalmente, las dos proteínas se concentraron hasta un volumen aproximado de 3 ml. Al final, ambas proteínas fueron alícuotadas y almacenadas a -70°C.

### 6.5 Cuantificación de proteínas por el método de Bradford

La cuantificación de las proteínas purificadas MBP-PerA y ANREP-6XH se llevó a cabo por el método de Bradford. Se realizó primero una curva estándar con albúmina sérica bovina (BSA), PBS 1X o regulador de columna; según la proteína, como se indica en la tabla 4. Para cada concentración se adicionó 1 ml de solución de trabajo de Bradford (BioRad), 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®).

<b>Tabla 4. Concentración estándar para cuantificación por Bradford.</b>										
<b>Absorbancia</b>	0.036	0.122	0.256	0.363	0.446	0.526	0.595	0.636	0.717	0.747
<b>Concentración de BSA (µg)</b>	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18

Posteriormente se tomaron alícuotas de 30 µl de las proteínas purificadas, se añadieron 70 µl de buffer (dependiendo de cada proteína) y 1 ml de la solución de trabajo de Bradford. Se dejó interactuando 5 minutos a temperatura ambiente y se leyó a D.O.=595nm. Al final, se estableció una relación de la absorbancia con respecto a la curva estándar para determinar la concentración de la proteína.

### 6.6 Ensayo de cambio de movilidad electroforética (EMSA)

Para este ensayo primero se realizó una PCR punto final, para lo cual se utilizó como molde el plásmido pCAT232 para amplificar el fragmento de la secuencia reguladora de *bfpA* (-232 a +36), con los oligonucleótidos pKK-8-BH1F y pKK-8-H3R. Las reacciones se realizaron bajo las siguientes condiciones:

Desnaturalización inicial:	1 min a 95°C	} 30 ciclos
Desnaturalización:	1 min a 95°C	
Alineamiento:	1 min a 56°C	
Extensión:	1 min a 72°C	
Extensión final:	10 min a 72°C	

Posteriormente, se incubaron 250 ng de los fragmentos de *bfpA* con el buffer de unión (25 mM HEPES [pH 7,9], 40 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ditioneitol [DTT], 0,1 mM EDTA, glicerol al 5%; pH 8.0) más concentraciones crecientes de MBP (120 nM, 248 nM, 476 nM, 637 nM) o MBP-PerA (120 nM, 248 nM, 476 nM, 637 nM), en un volumen final de 25 µl durante 20 minutos a 4°C. Después, las muestras se cargaron en un gel de acrilamida-bisacrilamida nativo al 6% con TBE (Tris-borato-EDTA) 0.5% y se sometieron a electroforesis a 110 V. Al final, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Carestream Gel Logic 2200 PRO).

### 6.7 Ensayo de interacción proteína-proteína por “pull-down”

Para los ensayos tipo “pull-down” se incubaron 40 µg de ANREP-6XH purificada con 60 µl de la resina de níquel y 100 µl del buffer de unión (100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 600 mM NaCl, 40 mM imidazol, glicerol 20%), a 4 °C por 2 horas en agitación. Posteriormente se agregaron 40 µg de las proteínas MBP-PerA o MBP purificadas, esta última como control. Las perlas con las proteínas unidas se lavaron 10 veces con PBS 1X frío. Finalmente, los productos de la interacción se resuspendieron en 50 µl de buffer laemmli (glicerol al 50%, SDS al 20%, β-mercaptoetanol al 10%, 0.125 M Tris-HCl y azul de bromofenol) para hervirse durante 10 minutos a 100°C. Los productos se corrieron en un gel de acrilamida al 12% y al final se analizaron por “western blot”.

### 6.8 “Western Blot”

Las fracciones de los ensayos de interacción proteína-proteína fueron separados por SDS-PAGE al 12% y posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Thermo Fisher Scientific) en una cámara de transferencia semiseca “TRANS-BLOT” (Bio Rad) a 15V por 45 minutos. La membrana de PVDF con las proteínas ya transferidas se bloqueó con leche baja en grasa al 10% (SVELTY) disuelta en PBST (PBS 1X, 0.5M NaCl, 0.1% Tween) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se retiró la leche y se lavó con

PBST, después se incubó con el anticuerpo primario o sonda anti-histidinas (His-Probe HRP) con las siguientes diluciones por 2 horas:

His-Probe HRP	1:5000	(Thermo Fisher Scientific)
Anti-MBP	1:20000	(Centro de Detección Biomolecular)

Se realizaron tres lavados con PBST y la membrana se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo diluido 1:20000 acoplado a peroxidasa de rábano (la sonda His-Probe HRP ya tiene acoplada la peroxidasa), durante 1 hora. Se realizaron nuevamente 3 lavados con PBST y se agregaron los reactivos “Luminol enhancer solution” y “Peroxide solution” (Thermo Fisher Scientific) en proporción 1:1. Finalmente se procedió a revelar en una película fotográfica (Kodak X-Omat LS film).

### **6.9 Generación de anticuerpos policlonales para detectar a ANREP**

En una coneja de la raza Nueva Zelanda de 3 meses de edad se procedió a extraer 0.2 ml de suero en el día 1, posteriormente se procedió a inyectar 0.5 ml de la proteína purificada (ANREP-6XH) (450 µg) mezclado con 0.5 ml del adyuvante completo de Freund´s (Sigma-Aldrich) En el día 21 se inyectó la misma cantidad de proteína (ANREP-6XH) más 0.5 ml de adyuvante incompleto de Freund´s (Sigma-Aldrich). En el día 30 se obtuvo 0.2 ml de suero. Posteriormente, en el día 42 se inyectaron 0.5 ml de ANREP-6XH (450 µg) mezclado con 0.5 ml del adyuvante incompleto de Freund´s. Al día 50, se extrajo y se obtuvo la sangre total de la coneja. El suero fue obtenido mediante centrifugación a 4500 rpm durante 15 minutos y se almacenó a -20°C.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Análisis bioinformáticos

#### 7.1.1 Búsqueda *in silico* de la interacción entre ANREP y PerA

Para evaluar la posible interacción entre ANREP y PerA, se extrajeron las secuencias primarias de ambas proteínas de la base de datos del NCBI del genoma de EPEC. La primera se ubica en el cromosoma y se encuentra con la clave: WP\_000553850.1 y la segunda se ubica en el plásmido pEAF y se encuentra con la clave: CAS07456.1. Asimismo, las secuencias primarias se cargaron al servidor web “PSOPIA” (Prediction Server of Protein-Protein Interactions). PSOPIA genera un valor de 0 o 1 que indican las probabilidades de interacción, siendo 1 un valor muy alto de interacción entre las proteínas de interés. Los valores son resultado de 4 parámetros: 1)  $S_{seq}$  es una puntuación predicha utilizando solo información de las similitudes de las secuencias con proteínas que se ha demostrado experimentalmente que sí tienen interacción. 2)  $S_{dom}$  es una puntuación que se predice utilizando solo información de las predisposiciones estadísticas de las interacciones dominio-dominio. 3)  $S_{net}$  es una puntuación que pronostica la interacción proteína-proteína utilizando sus pesos y la distancia de interacción más corta entre éstas, comparándolas con posibles homólogos. 4) ALL (total) es el promedio de los 3 parámetros anteriores (Murakami & Mizuguchi, 2014).

El análisis de la interacción entre ANREP y PerA por este programa predijo un valor de 0.3537 (Figura 11A). Para comparar, se introdujeron las secuencias de las proteínas homólogas presentes en EAEC: Aar y AggR y también las de Aar y H-NS; complejos que se han demostrado experimentalmente que sí interactúan (Figura 11B y E) (Santiago et al. 2014, 2016, 2017). Curiosamente los valores de la interacción son muy similares a los de ANREP y PerA (0.3537). Lo que presuntivamente indica la posible unión e interacción entre estas proteínas.

Adicionalmente, se probó la interacción de ANREP con las proteínas Ler y GrlA, debido a su importancia en la activación de los genes de virulencia de EPEC ubicados en la isla LEE, y también por ser posibles objetivos de la actividad anti-virulencia de ANREP en las condiciones experimentales probadas por Jaramillo (2019). Los resultados obtenidos fueron para ANREP-Ler y ANREP-GrlA de 0.3613 y 0.3537, respectivamente (Figura 11C y D). Lo que indica su probable interacción. Además, como control positivo se cargaron las

secuencias de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la ARN polimerasa (RpoA-RpoB) que ya se sabe que interactúan. El valor generado por “PSOPIA” fue de 0.9462 (Figura 11F) (Heyduk et al. 1996; Murakami & Darst, 2003). Finalmente, se cargó las secuencias de las proteínas correspondientes al control negativo contenidas en el genoma de EPEC (Eno-OmpF). La proteína Enol, es una proteína implicada en la vía metabólica de la glucólisis en la conversión de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato y la proteína OmpF, es una proteína que conforma a una porina de membrana externa. El valor resultante fue de 0 que sugiere una improbable interacción entre ambas (Figura 11G).

A)	SEQUENCE1: ANREP Pfam SEQUENCE2: PerA Pfam						
	Sseq	Sdom	Snet	Sall			
	0.3537	0.0000	0.0000	0.3537			
B)	SEQUENCE1: Aar Pfam SEQUENCE2: AggR Pfam						
	Sseq	Sdom	Snet	Sall			
	0.3537	0.0000	0.0000	0.3537			
C)	SEQUENCE1: ANREP Pfam SEQUENCE2: Ler Pfam						
	Sseq	Sdom	Snet	Sall			
	0.3613	0.0000	0.0000	0.3613			
D)	SEQUENCE1: ANREP Pfam SEQUENCE2: GrlA Pfam						
	Sseq	Sdom	Snet	Sall			
	0.3537	0.0000	0.0000	0.3537			
E)	SEQUENCE1: Aar Pfam SEQUENCE2: H-NS Pfam						
	Sseq	Sdom	Snet	Sall			
	0.3613	0.0000	0.0000	0.3613			
F)	SEQUENCE1: RpoA Pfam SEQUENCE2: RpoB Pfam						
	Sseq	Sdom	Snet	Sall			
	0.3807	0.9851	0.0000	0.9462			
G)	SEQUENCE1: Eno Pfam SEQUENCE2: OmpF Pfam						
	Sseq	Sdom	Snet	Sall			
	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000			

**Figura 11. Predicción de la interacción proteína-proteína entre ANREP y PerA mediante PSOPIA.** Las secuencias primarias se extrajeron de la base de datos del NCBI y se subieron al servidor web “PSOPIA”. **A)** Interacción proteína-proteína de ANREP y PerA. **B)** Aar y AggR. **C)** ANREP y Ler. **D)** ANREP y GrlA. **E)** Aar y H-NS. **F)** Las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la ARN polimerasa. **G)** Enolasa y OmpF de EPEC. Imagen generada en: “PSOPIA” (<https://mizuguchilab.org/PSOPIA/>).

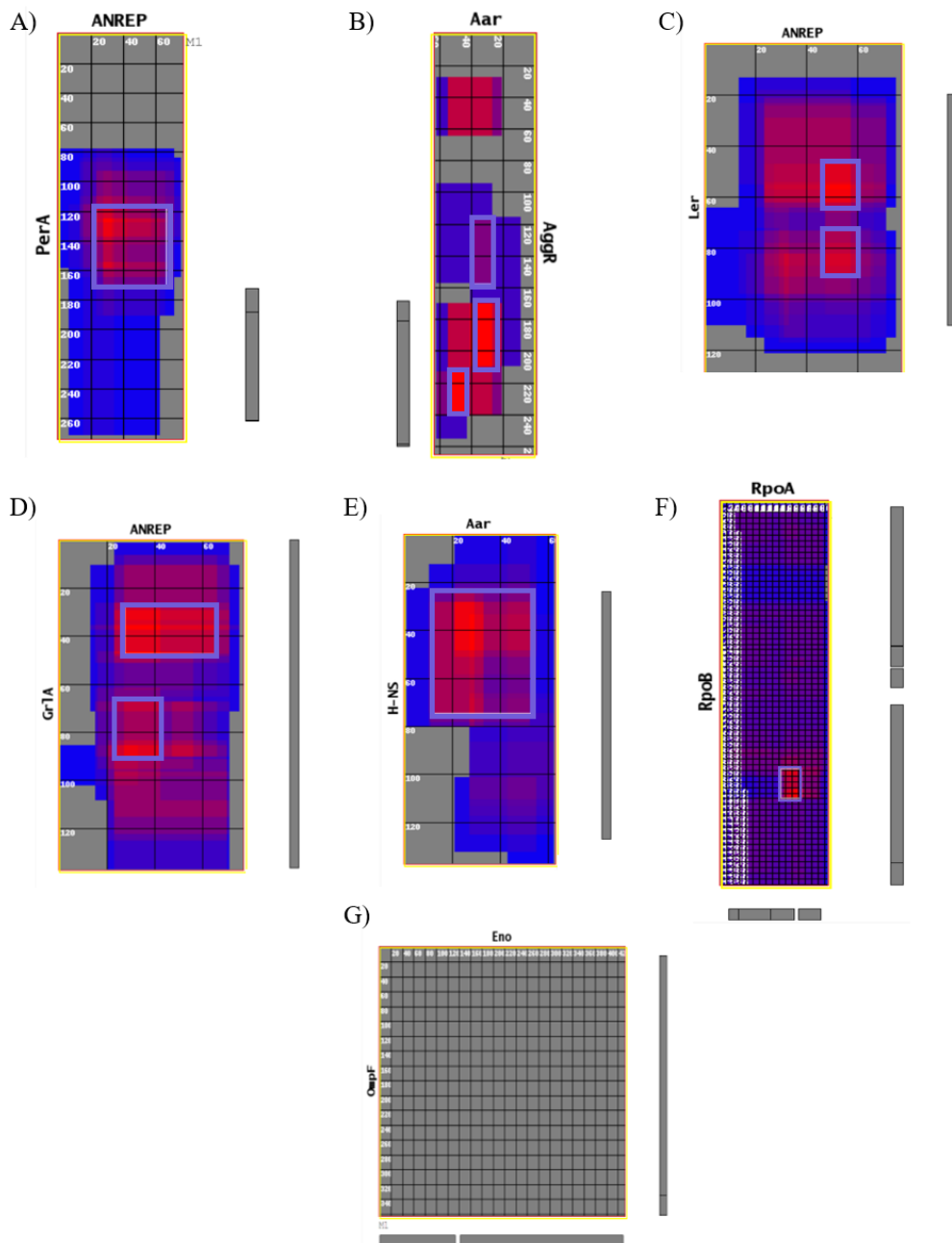
### **7.1.2 Búsqueda de los posibles sitios de interacción entre ANREP y PerA**

Para determinar los sitios probables de interacción entre ANREP y PerA, se procedió a introducir las secuencias proteicas al servidor web “iFrag”. Este servidor realiza una búsqueda para determinar la similitud de una secuencia primaria mínima entre un par de proteínas para predecir alguna(s) región(es) de interacción entre estas dos secuencias, sólo teniendo en cuenta la información de la secuencia. Además, iFrag establece una calificación de cada uno de los residuos de ambas proteínas con base a una plantilla en una base de datos de proteínas que ya se ha demostrado experimentalmente que tienen interacción. El resultado de lo anterior es la generación de un mapa de colores con las puntuaciones de los pares de residuos (regiones cortas) que potencialmente interactúan entre las dos proteínas. Complementariamente, los resultados pueden arrojar anotaciones de otras bases de datos como Uniprot y los dominios PFAM (Garcia-Garcia et al. 2017).

Los resultados del servidor mostraron sitios potenciales de interacción entre ANREP y PerA, en las posiciones 21 a 67 y 116 a 172, respectivamente (Figura 12A, en color rojo y encerrado con cuadro azul). De manera interesante, las posiciones identificadas en ANREP con este programa abarcan algunos de los residuos de la secuencia conservada entre los miembros de la familia ANR (A22, W26, A29, W43 y R47) ubicados entre la segunda y tercera alfa hélice de la probable estructura de ANREP (Santiago et al. 2014, 2016). Mientras que, para PerA, estas posiciones probables de interacción con ANREP se sitúan en la parte media y final del dominio N-terminal (1-160), en el conector (161-163) y en la parte inicial del dominio C-terminal (164-274). Lo que indicaría que el sitio probable interacción se ubica entre la región que flaquea al sitio conector (Ibarra et al. 2013).

Adicionalmente, se probó la interacción entre Aar y AggR (Figura 12B), los resultados obtenidos sugieren interacción en diversos sitios de diferente longitud y localización. Por ejemplo, un sitio en Aar que va desde las posiciones 27 hasta 41 con un sitio en AggR que comprende desde la posición 115 hasta 158. Otros ejemplos van desde las posiciones: 19 a 55 (Aar) con 27 a 63 (AggR) y 26 a 41 (Aar) con 170 a 209 (AggR) (señalados con cuadros azules) (Figura 12B). Lo anterior coincide de manera parcial con lo determinado experimentalmente por Santiago et al. (2016). Este grupo identificó experimentalmente que Aar se une a la región central de AggR (68 a 181) a través de algunos de los residuos que

conforman la segunda [26-27 (A y F), 32-33 (L y A)] y tercera hélice  $\alpha$  de Aar [44-45 (E y W), 48-49 (N y R), 50-51 (A y M) y 52-53 (F y C)].



**Figura 12. Sitios probables de interacción entre ANREP y PerA.** Las secuencias primarias se extrajeron de la base de datos del NCBI y se subieron al servidor web “iFrag”. Los sitios de color rojo muestran una puntuación mayor de interacción de acuerdo con la secuencia primaria de cada proteína. Algunos de estos sitios se encierran en rectángulos y se remarcan en las todas las interacciones probadas. Los sitios de color azul muestran una puntuación baja de interacción y los de color gris una interacción nula. Adicionalmente, hacia los lados del cuadro de las interacciones se observan cuadros de color gris, que muestran los dominios proteicos generados automáticamente por PFAM. Imagen generada en: “iFrag” (<http://sbi.imim.es/iFrag/>).

De manera adicional, se predijeron los sitios probables de interacción entre ANREP- con Ler, GrlA y H-NS (Figura 12C, D y E). Los sitios probables de interacción se muestran en la tabla 5.

<b>Tabla 5. Sitios probables de interacción entre ANREP con reguladores de virulencia detectados por “iFrag”</b>			
<b>Proteína 1</b>	<b>Posición</b>	<b>Proteína 2</b>	<b>Posición</b>
ANREP	47 a 57	Ler	47 a 62
	47 a 57		73 a 91
ANREP	27 a 67	GrlA	27 a 47
	27 a 47		67 a 90
Aar	11 a 52	H-NS	28 a 74

Adicionalmente, este programa bioinformático sugiere regiones probables de interacción a lo largo de las secuencias que codifican para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la ARN polimerasa. Mientras que no se encontró ningún sitio probable de interacción entre Eno y OmpF (Figura 12 F y G).

### **7.1.3 Estimación de la afinidad entre ANREP y PerA**

Para predecir la afinidad entre las diferentes interacciones, se procedió a introducir las secuencias de ANREP, PerA, Aar, AggR Ler, GrlA, H-NS, entre otras. Al servidor web “PPA-Pred2”, que predice la energía libre de unión representada por la energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ), el resultado es un valor que indica la suma de las interacciones intermoleculares que podrían ocurrir entre ambas proteínas. Además, el servidor también estima la constante de disociación (kD) que indica la afinidad entre las dos proteínas. Los valores de  $\Delta G$  entre más alejados del 0 indican una interacción favorecida energéticamente. Mientras que los valores de kD entre más negativos, indican una mayor estabilidad del complejo (Yugandhar & Gromiha, 2014).

Entre las características que utiliza el servidor para predecir la afinidad de unión se encuentran: la función de las proteínas, su peso molecular y el porcentaje de los residuos de los probables sitios de unión. Con los valores de cada uno de los criterios, el programa genera una correlación y así una puntuación de la  $\Delta G$  y la kD (Yugandhar & Gromiha, 2014).

Para ANREP y PerA se obtuvo una  $\Delta G = -9.12$  kcal/mol y una kD del  $2.04 \times 10^{-7}$  M. En el caso de la interacción ya demostrada experimentalmente entre Aar y AggR la  $\Delta G = -9.10$  kcal/mol y la kD es de  $2.10 \times 10^{-8}$  M, estos valores son similares a los de la interacción

ANR-PerA, lo cual estima una unión relativamente estable y energéticamente favorable. Este último dato fue similar a lo determinado por Santiago et. al. (2016), a través de resonancia de plasmón superficial, ellos obtuvieron unos valores de  $k_D = 4.13 \times 10^{-8} \text{ M}$  y  $2.04 \times 10^{-8} \text{ M}$ .

Para el caso de las interacciones de ANREP-Ler, ANREP-GrlA y Aar-H-NS, se obtuvieron valores de una  $\Delta G = -9.93 \text{ kcal/mol}$ ,  $-12.50 \text{ kcal/mol}$  y  $-10.06 \text{ kcal/mol}$ , y unos valores de  $k_D = 5.25 \times 10^{-8} \text{ M}$ ,  $6.86 \times 10^{-10} \text{ M}$  y  $4.22 \times 10^{-8} \text{ M}$ , respectivamente. Lo cual indicaría una afinidad estable a concentraciones en el orden de nanomolar.

Para las subunidades de la ARN polimerasa:  $\alpha$ - $\beta$ , se obtuvieron valores de  $\Delta G = -12.03 \text{ kcal/mol}$  y una  $k_D = 1.5 \times 10^{-11}$ . Este dato representa otro control positivo de nuestro análisis bioinformáticos debido a la interacción proteína-proteína ya demostrada en el proceso de la transcripción de los genes (Murakami & Darst 2003). Por último, en el caso de las proteínas Eno y OmpF, se obtuvieron valores de una  $\Delta G = -6.53 \text{ kcal/mol}$  y una  $k_D = 3.00 \times 10^{-6} \text{ M}$ . Lo cual sugiere una baja probabilidad de interacción entre estas proteínas.

#### **7.1.4 Predicción de las estructuras terciarias de ANREP y PerA**

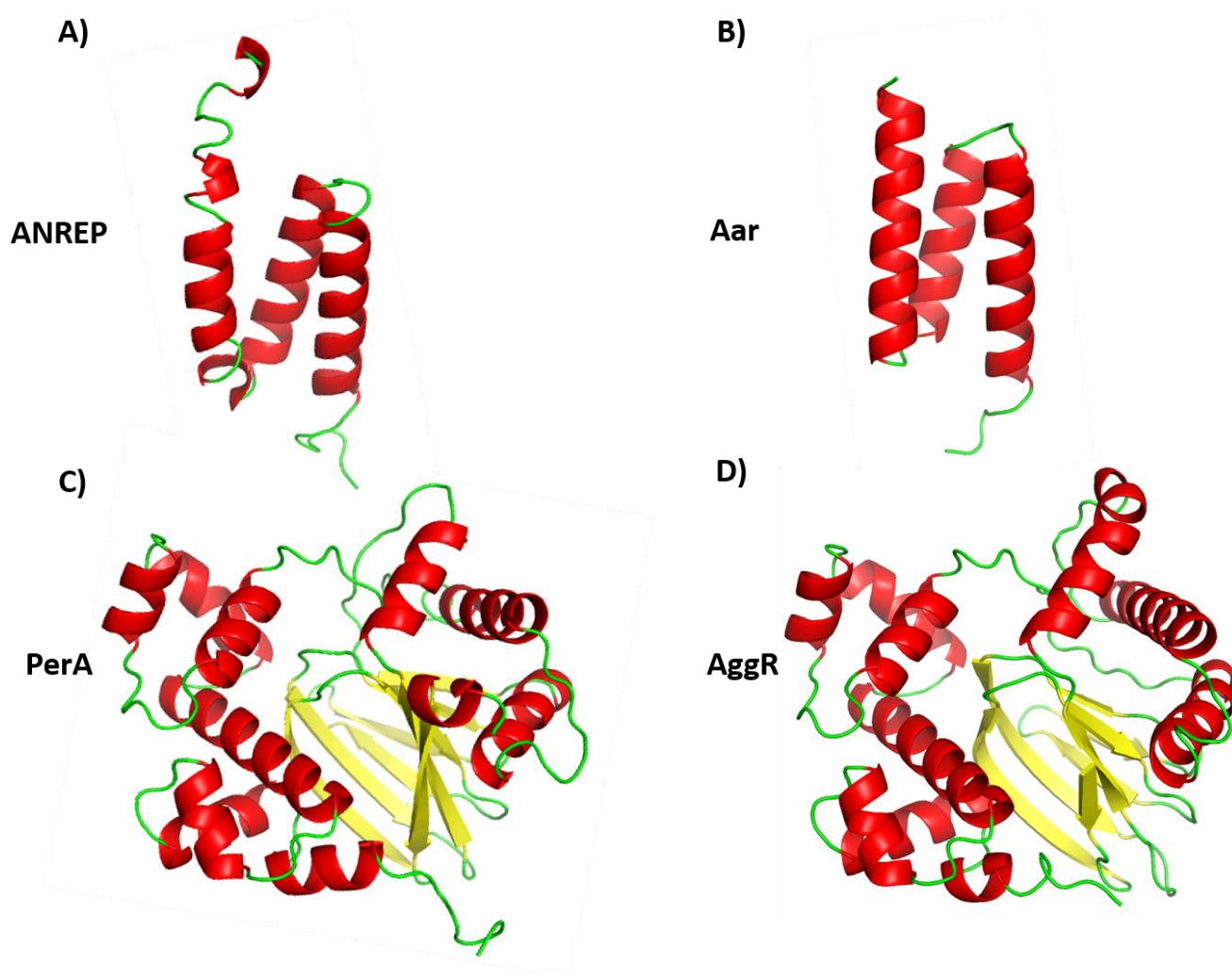
Para evaluar el acoplamiento molecular de las proteínas primero se predijeron las estructuras terciarias de ANREP, PerA, Aar y AggR, a través del servidor "I-TASSER". La predicción a nivel gráfico de ANREP y Aar coincide con lo reportado por Jaramillo (2019). Se decidió utilizar las predicciones generadas por I-TASSER debido a su facilidad de uso y por su alta calificación en el CASP14 (Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction), este último es un experimento a escala mundial para evaluar la capacidad de los servidores para predecir las estructuras de las proteínas (Kryshtafovych et al. 2019).

De los modelos obtenidos en el servidor de I-TASSER, se seleccionó el que obtuvo mejores puntuaciones en tres características: C-score, TM-score y RMSD (root-mean-square deviation). C-score es un valor de confiabilidad para estimar la calidad de los modelos predichos, TM-score es una puntuación para medir la similitud entre la plantilla y el modelo generado, y RMSD es la distancia promedio entre los pares de residuos de la plantilla y el modelo. Los valores de C-score son de -5 a 2, siendo 2 el valor más alto correspondiente a un modelo confiable. En el caso de la TM-score, las mejores plantillas son aquellas que tienen una TM-score  $>0.5$  y, por último, el valor de RMSD entre más pequeño (cercano a 0) es mejor.

El modelado por homología realizado en I-TASSER, utilizó como templado: el dominio citosólico de la proteína BamD de *Rhodothermus marinus* (PDB:3QKY), el dominio soluble de TM1634 de *Thermotoga marítima* (PDB:2VKJ), el dominio conservado de ToxT de *Vibrio cholerae* (PDB: 3GBG) y el dominio conservado de Rns de ETEC (PDB: 6XIU), para modelar a ANREP, Aar, PerA y AggR, respectivamente. Asimismo, automáticamente I-TASSER generó los 5 mejores modelos más sus respectivas puntuaciones (Yang & Zhang, 2015).

Para los miembros de la familia ANR. La proteína ANREP generó valores de C-score =-2.07, TM-score=0.47±0.15 y RMSD=7.8±4.4Å. En el caso de su homólogo Aar generó valores de C-score =-0.42, TM-score= 0.66 ±0.13 y RMSD=3.9± 2.6 Å. De acuerdo con los parámetros anteriores, ambos modelos se consideraron con valores óptimos. Estructuralmente ambas proteínas están formadas por hélices  $\alpha$ , la diferencia fue que ANREP está conformada por 4 y Aar sólo por 3.

En los miembros de la familia AraC/XylS se obtuvieron mejores valores debido a que existen homólogos de la familia que ya se encuentran cristalizados y depositados en las bases de datos, como ToxT, MarA, entre otros. En PerA se obtuvo una C-score=0.57, TM-score=0.79±0.09 y RMSD=4.8±3.1Å. Para AggR se obtuvieron valores de C-score=0.14, TM-score=0.73±0.11 y RMSD=5.6±3.6Å. Estructuralmente, ambas proteínas están formadas por hélices  $\alpha$  y hojas  $\beta$  plegadas. Una de las diferencias entre ambas es que PerA solo está conformada por 6 hojas  $\beta$  plegadas mientras que AggR por 8 hojas  $\beta$ . Al igual que los anteriores, los modelos de PerA y AggR, obtuvieron puntajes óptimos para poder utilizarlos en estudios de acoplamiento molecular. Para estos estudios, se tomó el modelo con mayor puntuación predicho por I-TASSER (de ANREP, Aar, PerA y AggR) para acoplar a ANREP con PerA y Aar con AggR.



**Figura 13. Predicción de las estructuras terciarias de ANREP y PerA.** Las secuencias primarias de ANREP, Aar, PerA y AggR se extrajeron de la base de datos del NCBI y se cargaron al servidor web “I-TASSER”. Se seleccionó el mejor modelo predicho de acuerdo con sus valores de C-score, TM-score y RMSD. **A)** Estructura terciaria de ANREP. **B)** Estructura terciaria de Aar. **C)** Estructura terciaria de PerA. **D)** Estructura terciaria de AggR. El color rojo representa las hélices  $\alpha$ , el color amarillo las hojas  $\beta$  plegadas y el color verde los bucles (conectores) entre cada estructura secundaria. Imágenes generadas y modificadas en: “I-TASSER” (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) y Pymol” (<https://pymol.org/2/>).

### 7.1.5 Estudios de acoplamiento molecular de ANREP y PerA

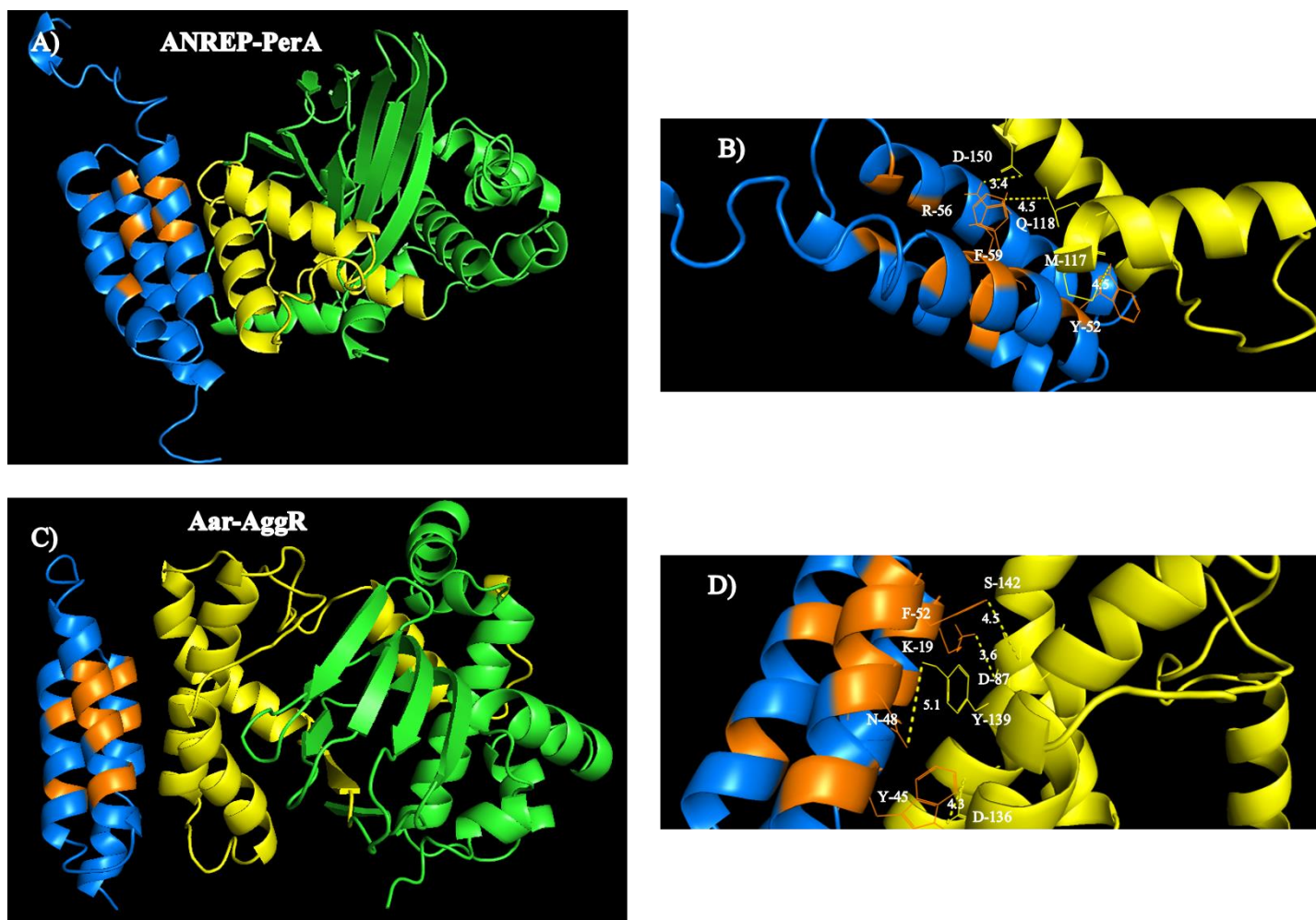
Para estudiar el posible acoplamiento entre ANREP y PerA se procedió a subir las estructuras terciarias de ANREP, PerA, Aar y AggR al servidor ClusPro2. Este es un servidor basado en el acoplamiento rígido de las estructuras, es decir, que tanto el receptor como el ligando funcionan como dos bloques rígidos, que no presentan movimiento en las cadenas laterales ni en sus estructuras secundarias.

El servidor realiza tres pasos: 1) acoplamiento de cuerpo rígido mediante muestreo de miles de millones de conformaciones, 2) agrupación basada en la RMSD de las 1000 estructuras que presentan una energía muy baja para encontrar los grupos más grandes que representarán los modelos más probables del complejo (cerca del nativo) y, 3) refinamiento de estructuras seleccionadas usando la minimización de la energía (Kozakov et al. 2017).

La mejor manera de clasificar los modelos en ClusPro2 es por el tamaño del grupo de modelos. El tamaño del grupo es definido por el número de posibles proteínas acopladas dentro de una RMSD  $<10 \text{ \AA}$  que es el valor mínimo presente en el acoplamiento de las proteínas nativas. De los 1000 modelos posibles se seleccionan los 10 mejores que tienen la RMSD menor. Para definir la RMSD, ClusPro2 selecciona los residuos de la interfaz del ligando y del receptor que tienen átomos dentro de los  $10 \text{ \AA}$ , luego se superpone en las dos estructuras y al final se calcula la RMSD de los carbonos alfa ( $C\alpha$ ) de los residuos de la interfaz de ambos (Kozakov et al. 2017).

En la figura 14, se muestra el modelo con el valor más elevado del acoplamiento molecular de ANREP-PerA y Aar-AggR. En el modelo de acoplamiento entre ANREP y PerA, algunos de los aminoácidos mejor acoplados son los que conforman a la tercera hélice  $\alpha$  de ANREP: Y-52, R-56 y F-59 que posiblemente se acoplen a la interfaz de algunos residuos de la parte final del N-terminal de PerA (M-117, Q-118, D-150, respectivamente). De manera importante, dos de los tres residuos acoplados de ANREP (Y-52 y R-56) pertenecen a la secuencia consenso de la familia ANR (Santiago et al. 2016). En el modelo de acoplamiento de Aar-AggR, los residuos correspondientes a Aar (K-19, W-45, N-48, F-52) posiblemente se acoplen a los residuos de la región media de AggR (A-87, D-136, Y-139, S-141) correspondiente a la parte media y final del N-terminal y la parte inicial del C-terminal. Interesantemente, tres de los cuatro residuos de Aar (K-19, W-45, F-52) son importantes en la función represora de Aar (Santiago et al. 2016). En AggR, algunos de los

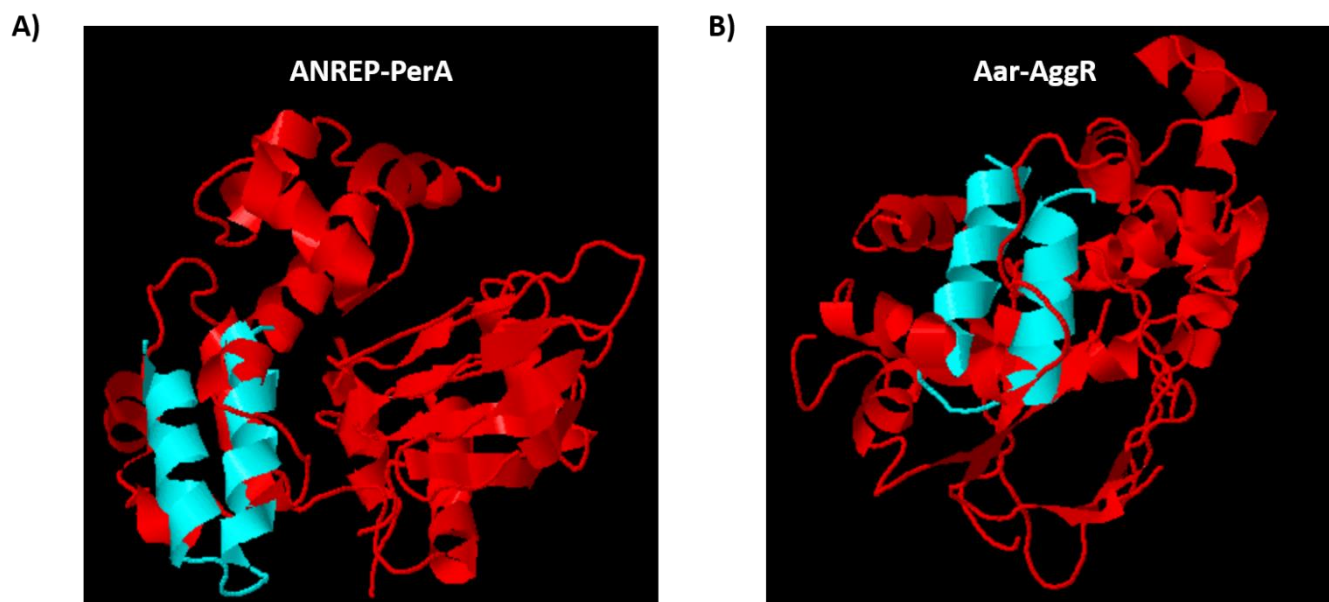
residuos mejor acoplados corresponden al segmento medio y final de su N-terminal, lo que corresponde con lo determinado por Santiago et al. (2016).



**Figura 14. Modelo de acoplamiento molecular de ANREP-PerA y Aar-AggR.** Se cargaron las estructuras terciarias de las proteínas obtenidas de “I-TASSER” al servidor “ClusPro2”. **A)** y **B)** Modelo de interacción de ANREP (azul)-PerA (verde). **C)** y **D)** Modelo de interacción de Aar (azul)-AggR (verde). De color naranja se muestran los residuos de la secuencia consenso entre ANREP y Aar, de amarillo los aminoácidos correspondientes a los posibles sitios de interacción en PerA y AggR, respectivamente. **B)** y **D)** es un acercamiento de los sitios de acoplamiento y los aminoácidos que posiblemente interactúen. Los números y las líneas punteadas en amarillo muestran la distancia en Angstroms entre estos aminoácidos. Imágenes generadas y modificadas en: “ClusPro2” (<https://cluspro.bu.edu/>) y “Pymol” (<https://pymol.org/2/>).

Adicionalmente, a través del programa “SPRING” del servidor de “I-TASSER”, se predijo la interacción proteína-proteína. La particularidad de este programa es la utilización de un modelo de enhebrado de proteínas, es decir, a través del alineamiento con proteínas que contengan estructuras similares, se selecciona la plantilla que mejor se ajuste a las secuencias a analizar, acomodando los aminoácidos de la secuencia según la plantilla. Esto genera una puntuación Z. La puntuación Z, es la diferencia entre las puntuaciones del alineamiento sin procesar y el promedio de las variaciones. Cuanto mayor es el valor de Z, la calidad del modelo de los alineamientos es mejor (Guerler et al. 2013).

Los modelos generados se muestran en la figura 15. El valor de Z-score para ANREP-PerA fue de 4.588 y para Aar-AggR de 4.647. Lo que indica modelos óptimos de predicción sencilla.



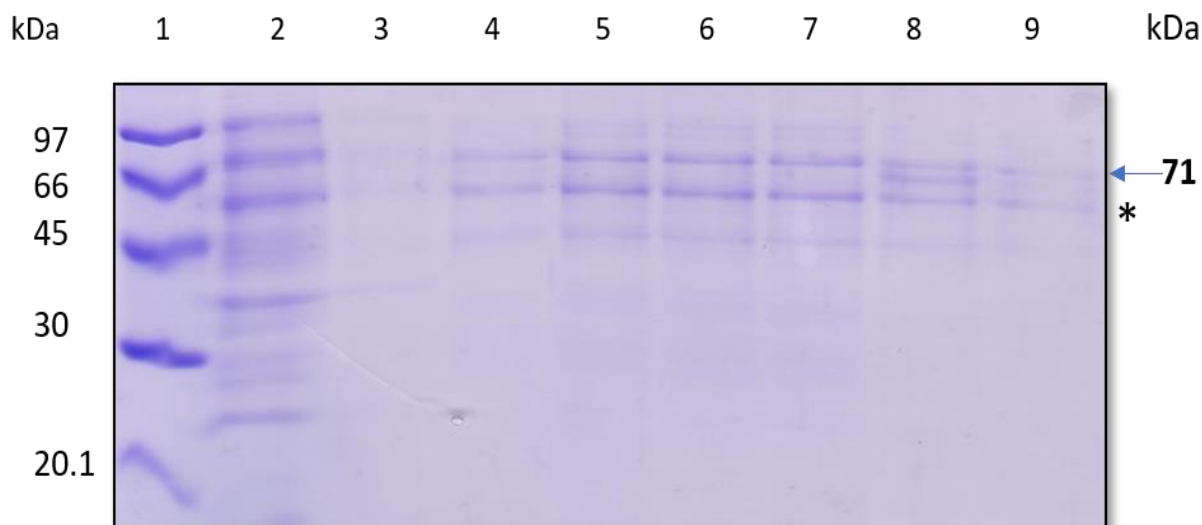
**Figura 15. Modelo de predicción de la interacción proteína-proteína de ANREP-PerA y Aar-AggR.** Se cargaron las secuencias primarias de las proteínas obtenidas del NCBI. Los modelos fueron generados en el programa “SPRING” de I-TASSER. **A)** Modelo de interacción de ANREP (azul)-PerA (rojo). **B)** Modelo de interacción de Aar (azul)-AggR (rojo). Los valores de Z-score fueron de 4.588 y 4.647, respectivamente. Imagen generada en: “SPRING” (<https://zhanggroup.org/spring/>).

## 7.2 Interacción entre ANREP y PerA por “Pull-down”

### 7.2.1 Purificación de la proteína MBP-PerA

Para realizar los ensayos tipo “pull-down” se realizó la purificación de la proteína recombinante MBP-PerA por cromatografía de afinidad. La construcción que expresa dicha proteína fue previamente generada por Ibarra et al. (2003), esta construcción (pMALT2) tiene clonado a *perA* en fase con la región que codifica para MBP. Dicha proteína recombinante es capaz de restaurar el fenotipo AL en una cepa mutante en *perA* (Ibarra et al. 2003). Adicionalmente, en otros estudios este método de purificación de proteínas fusionadas a MBP ha sido ampliamente utilizado para purificar otros miembros de la familia AraC/XylS como Rns, ToxT, entre otros (Gallegos et al. 1997; Schuhmacher & Klose, 1999).

La expresión de la proteína recombinante se realizó en la cepa BL21 (DE3) pLyS + pMALT2, para inducir la expresión de la proteína (MBP-PerA) se agregó 0.3 mM de IPTG.



**Figura 16. Purificación de la proteína MBP-PerA.** SDS-PAGE al 12% teñido con azul de coomassie de las fracciones obtenidas de la purificación de MBP-PerA por cromatografía de afinidad. Carriles: **1)** Marcador de peso molecular (MPM), **2)** Fracción soluble, **3)** Fracción no unida y **4) a 9)** eluciones 1, 2, 3, 4, 5 y 6, respectivamente, de MBP-PerA purificada. El asterisco señala el subproducto de la fusión de MBP-PerA obtenido, la flecha azul indica la fusión completa de MBP-PerA de 71 kDa.

Enseguida, las células fueron concentradas, sonicadas y el extracto proteico soluble fue obtenido por centrifugación. Posteriormente, la fracción soluble fue incubada por 2 horas con la resina de amilosa para después purificar a MBP-PerA por cromatografía de afinidad. Al correr las distintas fracciones recuperadas en un SDS-PAGE se obtuvieron dos bandas correspondientes a la purificación (Figura 16). La primera de ~71 kDa que corresponde a la fusión completa y una segunda banda de ~55 kDa que corresponde a un subproducto incompleto de la fusión MBP-PerA. Todo lo anterior fue previamente estudiado y reportado por Ibarra et al. (2003).

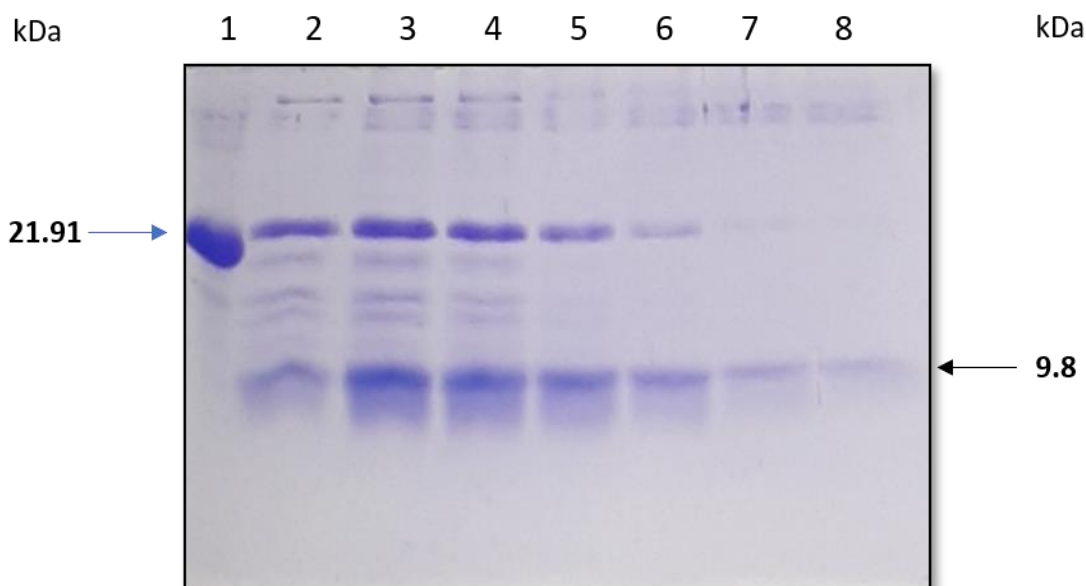
En la figura 16 de los carriles 4 al 7 se muestran las fracciones más limpias con la proteína MBP-PerA purificada y el doble bandeo característico.

Una vez obtenidas las fracciones purificadas de MBP-PerA se dializó, se concentró y se cuantificó por el método de Bradford empleando una curva estándar con BSA. La concentración de la proteína recombinante fue de 1.67  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  y las alícuotas se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **7.2.2 Purificación de la proteína ANREP-6XH**

Para realizar los ensayos tipo “pull-down”, se realizó una segunda purificación por cromatografía de afinidad, pero esta vez de la proteína ANREP-6XH. La construcción que expresa dicha proteína fue previamente generada por Jaramillo (2019). Esta construcción fue generada a partir del pBAD/myc-His A, y fue nombrada como pANREP. Se caracteriza porque tiene clonado el gen que codifica para ANREP más una secuencia que genera 6 histidinas introducidas en el extremo C-terminal de ANREP (ANREP-6XH). Cabe señalar, que el vector tiene por defecto el epítipo myc y una etiqueta de histidinas, pero el autor decidió no utilizarlas debido al tamaño minúsculo de ANREP (77 aminoácidos) y el posible defecto en plegamiento y función de la proteína (Jaramillo, 2019).

La expresión de la proteína recombinante se realizó en la cepa BL21 (DE3) pLyS + pANREP, la proteína ANREP-6XH fue inducida con 0.2% de arabinosa. Posteriormente, el cultivo fue concentrado, sonicado y centrifugado. El extracto soluble fue recuperado, y se dejó interactuando por 2 horas con la resina de níquel para después purificar a la proteína por cromatografía de afinidad. Las fracciones purificadas fueron analizadas por SDS-PAGE y se muestran en la figura 17.



**Figura 17. Purificación de la proteína ANREP-6XH.** SDS-PAGE al 15% teñido con azul de coomassie de las fracciones obtenidas de la purificación de ANREP-6XH por cromatografía de afinidad. Carriles: **1)** PapM de EAEC y **2) a 8)** eluciones 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 respectivamente, de ANREP purificada. En sustitución del marcador de peso molecular se usó la proteína purificada de PapM que tiene un peso de 21.91 kDa.

De los carriles 3 al 5 se observa una banda de bajo peso molecular que Jaramillo (2019) había previamente demostrado que correspondía a la proteína ANREP-6XH. Sin embargo, estas eluciones también arrastraron a otras proteínas en la purificación, específicamente una banda con un peso aproximado de 23 kDa. Es probable que tal proteína tiene afinidad por la resina de níquel o interactúa con ANREP-6XH a pesar de las condiciones desnaturizantes de la electroforesis.

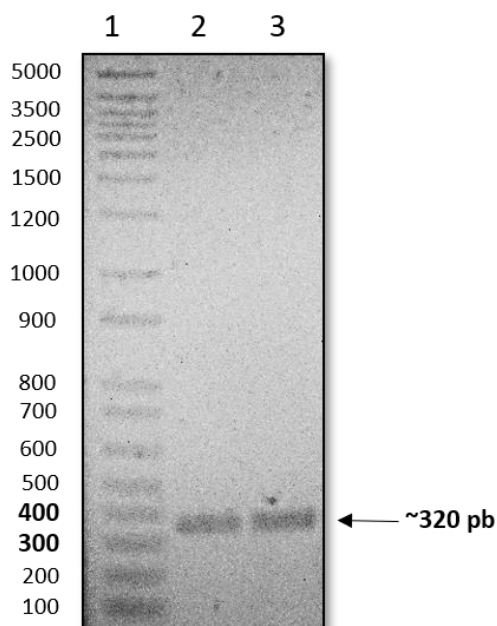
Después de obtener las distintas fracciones de ANREP-6XH se dializó, se concentró, se cuantificó por el método de Bradford empleando una curva estándar con BSA, y se obtuvo una concentración de 8.99  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . Se realizaron alícuotas y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **7.3 Evaluación de la funcionalidad de MBP-PerA**

#### **7.3.1 PCR de la región reguladora de *bfpA***

Para obtener la región reguladora de *bfpA* que se utilizó para los ensayos tipo “EMSA”, se procedió a realizar una PCR punto final. Los productos se obtuvieron utilizando como molde el plásmido pCAT201 empleado los oligonucleótidos pKK-8-H3R y pKK-8-BH1F. El producto de ADN obtenido es de aproximadamente 320 pb correspondiente a la región

reguladora en *bfpA* (-75 a -47 con respecto al sitio de inicio de la transcripción) (Figura 18). Previamente, Ibarra et al. (2003) determinaron esta región mínima de pegado de PerA en *bfpA* que contiene los sitios de unión a este activador transcripcional.



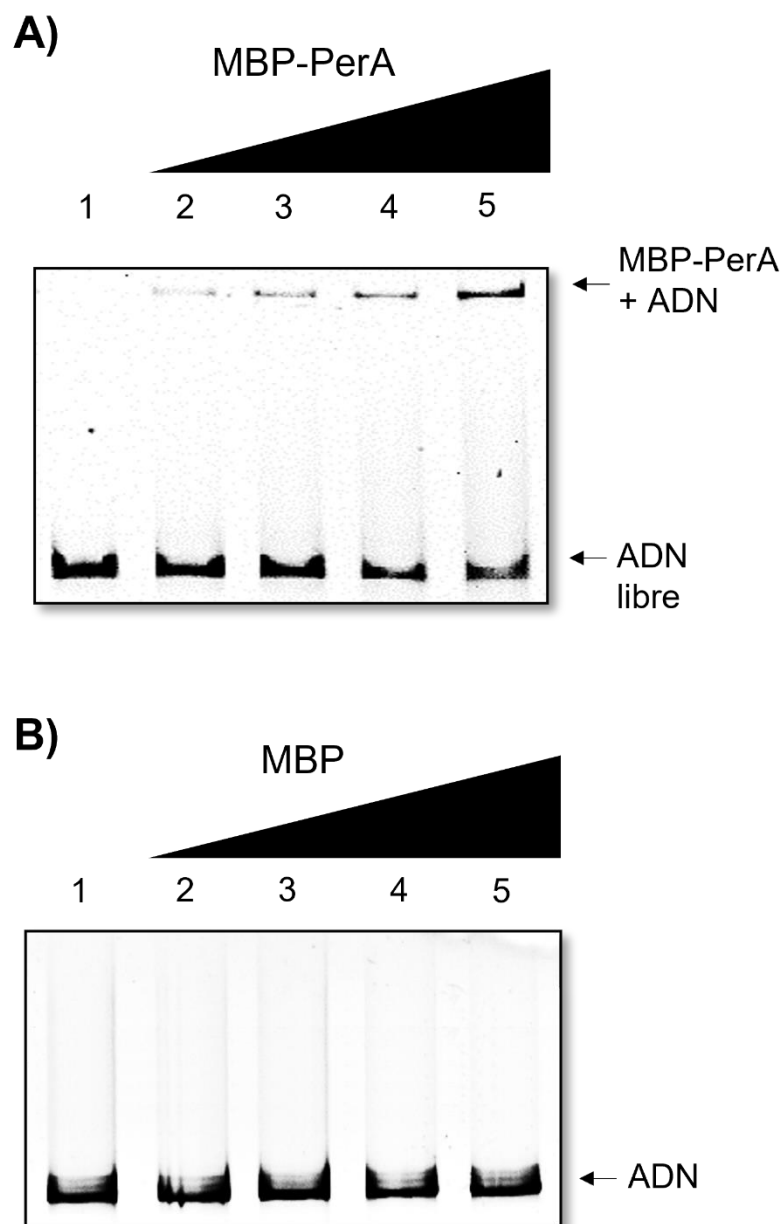
**Figura 18. PCR de la región reguladora de *bfpA*.** Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. **1)** MPM. **2)** Fragmentos obtenidos por PCR de las secuencias reguladoras de *bfpA* (carriles 1 y 2). En negritas se resalta las bandas del MPM de 400 y 300 pb. La flecha señala el fragmento correspondiente a la región reguladora en *bfpA* (320 pb).

### 7.3.2 Ensayo de movilidad electroforética (EMSA)

Para realizar los ensayos de interacción proteína-proteína, primero fue necesario comprobar la funcionalidad de MBP-PerA mediante ensayos de EMSA (electrophoretic mobility shift assay) para confirmar que la proteína purificada adquiere su conformación nativa y se une al ADN de los genes que regula.

Del fragmento de *bfpA* obtenido por PCR, se incubaron 250 ng con concentraciones crecientes de la proteína MBP-PerA o MBP (control), posteriormente las reacciones fueron analizadas mediante electroforesis nativa (Figura. 19). Se observa que MBP-PerA comienza a retardar el ADN desde concentraciones de 120 nM (Figura. 19A, carril 2) y continúa incrementándose el complejo ADN-proteína conforme se aumenta la concentración de MBP-PerA (Figura. 19A, carriles 3 a 5). Mientras que MBP no fue capaz de unirse al ADN incluso a la concentración más alta 637 nM (Figura. 19B, carril 5).

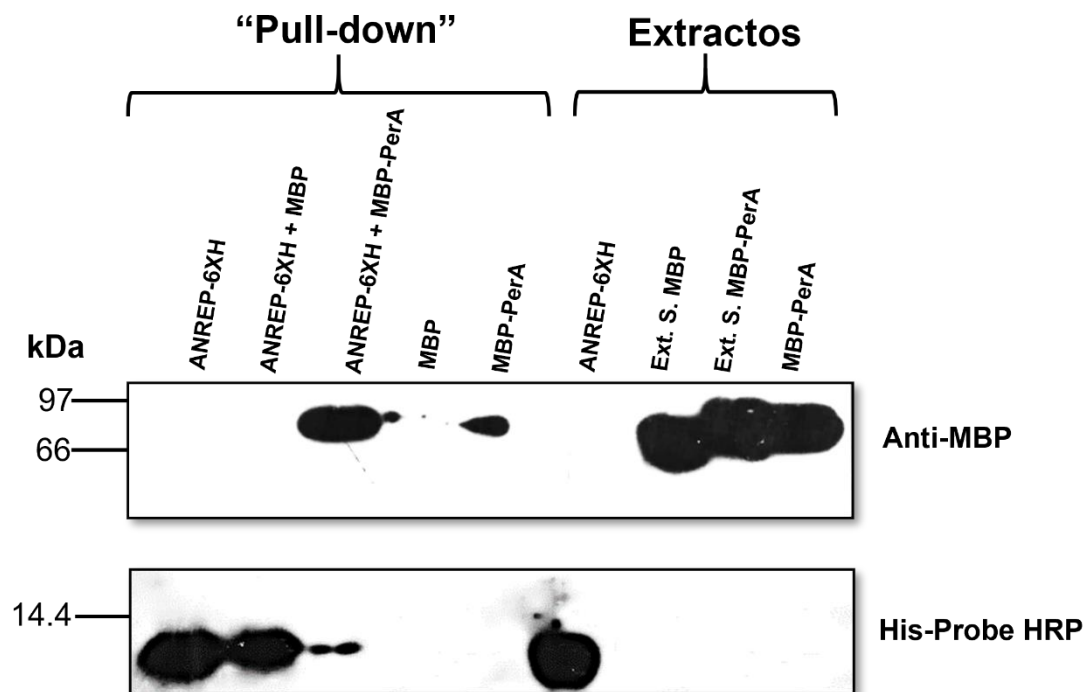
Por lo anterior, la proteína MBP-PerA purificada es una proteína funcional debido a que fue capaz de unirse a la región reguladora de *bfpA*.



**Figura 19. Ensayo de movilidad electroforética (EMSA) de la región reguladora de *bfpA* con MBP-PerA (A) y MBP (B).** Gels de acrilamida al 6% teñidos con bromuro de etidio. El fragmento de *bfpA* (250 ng) fue incubado con concentraciones crecientes de MBP-PerA: **1)** 0, **2)** 120 nM, **3)** 248 nM, **4)** 476 nM y **5)** 637 nM de las proteínas MBP-PerA y MBP, respectivamente. Las flechas señalan el ADN libre y el complejo de MBP-PerA + *bfpA*.

#### 7.4 Evaluación de la interacción proteína-proteína entre ANREP y PerA

De acuerdo con evidencia experimental de nuestro grupo de trabajo, Jaramillo (2019) propuso un modelo sobre el mecanismo de ANREP para modular la expresión de los genes de virulencia en EPEC, se sugiere que ANREP ejerce un efecto negativo sobre la virulencia de EPEC porque interactúa con PerA inactivando su función como activador transcripcional, de manera similar como sucede con Aar y AggR en EAEC (Santiago et al. 2014, 2016).



**Figura 20. Ensayo de “pull-down” entre ANREP-6XH y MBP-PerA.** “Western blot” de ANREP-6XH y MBP-PerA del ensayo de interacción proteína-proteína (“pull-down”). La proteína ANREP-6XH fue previamente incubada con la resina de níquel (Ni-NTA) y posteriormente se agregaron las proteínas MBP-PerA o MBP (control negativo). El ensayo se analizó por “western blot” empleando el anticuerpo anti-MBP o una sonda anti-His (His-probe HRP). Se indican las posiciones del marcador de peso molecular.

Además, los resultados de nuestros análisis bioinformáticos mostrados anteriormente también apoyan esta propuesta. Para tal fin, se realizó el ensayo de interacción proteína-proteína para demostrar experimentalmente la interacción entre ANREP y PerA por la técnica de “pull-down”. Para esto, la proteína ANREP-6XH fue incubada con la resina de níquel, posteriormente se adicionaron las proteínas MBP-PerA o MBP, se realizaron diferentes lavados para eliminar las interacciones inespecíficas y posteriormente las interacciones fueron analizadas por “western blot” con la sonda anti-histidinas y el anticuerpo anti-MBP.

Los resultados del “pull-down” sugieren que ANREP-6XH y MBP-PerA interactúan en las condiciones analizadas debido a que el anticuerpo anti-MBP detecta a MBP-PerA cuando ANREP-6XH (9.8 kDa) se encuentra unida a la resina (Figura 20, carril 3), mientras que MBP no fue detectado, lo que indica que no interactúa con ANREP-6XH (Figura 20, carril 2). Sin embargo, en los controles de los carriles 4 y 5 existe una detección mínima de MBP y MBP-PerA en ausencia de ANREP-6XH, lo que podría deberse a una posible falta de lavados durante el ensayo. Por lo anterior, se sugieren más repeticiones para verificar los resultados preliminares, aunque estos datos experimentales y los análisis bioinformáticos sugieren que ANREP y PerA interactúan.

### **7.5 Efecto de la interacción entre ANREP y PerA sobre la capacidad de esta última para unirse al ADN.**

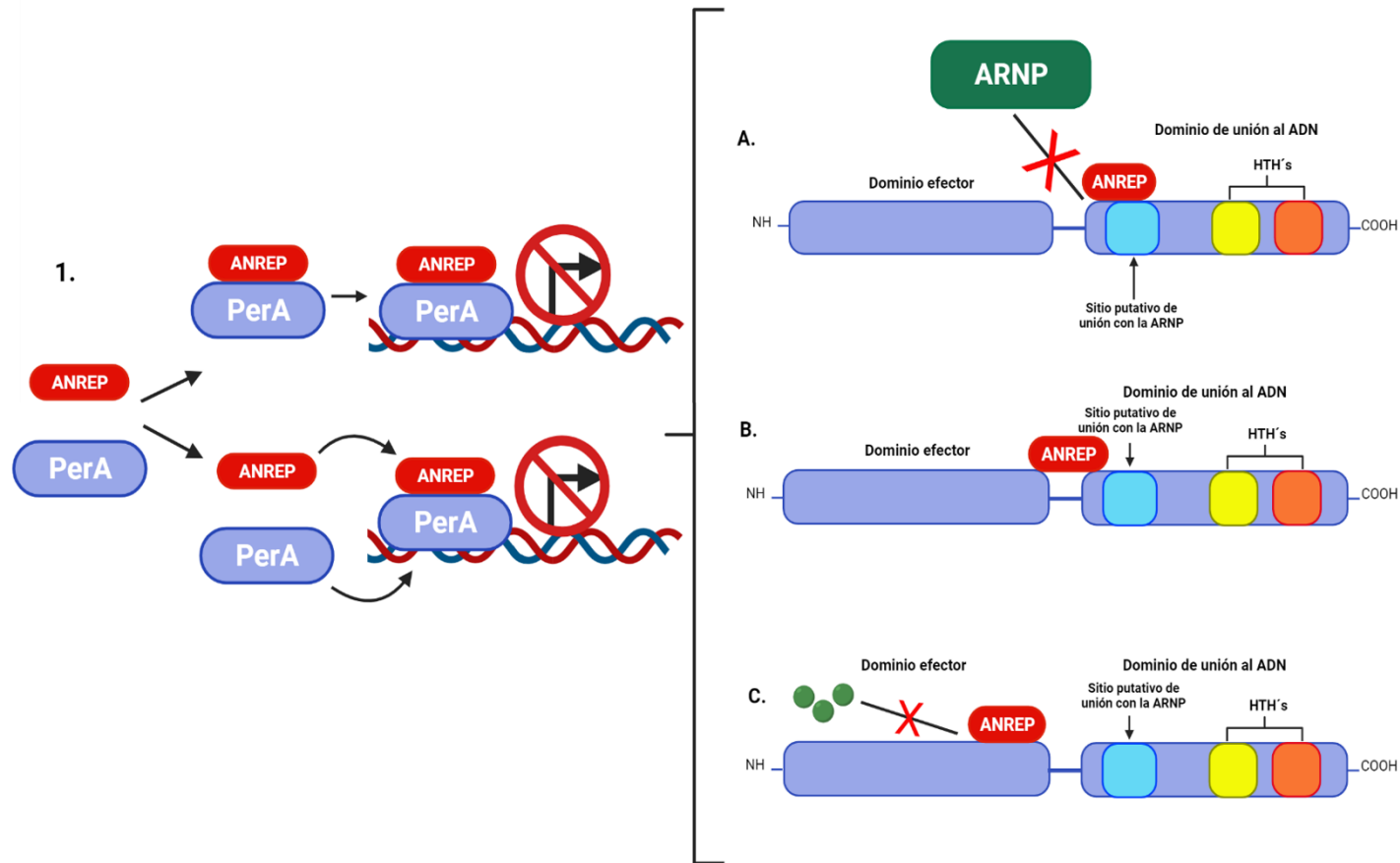
De acuerdo con la revisión bibliográfica, los estudios bioinformáticos y los resultados experimentales realizados para este trabajo, proponemos que ANREP y PerA interactúan. Sin embargo, no pudimos evaluar si dicha interacción afecta la capacidad de PerA para unirse al ADN de los genes que regula. Por esta razón, planteamos las siguientes hipótesis sobre el efecto que genera la interacción entre ANREP y PerA (Figura 21) en la regulación de los genes que son blancos de PerA.

La primera hipótesis establece que el complejo ANREP-PerA afectaría la función de PerA porque probablemente se bloquearía la región necesaria para la interacción con la subunidad  $\alpha$  de la ARNP que ya ha sido demostrada (Lara-Ochoa et al. 2021) y, de acuerdo al modelamiento propuesto en ese mismo trabajo, los residuos de aminoácidos de PerA involucrados en la interacción con  $\alpha$  comprenden las posiciones 169-227, que forman parte y están cercanos a la región putativa de PerA (116-172) que interactúa con ANREP y que identificamos en este trabajo (Figura 21.1A). Dicha interacción tendría como consecuencia evitar que PerA ancle la ARNP a los promotores de los genes que regula, provocando la represión de su propia expresión, así como la de BFP y de los genes de la isla LEE.

Otra propuesta es que el complejo ANREP-PerA genere un cambio conformacional en la estructura de PerA que provoque la incapacidad para unirse al ADN de los genes que regula, causando igualmente la represión de BFP y de los genes de la isla LEE (Figura 21.2A).

Finalmente, una posibilidad es que ANREP al unirse a PerA bloquee el dominio de reconocimiento a algún efector (aún desconocido para PerA), pero que ha sido demostrado en otros miembros de la familia AraC/XylS. Esto generaría que en ausencia del efector unido a PerA, ésta no cambiaría a una conformación activa que favorecería la unión al ADN causando también la represión de los genes que regula (Figura 21.2B).

Análisis experimentales permitirán confirmar tales propuestas y esclarecer el papel que tiene ANREP sobre la función de PerA y el efecto sobre la expresión de los genes de virulencia en EPEC.



**Figura 21. Modelo de la interacción entre ANREP y PerA sobre la capacidad de esta última para unirse al ADN blanco.** El modelo es con base a los resultados obtenidos en este trabajo y con la bibliografía consultada. **1.** ANREP ejerce un efecto negativo sobre la actividad de PerA porque se forma el complejo ANREP-PerA. Dicho complejo podría formarse antes o cuando PerA se una al ADN. Tal efecto tendría como consecuencia lo siguiente: **A.** ANREP podría unirse a PerA en el sitio con el que contacta con la ARNP, lo que evitaría la interacción con el complejo de la transcripción y provocaría la represión de los genes que regula. **B.** Otra opción es que ANREP se una a PerA (preferentemente en la parte final del N-terminal, en el conector y en la parte inicial del C-terminal) y de esta forma altera la conformación nativa de PerA que impediría su unión al ADN o la interacción con la ARNP, causando la represión de la transcripción de los genes blanco. **C.** La última probabilidad es que la interacción de ANREP con PerA podría bloquear la unión de una molécula efectora (aún desconocida) en el dominio efector de PerA, lo que generaría una conformación inactiva para su función ya sea su unión al ADN o la interacción con la ARNP; generando como consecuencia la represión del operón *bfp* y, de manera indirecta, de los genes de la isla LEE. Las esferas verdes indican las moléculas efectoras. Imagen creada en: Biorender.com

## **7.6 Generación de anticuerpos policlonales para detectar a ANREP**

Con la finalidad de caracterizar el papel de ANREP en la regulación de la virulencia de EPEC, se realizó la generación de los anticuerpos policlonales (anti-ANREP). Para esto, se llevó a cabo un esquema de inmunización de la proteína purificada ANREP-6XH en una coneja Nueva Zelanda, dicho esquema tuvo una duración de 50 días. Previo al esquema se monitoreo el estado de la coneja (peso, talla, temperatura), el cual fue óptimo. Al finalizar el esquema de inmunización, se extrajo la sangre total de la coneja, se centrifugó, se recuperó el suero con los anticuerpos y se almacenó en ultracongelación.

La inyección, el monitoreo y la extracción de la sangre total fue realizada con la asistencia de los veterinarios del bioterio “Claude Bernard” de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP). Sin embargo, por los inconvenientes de la pandemia de COVID-19 no se probó la funcionalidad de los anticuerpos.

## 8. DISCUSIÓN

Fascinantemente, el campo de la regulación en bacterias patógenas se ha convertido en uno de los principales intereses en el campo científico. Sin embargo, existen muchos mecanismos desconocidos y bastante complejos aun por dilucidar. Entre los principales mecanismos de regulación, se encuentra la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS, los cuáles son participes en diversas respuestas ambientales, cambios en el metabolismo y en la virulencia. La expresión de tales miembros es tan controlada que solo se expresan en ciertas condiciones y en concentraciones específicas. Como sucede con AggR, CfaD, MarA, ToxT y PerA (Martinez-Laguna et al. 1999; Morin et al. 2010; Prajapat et al. 2015; Schuhmacher & Klose, 1999).

Específicamente PerA, es el objeto de estudio de nuestro grupo de trabajo y se sabe que su activación ocurre a 37 °C y se reprime a temperaturas menores o mayores. Adicionalmente PerA se reprime a concentraciones  $\geq 20$  mM de sales de amonio lo cual se relaciona con el nicho de colonización de EPEC (intestino delgado) (Martinez-Laguna et al. 1999). Otra característica importante de estos miembros es su autoactivación. En PerA, ocurre tal fenómeno, permitiendo un control más estricto, regulado y rápido para su activación sólo en su presencia y en las condiciones adecuadas (Martinez-Laguna et al. 1999). Por lo tanto, PerA juega un papel crítico para la activación de los genes que regula. Entre estos, se encuentran los relacionados a los principales factores de virulencia de EPEC como el SST3 y la fimbria BFP.

La complejidad de la red de regulación en EPEC, no solo se remite a esta familia, existen más reguladores implicados en el éxito de la bacteria para establecerse en el hospedero. Uno de los recientes descubrimientos en nuestro grupo de trabajo fue la identificación de un miembro (ANREP) de la nueva familia de anti-activadores AraC/XylS (ANR), el cuál fue nombrado como ANREP. Este miembro cumple con la función de modular la activación de los genes que regula PerA (*bfpA*, *espA* y el mismo *perA*). Además, la actividad represora de ANREP sobre PerA predomina en condiciones de represión (más amonio). Este efecto causa una menor expresión de las proteínas que conforman al SST3 y la fimbria BFP (Jaramillo, 2019).

Con los antecedentes descritos en nuestro grupo de trabajo, se procedió a realizar los estudios correspondientes para saber si ANREP puede interactuar de forma similar al

miembro más estudiado de la familia ANR (Aar de EAEC) es decir, a través de su interacción directa con un miembro AraC/XylS (PerA de EPEC) contrarrestando su función (Jaramillo, 2019).

Comparativamente, a nivel estructural según lo reportado por Jaramillo (2019) ANREP y Aar, comparten un 26.8% de identidad y 37.8% de similitud entre sus secuencias proteicas, además de que ambas están formadas por hélices  $\alpha$  y tienen pesos moleculares  $\leq 10$  kDa. Asimismo, Santiago et al. (2016) determinó una secuencia consenso presente en los miembros de la familia ANR, que podría ser importante en su estructura y función en común.

De acuerdo con las características anteriores, se procedió a la búsqueda *in silico* de la interacción proteína-proteína entre ANREP y PerA. Conforme, a los resultados de la figura 11, al parecer hay una posible interacción entre ANREP y PerA, debido a que los valores son similares a los de la interacción de Aar y AggR (Santiago et al. 2016). Además, de acuerdo con los valores predichos por el servidor “PSOPIA” en ANREP, puede existir interacciones con otros reguladores implicados en la regulación de LEE como GrlA y Ler. Lo cual, concuerda con lo propuesto por Jaramillo (2019) y su posible interacción. Específicamente en Ler, es más probable esta interacción debido a que pertenece a la familia H-NS, los cuales se saben que interactúan con los miembros ANR (Santiago et al. 2017). Esto supone, una mayor complejidad en la regulación de la virulencia de EPEC y podría ser un nuevo objeto de estudio en nuestro grupo de trabajo.

Ahora bien, para determinar los posibles sitios de interacción entre ANREP y PerA se realizó la búsqueda empleando el servidor “iFrag”. Los resultados de la figura 12, muestran de color rojo los sitios con la mayor probabilidad de interacción, y los de color azul los que tienen una probabilidad más baja. Al parecer ANREP puede interactuar con PerA a través de los algunos residuos que abarcan la segunda y la tercera  $\alpha$  de su estructura secundaria (A22, W26, A29, W43 y R47), los cuales curiosamente están conservados en la familia ANR (Santiago et al. 2016). En PerA, ANREP al parecer se une a la región que flaquea a la parte final del N-terminal y la inicial del C-terminal, pasando por el conector, lo que concuerda con lo observado en otros miembros AraC/XylS (Santiago et al. 2016). En cuanto a la interacción de Aar y AggR, Los resultados coinciden de manera parcial con lo determinado experimentalmente por Santiago et al. (2016) por ensayos doble híbrido y “western blot”.

Adicionalmente se procedió a realizar una estimación de la posible afinidad entre el complejo formado por ANREP y PerA, para ello se empleó el servidor web “PPA-Pred2”. Los resultados obtenidos reflejaron complejos proteicos estables (kD) y energéticamente favorables ( $\Delta G$ ) tanto para el control positivo (subunidades de la ARN polimerasa), así como para las interacciones de ANREP y PerA, Aar y AggR, entre otras, y no así con el control negativo (Enol y OmpF). Interesantemente, los valores de la afinidad entre Aar y AggR fueron cercanos a lo determinado por resonancia de plasmón superficial, con afinidad en las concentraciones en el orden de nanomolar (Santiago et al. 2016).

Posteriormente, se quería descifrar cuál era la manera en la que probablemente ambas proteínas se podrían acoplar con valores cercanos a la conformación nativa del complejo, comparando con los resultados de Aar y AggR. Para ello, primero se procedió a realizar la predicción de sus estructuras terciarias, se escogieron los modelos que se muestran en la figura 13 generados por el servidor “I-TASSER”, según sus valores de C-score, TM-score y RMSD. Posteriormente, se introdujeron al servidor “ClusPro2”, el cual se basa en el acoplamiento rígido del ligando y el receptor colocando a este último en un sistema de coordenadas inmóvil para que el ligando se acople en un sistema de coordenadas móviles. La estrategia para el acoplamiento molecular por el método de los cuerpos rígidos se eligió por su rapidez, simplicidad, accesibilidad, por los posibles errores que se arrastraron en la predicción de la estructura de las proteínas y por la escasa información en la literatura sobre la estructura a nivel atómico de los miembros ANR, ya que actualmente ninguno se encuentra cristalizado (Kozakov et al. 2017). Lo anterior, podría suponer otro objeto de estudio en el grupo de trabajo, al tener la capacidad de caracterizar la estructura terciaria de ANREP, debido a su alta solubilidad al ser recuperable en el extracto soluble, en contraste con lo que sucede con Aar (Santiago et al. 2016).

Asimismo, el programa genera los mejores 10 modelos los cuales son cercanos al nativo. Sin embargo, en el proceso se generan más de 1000 acoplamientos (Kozakov et al. 2017). De estos se escogió el que obtuvo las mejores puntuaciones del acoplamiento y se muestra en la figura 14 tanto del acoplamiento de ANREP-PerA como el de Aar-AggR. De acuerdo con el acoplamiento, entre ANREP y PerA, los residuos de la interfaz mejor acoplados son los correspondientes a la tercera hélice  $\alpha$  (Y-52, R-56 y F-59) con los residuos de la interfaz del N-terminal (M-117, Q-118, D-150) de PerA. De manera similar Aar, se

acopla mejor a la región media de AggR (A-87, D-136, Y-139, S-141) a través de algunos residuos de su segunda y tercera hélice  $\alpha$  (K-19, W-45, N-48, F-52). De las proteínas ANREP y Aar, curiosamente algunos de los residuos acoplados pertenecen a la secuencia consenso de la familia (Santiago et al. 2016). Lo que indica que estos residuos se conservan, por su importancia al momento de interactuar con los reguladores AraC/XylS. Sin embargo, en ANREP faltarían estudios experimentales para confirmar si estos aminoácidos son importantes al momento de interactuar con PerA.

Con base en los análisis bioinformáticos, se realizaron los experimentales. Primero se sobreexpresó, purificó y cuantificó a las proteínas ANREP-6XH y MBP-PerA (Figuras 16 y 17). Las dos primeras proteínas recombinantes se generaron en construcciones elaboradas en trabajos previos de Jaramillo (2019) e Ibarra et al. (2003), respectivamente. Cabe señalar, que la concentración obtenida de MBP-PerA fue baja debido a un defecto en la resina de amilosa, lo cual ocasionó que se recuperara mucho menos proteína purificada. Sin embargo, a pesar de los inconvenientes se realizó el ensayo tipo "EMSA" para comprobar la funcionalidad de la proteína MBP-PerA utilizando solo la región reguladora de *bfpA*. En la figura 19 se muestran los ensayos tipo EMSA, se comienza a observar un retraso electroforético (formación del complejo proteína-ADN) a una concentración de 248 nM de MBP-PerA, y va aumentando conforme se aumentaron las concentraciones de esta proteína y no así para MBP. Lo anterior indica que MBP-PerA es funcional, conserva su estructura nativa y es útil para el siguiente paso experimental.

En la figura 20 se muestra el ensayo de interacción tipo "pull-down" entre ANREP y PerA. De acuerdo con la figura, al parecer si existe una interacción entre ANREP-6XH y MBP-PerA. Sin embargo, en el carril 3 (de izquierda a derecha), hay una disminución de la cantidad de ANREP-6XH detectada por la sonda, lo que al parecer indica una pérdida durante el proceso experimental. Además, de que existen señales en los controles negativos (MBP y MBP-PerA con la resina de níquel), probablemente por la deficiencia de un mayor número de lavados para eliminar a estas proteínas.

Por lo tanto, la evidencia aportada hasta el momento señala la interacción y acoplamiento a nivel *in silico* entre ANREP y PerA. Lo que supone un efecto importante en la regulación de la virulencia de EPEC, según lo mostrado en el modelo de la figura 22. Sin

embargo, a nivel experimental, faltarían repetir los ensayos realizados en este trabajo para poder concluir con certeza que verdaderamente están interactuando estas dos proteínas.

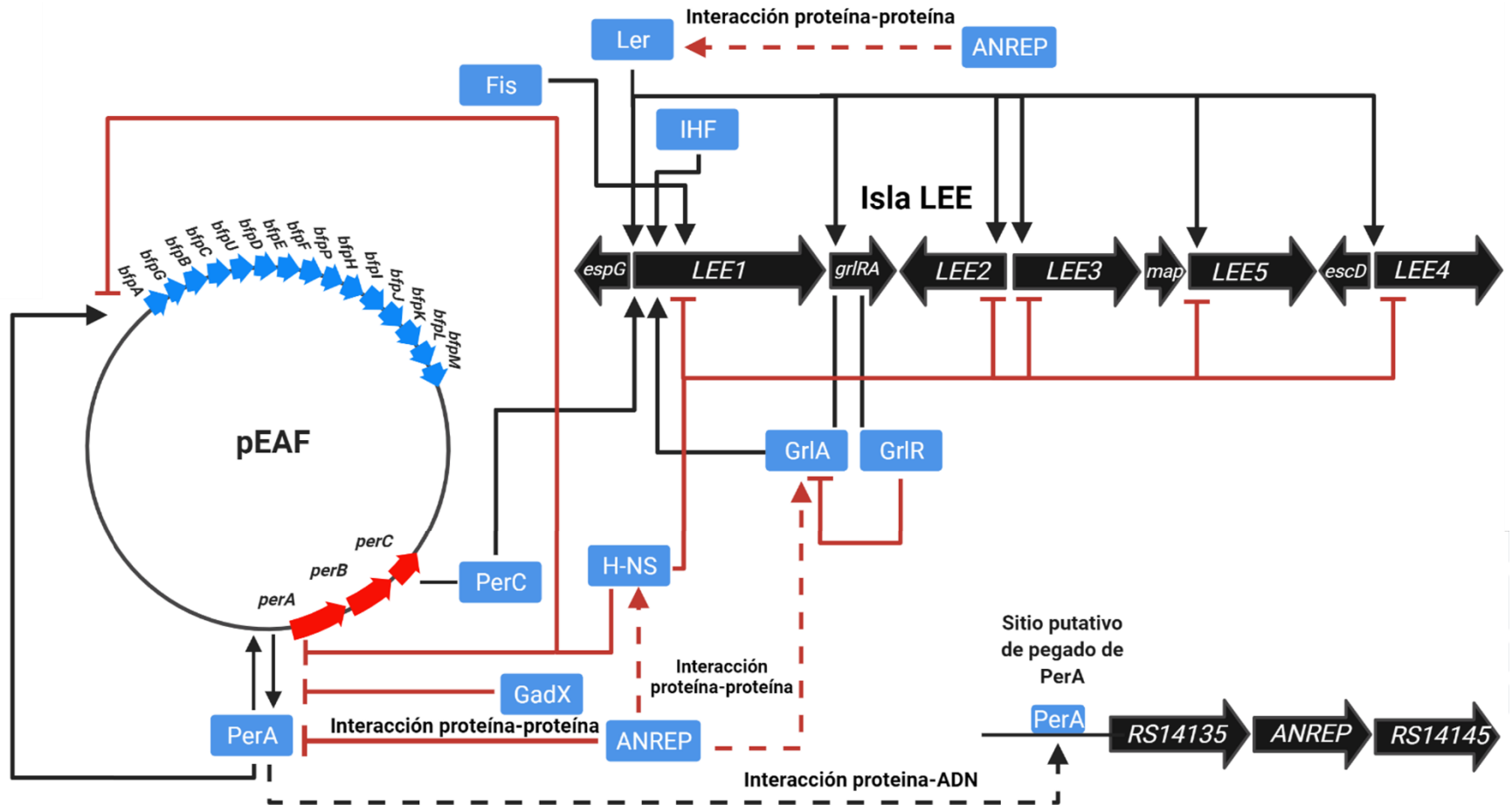
Con base a los resultados en este trabajo, presentamos un modelo de la interacción de ANREP con PerA, al atrapar a este último, antes o después de que se una al ADN y así evitar su función de activador de los genes de virulencia bajo su control. Nuestra hipótesis indica varias posibilidades de dicho mecanismo (Figura 21). La primera posibilidad es que, ANREP forme el complejo ANREP-PerA, lo que evitaría que PerA interactúe con la ARNP para activar la transcripción de los genes blanco. Otra posibilidad es que ANREP, se una a PerA (preferentemente en la parte final del N-terminal, en la parte inicial del C-terminal, pasando por el conector) y de esta forma impediría su unión al ADN de los genes que regula, al causar la pérdida de la conformación nativa de PerA. La posibilidad final sería que la interacción de ANREP con PerA bloquearía la unión de una molécula efectora (aún desconocida) en el dominio efector de PerA, lo que generaría una conformación inactiva para su función y evitaría su unión al ADN blanco; en cualquiera de los casos la formación del complejo ANREP-PerA tendría como consecuencia la represión del operón *bfp* y, de manera indirecta, de los genes de la isla LEE. Sin embargo, el modelo anterior es necesario someterlo a análisis experimentales para comprobar dichas hipótesis. Por lo tanto, en estudios futuros en nuestro laboratorio se propone realizar un ensayo tipo “EMSA” y un ensayo tipo “footprinting” con las proteínas ANREP-6XH y MBP-PerA más la región de pegado de esta última (*bfpA* o *perA*) y verificar tal hipótesis. Además de realizar mutantes puntuales en los dominios (C-terminal, en el conector y N-terminal) de PerA y en las hélices  $\alpha$  de ANREP para saber las regiones importantes en la interacción entre ambas. Asimismo, evaluar el efecto de la interacción entre ANREP y PerA, en los genes bajo el control de este último, al realizar ensayos de complementación en cepas mutantes ANR y PerA con los genes que codifican para estas proteínas y medir los niveles transcripcionales de los genes bajo el control de PerA.

De los anticuerpos policlonales generados a partir de la proteína purificada ANREP-6XH, lamentablemente no se probaron debido a la falta de tiempo y por la pandemia de COVID-19. Sin embargo, servirán para la detección de la expresión de la proteína nativa en EPEC silvestre y para otros futuros estudios experimentales.

Uno de los puntos más sorprendentes de la familia ANR es su promiscuidad de unión a parálogos de la familia AraC/XylS que se encuentran dentro de la misma bacteria (GadX)

(Santiago et al. 2016). Y no solo eso, sino que interesantemente también tiene la capacidad de unirse a ortólogos dentro de muchas otras bacterias Gram negativas. Entre estos se encuentran: CfaD, Rns, RegA, ToxT, etcétera. Los que pertenecen a ETEC (los dos primeros), *Citrobacter rodentium* y *Vibrio cholerae*, respectivamente (Santiago et al. 2016, 2017), tal y como sucede con Aar (Santiago et al. 2016). Lo que subraya la importancia de los residuos conservados en la estructura y función de los miembros de la familia ANR. De esta forma, en la figura A2 (anexos), se plantea la posibilidad de que ANREP tiene la capacidad de interactuar con otros miembros AraC/XylS, debido a su similitud estructural con Aar. Probablemente, este tipo de interacciones pueda ocurrir con otros miembros implicados en procesos metabólicos y de supervivencia dentro de la misma bacteria (Santiago et al. 2016).

Como se mencionó con anterioridad, los miembros de la familia AraC/XylS se autorregulan. Una vía alternativa es por la activación de la expresión de los miembros ANR. Como sucede con AggR y Aar de EAEC y con CfaD y Rnr-1 y Rnr-2 de ETEC, respectivamente (Hodson et al. 2017; Santiago et al. 2014). Particularmente en ETEC, CfaD se une a la región reguladora de *rnr-1*. El sitio de unión de CfaD a la región reguladora de *rnr-1* es una secuencia que se ubica dentro de la caja -35 (ATTATTTTATCT) (Hodson et al. 2017), la cual es rica en AT. Específicamente, en ANREP no se ha demostrado tal fenómeno. Una de las causas es porque actualmente no se conoce si forma parte de un operón policistrónico o si es una unidad transcripcional independiente (Jaramillo, 2019). Sin embargo, por estudios bioinformáticos (no mostrados), se detectó un posible sitio de pegado de PerA en la región reguladora del operón putativo de ANREP. Esto podría suponer una vía de autorregulación de PerA a través de ANREP (Figura 22), al favorecer su transcripción. Se realizó la búsqueda a lo largo de la secuencia del ADN de los tres genes que conforman el operón putativo de ANREP (*RS14135*, *ANREP*, *RS14145*), pero sólo se encontró una región de pegado río arriba de *RS14135*. Esto sin duda, apoya la hipótesis de que ANREP forman un operón con estos dos genes. Sin embargo, faltarían análisis experimentales al respecto, para saber si los tres genes están en operón, que funciones tienen y si se transcriben y traducen *RS14135* y *RS14145* en las mismas condiciones que ANREP.



**Figura 22. Modelo de la actividad de ANREP en el mecanismo de regulación de los genes de virulencia de EPEC.** Este modelo representa el efecto regulador de ANREP sobre PerA además de su posible interacción con otros reguladores de virulencia. Lo anterior es con base a los resultados obtenidos en este trabajo, a lo propuesto por Jaramillo (2019) y con la bibliografía consultada. Las flechas de color negro indican regulación positiva, las líneas rojas indican regulación negativa, las flechas rojas y discontinuas indican regulación negativa hipotética y la flecha negra y discontinua indica regulación positiva hipotética. Imagen creada en: Biorender.com

## 9. CONCLUSIONES

- Los resultados de análisis *in silico* sugieren que ANREP y PerA interactúan, los sitios probables de dicha interacción comprenden del aminoácido 21 a 67 en ANREP, en donde se encuentran residuos que muestran un alto grado de conservación entre los miembros de la familia ANR. Respecto de PerA, se propone que la región que incluye de los aminoácidos 116 a 172 podrían estar involucrados en la interacción con ANREP, dicha región comprende el sitio conector, así como la parte final del extremo amino y la parte inicial del carboxilo terminal de PerA.
- Los resultados del ensayo de interacción proteína-proteína por “Pull-down” confirmaron que ANREP interactúa con PerA, el complejo ANREP-PerA es posiblemente responsable de la vía que utiliza ANREP para actuar como represor de los genes regulados por PerA.
- De manera adicional, los análisis bioinformáticos sugieren que ANREP podría interactuar con otros reguladores de virulencia de EPEC, como: H-NS, GrIA y Ler. Para H-NS coincide con lo previamente reportado en EAEC, en donde se demostró que Aar (Familia ANR) interactúa con H-NS para controlar la expresión de diversos genes. Esto valida los resultados obtenidos con los programas bioinformáticos que se utilizaron en este trabajo.
- En conclusión, los datos obtenidos por análisis bioinformáticos y experimentales en este trabajo, sugieren que ANREP ejerce un efecto negativo sobre la expresión de los genes de virulencia de EPEC porque atrapa a PerA, dicho mecanismo generaría como consecuencia tres posibilidades: 1) evitar que PerA interactúe con la ARNP (ARN Polimerasa) para activar la transcripción, 2) pérdida de la conformación nativa de PerA evitando que se una al ADN de los genes que regula, o 3) evitar que una molécula efectora se una al amino terminal de PerA lo que generaría una conformación inactiva para su función; en cualquiera de los casos la formación del complejo ANREP-PerA tendría como consecuencia la represión de los genes *bfp* y, de manera indirecta, de los genes *LEE*.

## **10. PERSPECTIVAS**

- Repetir los ensayos de interacción proteína-proteína entre ANREP y PerA.
- Evaluar si ANREP afecta la capacidad de PerA para unirse al ADN de los genes que regula o si bloquea la interacción con la subunidad  $\alpha$  de la ARNP.
- Realizar mutaciones de los aminoácidos involucrados en la interacción entre ANREP y PerA.
- Evaluar las condiciones ambientales que determinan la formación del complejo entre ANREP y PerA.
- Analizar si ANREP interactúa con H-NS, Ler y GrlA.
- Probar la funcionalidad de los anticuerpos policlonales para detectar a la proteína nativa.
- Evaluar si PerA regula la expresión del gen que codifica para ANREP.
- Realizar estudios estructurales del complejo ANREP-PerA.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- Abe, H., A. Miyahara, T. Oshima, K. Tashiro, Y. Ogura, S. Kuhara, N. Ogasawara, T. Hayashi, and T. Tobe. 2008. "Global Regulation by Horizontally Transferred Regulators Establishes the Pathogenicity of Escherichia Coli." *DNA Research* 15(1):25–38.
- Alto, Neal M., Andrew W. Weflen, Matthew J. Rardin, Defne Yarar, Cheri S. Lazar, Raffi Tonikian, Antonius Koller, Susan S. Taylor, Charles Boone, Sachdev S. Sidhu, Sandra L. Schmid, Gail A. Hecht, and Jack E. Dixon. 2007. "The Type III Effector EspF Coordinates Membrane Trafficking by the Spatiotemporal Activation of Two Eukaryotic Signaling Pathways." *Journal of Cell Biology* 178(7):1265–78.
- Arbeloa, Ana, Miguel Blanco, Fabiana C. Moreira, Richard Bulgin, Cecilia López, Ghizlane Dahbi, Jesús E. Blanco, Azucena Mora, María Pilar Alonso, Rosalia Ceferina Mamani, Tânia A. T. Gomes, Jorge Blanco, and Gad Frankel. 2009. "Distribution of EspM and EspT among Enteropathogenic and Enterohaemorrhagic Escherichia Coli." *Journal of Medical Microbiology* 58(8):988–95.
- Baldi, Deborah L., Ellen E. Higginson, Dianna M. Hocking, Judyta Praszki, Rosalia Cavaliere, Catherine E. James, Vicki Bennett-Wood, Kristy I. Azzopardi, Lynne Turnbull, Trevor Lithgow, Roy M. Robins-Browne, Cynthia B. Whitchurch, and Marija Tauschek. 2012. "The Type II Secretion System and Its Ubiquitous Lipoprotein Substrate, SslE, Are Required for Biofilm Formation and Virulence of Enteropathogenic Escherichia Coli" edited by A. Camilli. *Infection and Immunity* 80(6):2042–52.
- Baruch, Kobi, Lihi Gur-Arie, Chen Nadler, Simi Koby, Gal Yerushalmi, Yinon Ben-Neriah, Orli Yogev, Eitan Shaulian, Chen Guttman, Raz Zarivach, and Ilan Rosenshine. 2011. "Metalloprotease Type III Effectors That Specifically Cleave JNK and NF-KB." *The EMBO Journal* 30(1):221–31.
- Berger, Cedric N., Valerie F. Crepin, Kobi Baruch, Aurelie Mousnier, Ilan Rosenshine, and Gad Frankel. 2012. "EspZ of Enteropathogenic and Enterohemorrhagic Escherichia Coli Regulates Type III Secretion System Protein Translocation" edited by P. J. Sansonetti. *MBio* 3(5).
- Bingle, Lewis E. H., Chrystala Constantinidou, Robert K. Shaw, Md. Shahidul Islam, Mala Patel, Lori A. S. Snyder, David J. Lee, Charles W. Penn, Stephen J. W. Busby, and Mark J. Pallen. 2014. "Microarray Analysis of the Ler Regulon in Enteropathogenic and Enterohaemorrhagic Escherichia Coli Strains" edited by D. A. Rasko. *PLoS ONE* 9(1):e80160.
- Bustamante, Victor H., Francisco J. Santana, Edmundo Calva, and Jose Luis Puente. 2001. "Transcriptional Regulation of Type III Secretion Genes in Enteropathogenic Escherichia Coli: Ler Antagonizes H-NS-Dependent Repression." *Molecular Microbiology* 39(3):664–78.
- Bustamante, Víctor H., Miryam I. Villalba, Víctor A. García-Angulo, Alejandra Vázquez, Luary C. Martínez, Rafael Jiménez, and José L. Puente. 2011. "PerC and GrlA Independently Regulate Ler Expression in Enteropathogenic Escherichia Coli." *Molecular Microbiology* 82(2):398–415.
- Campellone, Kenneth G. 2010. "Phosphoinositides Influence Pathogen Surfing: EPEC Rights the SHIP." *Cell Host & Microbe* 7(1):1–2.
- Canizalez-Roman, Adrian, Héctor M. Flores-Villaseñor, Edgar Gonzalez-Nuñez, Jorge Velazquez-Roman, Jorge E. Vidal, Secundino Muro-Amador, Gerardo Alapizco-Castro, J. Alberto Díaz-Quiñonez, and Nidia León-Sicairos. 2016. "Surveillance of Diarrheagenic Escherichia Coli Strains Isolated from Diarrhea Cases from Children, Adults and Elderly at Northwest of Mexico." *Frontiers in Microbiology* 7.
- Canizalez-Roman, Adrian, Edgar Gonzalez-Nuñez, Jorge E. Vidal, Héctor Flores-Villaseñor, and Nidia León-Sicairos. 2013. "Prevalence and Antibiotic Resistance Profiles of Diarrheagenic Escherichia Coli Strains Isolated from Food Items in Northwestern Mexico." *International Journal of Food Microbiology* 164(1):36–45.
- Chang, D. E., D. J. Smalley, D. L. Tucker, M. P. Leatham, W. E. Norris, S. J. Stevenson, A. B. Anderson, J. E. Grissom, D. C. Laux, P. S. Cohen, and T. Conway. 2004. "Carbon Nutrition of Escherichia Coli in the Mouse Intestine." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(19):7427–32.
- Cleary, J. 2004. "Enteropathogenic Escherichia Coli (EPEC) Adhesion to Intestinal Epithelial Cells: Role of Bundle-Forming Pili (BFP), EspA Filaments and Intimin." *Microbiology* 150(3):527–38.

- Croxen, M. A., R. J. Law, R. Scholz, K. M. Keeney, M. Wlodarska, and B. B. Finlay. 2013. "Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia Coli." *Clinical Microbiology Reviews* 26(4):822–80.
- Croxen, Matthew A., and B. Brett Finlay. 2010. "Molecular Mechanisms of Escherichia Coli Pathogenicity." *Nature Reviews Microbiology* 8(1):26–38.
- Deng, W., J. L. Puente, S. Gruenheid, Y. Li, B. A. Vallance, A. Vazquez, J. Barba, J. A. Ibarra, P. O'Donnell, P. Metalnikov, K. Ashman, S. Lee, D. Goode, T. Pawson, and B. B. Finlay. 2004. "Dissecting Virulence: Systematic and Functional Analyses of a Pathogenicity Island." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(10):3597–3602.
- Donnenberg, Michael S., and B. Brett Finlay. 2013. "Combating Enteropathogenic Escherichia Coli (EPEC) Infections: The Way Forward." *Trends in Microbiology* 21(7):317–19.
- Elliott, Simon J., Leslie A. Wainwright, Timothy K. McDaniel, Karen G. Jarvis, YingKang Deng, Li-Ching Lai, Barry P. McNamara, Michael S. Donnenberg, and James B. Kaper. 2002. "The Complete Sequence of the Locus of Enterocyte Effacement (LEE) from Enteropathogenic Escherichia Coli E2348/69." *Molecular Microbiology* 28(1):1–4.
- Franzin, Fernanda M., and Marcelo 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 Research International* 2015:1–10.
- Gallegos, M. T., R. Schleif, A. Bairoch, K. Hofmann, and J. L. Ramos. 1997. "Arac/XylS Family of Transcriptional Regulators." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR 61(4):393–410.
- Gao, Xiaofei, Xiaogang Wang, Thanh H. Pham, Leigh Ann Feuerbacher, Marie-Luise Lubos, Minzhao Huang, Rachel Olsen, Arcady Mushegian, Chad Slawson, and Philip R. Hardwidge. 2013. "NleB, a Bacterial Effector with Glycosyltransferase Activity, Targets GAPDH Function to Inhibit NF-KB Activation." *Cell Host & Microbe* 13(1):87–99.
- Garcia-Garcia, Javier, Victòria Valls-Comamala, Emre Guney, David Andreu, Francisco J. Muñoz, Narcis Fernandez-Fuentes, and Baldo Oliva. 2017. "IFrag: A Protein–Protein Interface Prediction Server Based on Sequence Fragments." *Journal of Molecular Biology* 429(3):382–89.
- Gaytán, Meztli O., Verónica I. Martínez-Santos, Eduardo Soto, and Bertha González-Pedrajo. 2016. "Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6.
- Giron, J., A. Ho, and G. Schoolnik. 1991. "An Inducible Bundle-Forming Pilus of Enteropathogenic Escherichia Coli." *Science* 254(5032):710–13.
- Girón, Jorge A., Alfredo G. Torres, Enrique Freer, and James B. Kaper. 2002. "The Flagella of Enteropathogenic Escherichia Coli Mediate Adherence to Epithelial Cells." *Molecular Microbiology* 44(2):361–79.
- Glotfelty, Lila G., and Gail A. Hecht. 2012. "Enteropathogenic E. Coli Effectors EspG1/G2 Disrupt Tight Junctions: New Roles and Mechanisms." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1258(1):149–58.
- Gomes, Tânia A. T., Waldir P. Elias, Isabel C. A. Scaletsky, Beatriz E. C. Guth, Juliana F. Rodrigues, Roxane M. F. Piazza, Luís C. S. Ferreira, and Marina B. Martinez. 2016. "Diarrheagenic Escherichia Coli." *Brazilian Journal of Microbiology* : [Publication of the Brazilian Society for Microbiology] 47 Suppl 1(Suppl 1):3–30.
- Gómez-Duarte, O. G., and J. B. Kaper. 1995. "A Plasmid-Encoded Regulatory Region Activates Chromosomal EaeA Expression in Enteropathogenic Escherichia Coli." *Infection and Immunity* 63(5):1767–76.
- González, Fabiola. 2019. "Búsqueda de Proteína (s) Que Interactúen Con El Activador PerA de Escherichia Coli Enteropatógena."
- Guerler, Aysam, Brandon Govindarajoo, and Yang Zhang. 2013. "Mapping Monomeric Threading to Protein–Protein Structure Prediction." *Journal of Chemical Information and Modeling* 53(3):717–25.
- Heyduk, T., E. Heyduk, K. Severinov, H. Tang, and R. H. Ebright. 1996. "Determinants of RNA Polymerase

- Alpha Subunit for Interaction with Beta, Beta', and Sigma Subunits: Hydroxyl-Radical Protein Footprinting." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(19):10162–66.
- Hodges, Kim, and Ravinder Gill. 2010. "Infectious Diarrhea." *Gut Microbes* 1(1):4–21.
- Hodson, Carla, Ji Yang, Dianna M. Hocking, Kristy Azzopardi, Qianyu Chen, Jessica K. Holien, Michael W. Parker, Marija Tauschek, and Roy M. Robins-Browne. 2017. "Control of Virulence Gene Expression by the Master Regulator, CfaD, in the Prototypical Enterotoxigenic Escherichia Coli Strain, H10407." *Frontiers in Microbiology* 8.
- Hyland, Romney M., Jiangxiao Sun, Thomas P. Griener, George L. Mulvey, John S. Klassen, Michael S. Donnenberg, and Glen D. Armstrong. 2007. "The Bundlin Pilin Protein of Enteropathogenic Escherichia Coli Is an N-Acetyllactosamine-Specific Lectin." *Cellular Microbiology* 070816152918004-???
- Ibarra, J. A., M. I. Villalba, and J. L. Puente. 2003. "Identification of the DNA Binding Sites of PerA, the Transcriptional Activator of the Bfp and per Operons in Enteropathogenic Escherichia Coli." *Journal of Bacteriology* 185(9):2835–47.
- Ibarra, J. Antonio, Claudia M. García-Zacarias, Cristina Lara-Ochoa, Alejandro Carabarin-Lima, J. Sergio Tecpanecatl-Xihuítl, Ernesto Pérez-Rueda, Ygnacio Martínez-Laguna, and José L. Puente. 2013. "Further Characterization of Functional Domains of PerA, Role of Amino and Carboxy Terminal Domains in DNA Binding" edited by B. Stevenson. *PLoS ONE* 8(2):e56977.
- Ibarra, J. Antonio, Ernesto Pérez-Rueda, Lorenzo Segovia, and J. Luis Puente. 2008. "The DNA-Binding Domain as a Functional Indicator: The Case of the AraC/XylS Family of Transcription Factors." *Genetica* 133(1):65–76.
- Jaramillo, Juan. 2019. "Efecto de Un Miembro de La Familia ANR Sobre La Expresión de Genes de Virulencia Regulados Por PerA En E. Coli Enteropatógena."
- Kaper, James B., James P. Nataro, and Harry L. T. Mobley. 2004. "Pathogenic Escherichia Coli." *Nature Reviews Microbiology* 2(2):123–40.
- Kenny, B., A. Abe, M. Stein, and B. B. Finlay. 1997. "Enteropathogenic Escherichia Coli Protein Secretion Is Induced in Response to Conditions Similar to Those in the Gastrointestinal Tract." *Infection and Immunity* 65(7):2606–12.
- Khursigara, C., M. Abul-Milh, B. Lau, J. A. Girón, C. A. Lingwood, and D. E. Barnett Foster. 2001. "Enteropathogenic EscherichiacoliVirulence Factor Bundle-Forming Pilus Has a Binding Specificity for Phosphatidylethanolamine" edited by V. J. DiRita. *Infection and Immunity* 69(11):6573–79.
- Kotloff, Karen L., James P. Nataro, William C. Blackwelder, Dilruba Nasrin, Tamer H. Farag, Sandra Panchalingam, Yukun Wu, Samba O. Sow, Dipika Sur, Robert F. Breiman, Abu SG Faruque, Anita KM Zaidi, Debasish Saha, Pedro L. Alonso, Boubou Tamboura, Doh Sanogo, Uma Onwuchekwa, Byomkesh Manna, Thandavarayan Ramamurthy, Suman Kanungo, John B. Ochieng, Richard Omore, Joseph O. Oundo, Anowar Hossain, Sumon K. Das, Shahnawaz Ahmed, Shahida Qureshi, Farheen Quadri, Richard A. Adegbola, Martin Antonio, M. Jahangir Hossain, Adebayo Akinsola, Inacio Mandomando, Tacilta Nhampossa, Sozinho Acácio, Kousick Biswas, Ciara E. O'Reilly, Eric D. Mintz, Lynette Y. Berkeley, Khitam Muhsen, Halvor Sommerfelt, Roy M. Robins-Browne, and Myron M. Levine. 2013. "Burden and Aetiology of Diarrhoeal Disease in Infants and Young Children in Developing Countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): A Prospective, Case-Control Study." *The Lancet* 382(9888):209–22.
- Kozakov, Dima, David R. Hall, Bing Xia, Kathryn A. Porter, Dzmityr Padhorny, Christine Yueh, Dmitri Beglov, and Sandor Vajda. 2017. "The ClusPro Web Server for Protein–Protein Docking." *Nature Protocols* 12(2):255–78.
- Kralicek, Sarah E., Mai Nguyen, Ki-Jong Rhee, Rocio Tapia, and Gail Hecht. 2018. "EPEC NleH1 Is Significantly More Effective in Reversing Colitis and Reducing Mortality than NleH2 via Differential Effects on Host Signaling Pathways." *Laboratory Investigation* 98(4):477–88.
- Kryshtafovych, Andriy, Torsten Schwede, Maya Topf, Krzysztof Fidelis, and John Moult. 2019. "Critical Assessment of Methods of Protein Structure Prediction (CASP)—Round XIII." *Proteins: Structure,*

- Lacey, Carolyn A., and Edward A. Miao. 2020. “Programmed Cell Death in the Evolutionary Race against Bacterial Virulence Factors.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 12(2):a036459.
- Lara-Ochoa, Cristina, Fabiola González-Lara, Luis E. Romero-González, Juan B. Jaramillo-Rodríguez, Sergio I. Vázquez-Arellano, Abraham Medrano-López, Lilia Cedillo-Ramírez, Ygnacio Martínez-Laguna, Jorge A. Girón, Ernesto Pérez-Rueda, José Luis Puente, and J. Antonio Ibarra. 2021. “The Transcriptional Activator of the Bfp Operon in EPEC (PerA) Interacts with the RNA Polymerase Alpha Subunit.” *Scientific Reports* 11(1):8541.
- Leh, Hervé, Ahmad Khodr, Marie-Christine Bouger, Bianca Sclavi, Sylvie Rinsky, and Stéphanie Bury-Moné. 2017. “Bacterial-Chromatin Structural Proteins Regulate the Bimodal Expression of the Locus of Enterocyte Effacement (LEE) Pathogenicity Island in Enteropathogenic Escherichia Coli” edited by S. Gottesman. *MBio* 8(4).
- Martinez-Laguna, Ygnacio, Edmundo Calva, and Jose Luis Puente. 1999. “Autoactivation and Environmental Regulation of BfpT Expression, the Gene Coding for the Transcriptional Activator of BfpA in Enteropathogenic Escherichia Coli.” *Molecular Microbiology* 33(1):153–66.
- Mellies, Jay L., Amy Platenkamp, Jossef Osborn, and Lily Ben-Avi. 2017. “PerC Manipulates Metabolism and Surface Antigens in Enteropathogenic Escherichia Coli.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7.
- Mickey, Abigail S., and James P. Nataro. 2020. “Dual Function of Aar, a Member of the New AraC Negative Regulator Family, in Escherichia Coli Gene Expression.” *Infection and Immunity*.
- Moreira, Cristiano G., Kelli Palmer, Marvin Whiteley, Marcelo P. Sircili, Luiz R. Trabulsi, Antonio F. P. Castro, and Vanessa Sperandio. 2006. “Bundle-Forming Pili and EspA Are Involved in Biofilm Formation by Enteropathogenic Escherichia Coli.” *Journal of Bacteriology* 188(11):3952–61.
- Morikawa, Hanako, Minsoo Kim, Hitomi Mimuro, Claire Punginelli, Tomohiro Koyama, Shinya Nagai, Atsushi Miyawaki, Kazuhiro Iwai, and Chihiro Sasakawa. 2010. “The Bacterial Effector Cif Interferes with SCF Ubiquitin Ligase Function by Inhibiting Deneddylation of Cullin1.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 401(2):268–74.
- Morin, Nicholas, Araceli E. Santiago, Robert K. Ernst, Stacey J. Guillot, and James P. Nataro. 2013. “Characterization of the AggR Regulon in Enteroaggregative Escherichia Coli” edited by B. A. McCormick. *Infection and Immunity* 81(1):122–32.
- Morin, Nicholas, Chelsea Tirling, Sabine M. Iverson, Ajinder Pal Kaur, James P. Nataro, and Theodore S. Steiner. 2010. “Autoactivation of the AggR Regulator of Enteroaggregative Escherichia Coli in Vitro and in Vivo.” *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 58(3):344–55.
- Murakami, Katsuhiko S., and Seth A. Darst. 2003. “Bacterial RNA Polymerases: The Whole Story.” *Current Opinion in Structural Biology* 13(1):31–39.
- Murakami, Yoichi, and Kenji Mizuguchi. 2014. “Homology-Based Prediction of Interactions between Proteins Using Averaged One-Dependence Estimators.” *BMC Bioinformatics* 15(1):213.
- Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. “Diarrheagenic Escherichia Coli.” *Clinical Microbiology Reviews* 11(1):142–201.
- Ochoa, Theresa J., and Carmen A. Contreras. 2011. “Enteropathogenic Escherichia Coli Infection in Children.” *Current Opinion in Infectious Diseases* 24(5):478–83.
- Pearson, Jaelyn S., Cristina Giogha, Tania Wong Fok Lung, and Elizabeth L. Hartland. 2016. “The Genetics of Enteropathogenic Escherichia Coli Virulence.” *Annual Review of Genetics* 50(1):493–513.
- Pearson, Jaelyn S., Patrice Riedmaier, Olivier Marchès, Gad Frankel, and Elizabeth L. Hartland. 2011. “A Type III Effector Protease NleC from Enteropathogenic Escherichia Coli Targets NF-KB for Degradation.” *Molecular Microbiology* 80(1):219–30.
- Phillips, Neil, Richard D. Hayward, and Vassilis Koronakis. 2004. “Phosphorylation of the Enteropathogenic

- E. Coli Receptor by the Src-Family Kinase c-Fyn Triggers Actin Pedestal Formation.” *Nature Cell Biology* 6(7):618–25.
- Platenkamp, Amy, and Jay L. Mellies. 2018. “Environment Controls LEE Regulation in Enteropathogenic Escherichia Coli.” *Frontiers in Microbiology* 9.
- Pollock, Georgina L., Clare V. L. Oates, Cristina Giogha, Tania Wong Fok Lung, Sze Ying Ong, Jaclyn S. Pearson, and Elizabeth L. Hartland. 2017. “Distinct Roles of the Antiapoptotic Effectors NleB and NleF from Enteropathogenic Escherichia Coli” edited by A. J. Bäumlner. *Infection and Immunity* 85(4).
- Porter, Megan E., Paul Mitchell, Andrew J. Roe, Andrew Free, David G. E. Smith, and David L. Gally. 2004. “Direct and Indirect Transcriptional Activation of Virulence Genes by an AraC-like Protein, PerA from Enteropathogenic Escherichia Coli.” *Molecular Microbiology* 54(4):1117–33.
- Prajapat, Mahendra Kumar, Kirti Jain, and Supreet Saini. 2015. “Control of MarRAB Operon in Escherichia Coli via Autoactivation and Autorepression.” *Biophysical Journal* 109(7):1497–1508.
- El Qaidi, Samir, Kangming Chen, Adnan Halim, Lina Siukstaite, Christian Rueter, Ramon Hurtado-Guerrero, Henrik Clausen, and Philip R. Hardwidge. 2017. “NleB/SseK Effectors from Citrobacter Rodentium , Escherichia Coli , and Salmonella Enterica Display Distinct Differences in Host Substrate Specificity.” *Journal of Biological Chemistry* 292(27):11423–30.
- Raymond, Benoit, Valerie F. Crepin, James W. Collins, and Gad Frankel. 2011. “The WxxxE Effector EspT Triggers Expression of Immune Mediators in an Erk/JNK and NF-KB-Dependent Manner.” *Cellular Microbiology* 13(12):1881–93.
- 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.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104(25):10637–42.
- Ronin, Irine, Naama Katsowich, Ilan Rosenshine, and Nathalie Q. Balaban. 2017. “A Long-Term Epigenetic Memory Switch Controls Bacterial Virulence Bimodality.” *ELife* 6.
- Roxas, Jennifer Lising, Ross Calvin Monasky, Bryan Angelo P. Roxas, Al B. Agellon, Asad Mansoor, James B. Kaper, Gayatri Vedantam, and V. K. Viswanathan. 2018. “Enteropathogenic Escherichia Coli EspH-Mediated Rho GTPase Inhibition Results in Desmosomal Perturbations.” *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology* 6(2):163–80.
- Saldaña, Zeus, Ayşen L. Erdem, Stephanie Schüller, Iruka N. Okeke, Mark Lucas, Arunon Sivananthan, Alan D. Phillips, James B. Kaper, José L. Puente, and Jorge A. Girón. 2009. “The Escherichia Coli Common Pilus and the Bundle-Forming Pilus Act in Concert during the Formation of Localized Adherence by Enteropathogenic E. Coli.” *Journal of Bacteriology* 191(11):3451–61.
- Santamaría, Johanna, and Gary A. Toranzos. 2003. “Enteric Pathogens and Soil: A Short Review.” *International Microbiology* 6(1):5–9.
- Santiago, Araceli E., Fernando Ruiz-Perez, Noah Y. Jo, Vidhya Vijayakumar, Mei Q. Gong, and James P. Nataro. 2014. “A Large Family of Antivirulence Regulators Modulates the Effects of Transcriptional Activators in Gram-Negative Pathogenic Bacteria” edited by F. R. DeLeo. *PLoS Pathogens* 10(5):e1004153.
- Santiago, Araceli E., Michael B. Yan, Tracy H. Hazen, Brooke Sauder, Mario Meza-Segura, David A. Rasko, Melissa M. Kendall, Fernando Ruiz-Perez, and James P. Nataro. 2017. “The AraC Negative Regulator Family Modulates the Activity of Histone-like Proteins in Pathogenic Bacteria” edited by A. Charbit. *PLOS Pathogens* 13(8):e1006545.
- Santiago, Araceli E., Michael B. Yan, Minh Tran, Nathan Wright, Deborah H. Luzader, Melissa M. Kendall, Fernando Ruiz-Perez, and James P. Nataro. 2016. “A Large Family of Anti-Activators Accompanying XylS/AraC Family Regulatory Proteins.” *Molecular Microbiology* 101(2):314–32.
- Schuhmacher, Darren A., and Karl E. Klose. 1999. “Environmental Signals Modulate ToxT-Dependent Virulence Factor Expression in Vibrio Cholerae.” *Journal of Bacteriology* 181(5):1508–14.
- Selyunin, Andrey S., Sarah E. Sutton, Bethany A. Weigele, L. Evan Reddick, Robert C. Orchard, Stefan M.

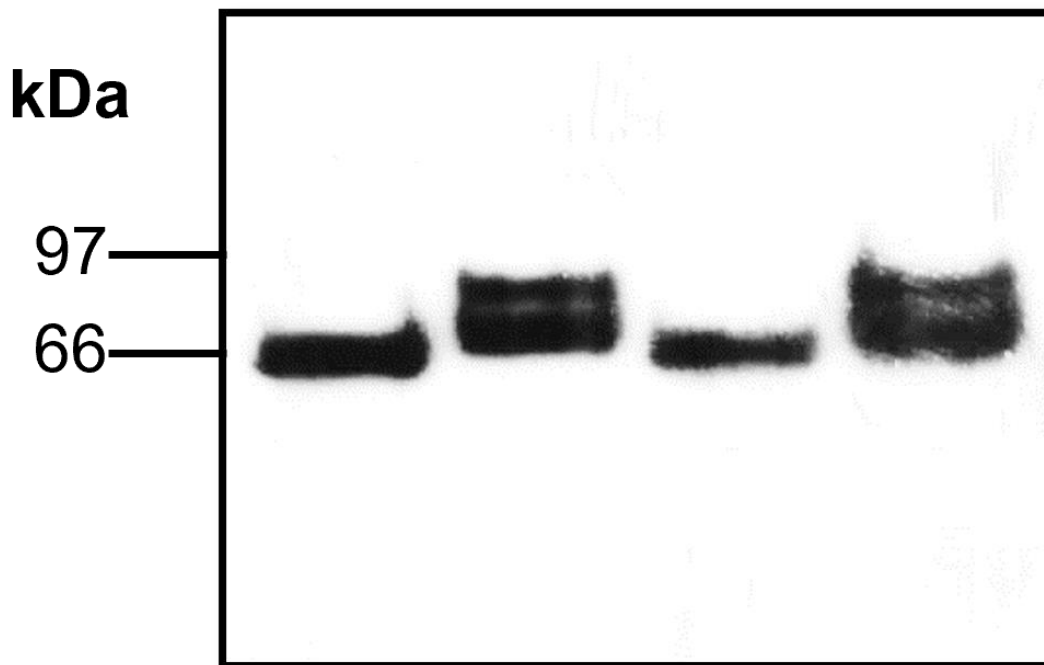
- Bresson, Diana R. Tomchick, and Neal M. Alto. 2011. "The Assembly of a GTPase–Kinase Signalling Complex by a Bacterial Catalytic Scaffold." *Nature* 469(7328):107–11.
- Serapio-Palacios, Antonio, and Fernando Navarro-Garcia. 2016. "EspC, an Autotransporter Protein Secreted by Enteropathogenic Escherichia Coli, Causes Apoptosis and Necrosis through Caspase and Calpain Activation, Including Direct Procaspase-3 Cleavage." *MBio* 7(3).
- Shin, Minsang. 2017. "The Mechanism Underlying Ler-Mediated Alleviation of Gene Repression by H-NS." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 483(1):392–96.
- Singh, Anand Prakash, and Saima Aijaz. 2016. "Enteropathogenic E. Coli: Breaking the Intestinal Tight Junction Barrier." *F1000Research* 4:231.
- Slater, Sabrina L., Agnes M. Sâgfors, Dominic J. Pollard, David Ruano-Gallego, and Gad Frankel. 2018. "The Type III Secretion System of Pathogenic Escherichia Coli." Pp. 51–72 in.
- Sohel, I., J. L. Puente, S. W. Ramer, D. Bieber, C. Y. Wu, and G. K. Schoolnik. 1996. "Enteropathogenic Escherichia Coli: Identification of a Gene Cluster Coding for Bundle-Forming Pilus Morphogenesis." *Journal of Bacteriology* 178(9):2613–28.
- Sperandio, Vanessa, Jay L. Mellies, Robin M. Delahay, Gad Frankel, J. Adam Crawford, William Nguyen, and James B. Kaper. 2000. "Activation of Enteropathogenic Escherichia Coli (EPEC) LEE2 and LEE3 Operons by Ler." *Molecular Microbiology* 38(4):781–93.
- Tapia, Rocio, Sarah E. Kralicek, and Gail A. Hecht. 2020. "Enteropathogenic Escherichia Coli (EPEC) Recruitment of PAR Polarity Protein Atypical PKC $\zeta$  to Pedestals and Cell–Cell Contacts Precedes Disruption of Tight Junctions in Intestinal Epithelial Cells." *International Journal of Molecular Sciences* 21(2):527.
- Thanabalasuriar, Ajitha, Athanasia Koutsouris, Andrew Weflen, Mark Mimee, Gail Hecht, and Samantha Gruenheid. 2010. "The Bacterial Virulence Factor NleA Is Required for the Disruption of Intestinal Tight Junctions by Enteropathogenic Escherichia Coli." *Cellular Microbiology* 12(1):31–41.
- Tobe, Toru, Tetsuya Hayashi, Chang Gyun Han, Gary K. Schoolnik, Eiichi Ohtsubo, and Chihiro Sasakawa. 1999. "Complete DNA Sequence and Structural Analysis of the Enteropathogenic Escherichia Coli Adherence Factor Plasmid." *Infection and Immunity* 67(10):5455–62.
- Ugalde-Silva, Paul, Octavio Gonzalez-Lugo, and Fernando Navarro-Garcia. 2016. "Tight Junction Disruption Induced by Type 3 Secretion System Effectors Injected by Enteropathogenic and Enterohemorrhagic Escherichia Coli." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 6.
- Umanski, Tatiana, Ilan Rosenshine, and Devorah Friedberg. 2002. "Thermoregulated Expression of Virulence Genes in Enteropathogenic Escherichia Coli." *Microbiology* 148(9):2735–44.
- World Health Organization. 2016. "WHO | Diarrhoea." *WHO*.
- Yan, Dapeng, Heming Quan, Lin Wang, Feng Liu, Haipeng Liu, Jianxia Chen, Xuetao Cao, and Baoxue Ge. 2013. "Enteropathogenic Escherichia Coli Tir Recruits Cellular SHP-2 through ITIM Motifs to Suppress Host Immune Response." *Cellular Signalling* 25(9):1887–94.
- Yang, Jianyi, and Yang Zhang. 2015. "I-TASSER Server: New Development for Protein Structure and Function Predictions." *Nucleic Acids Research* 43(W1):W174–81.
- Yao, Qing, Li Zhang, Xiaobo Wan, Jing Chen, Liyan Hu, Xiaojun Ding, Lin Li, Jayashree Karar, Hongzhuang Peng, She Chen, Niu Huang, Frank J. Rauscher, and Feng Shao. 2014. "Structure and Specificity of the Bacterial Cysteine Methyltransferase Effector NleE Suggests a Novel Substrate in Human DNA Repair Pathway" edited by G. Tran Van Nhieu. *PLoS Pathogens* 10(11):e1004522.
- Yasir, Muhammad, Christopher Icke, Radwa Abdelwahab, James R. Haycocks, Rita E. Godfrey, Pavelas Sazinas, Mark J. Pallen, Ian R. Henderson, Stephen J. W. Busby, and Douglas F. Browning. 2019. "Organization and Architecture of AggR-Dependent Promoters from Enteroaggregative Escherichia Coli." *Molecular Microbiology* 111(2):534–51.
- Yen, Hilo, Nakaba Sugimoto, and Toru Tobe. 2015. "Enteropathogenic Escherichia Coli Uses NleA to Inhibit

NLRP3 Inflammasome Activation” edited by D. J. Philpott. *PLOS Pathogens* 11(9):e1005121.

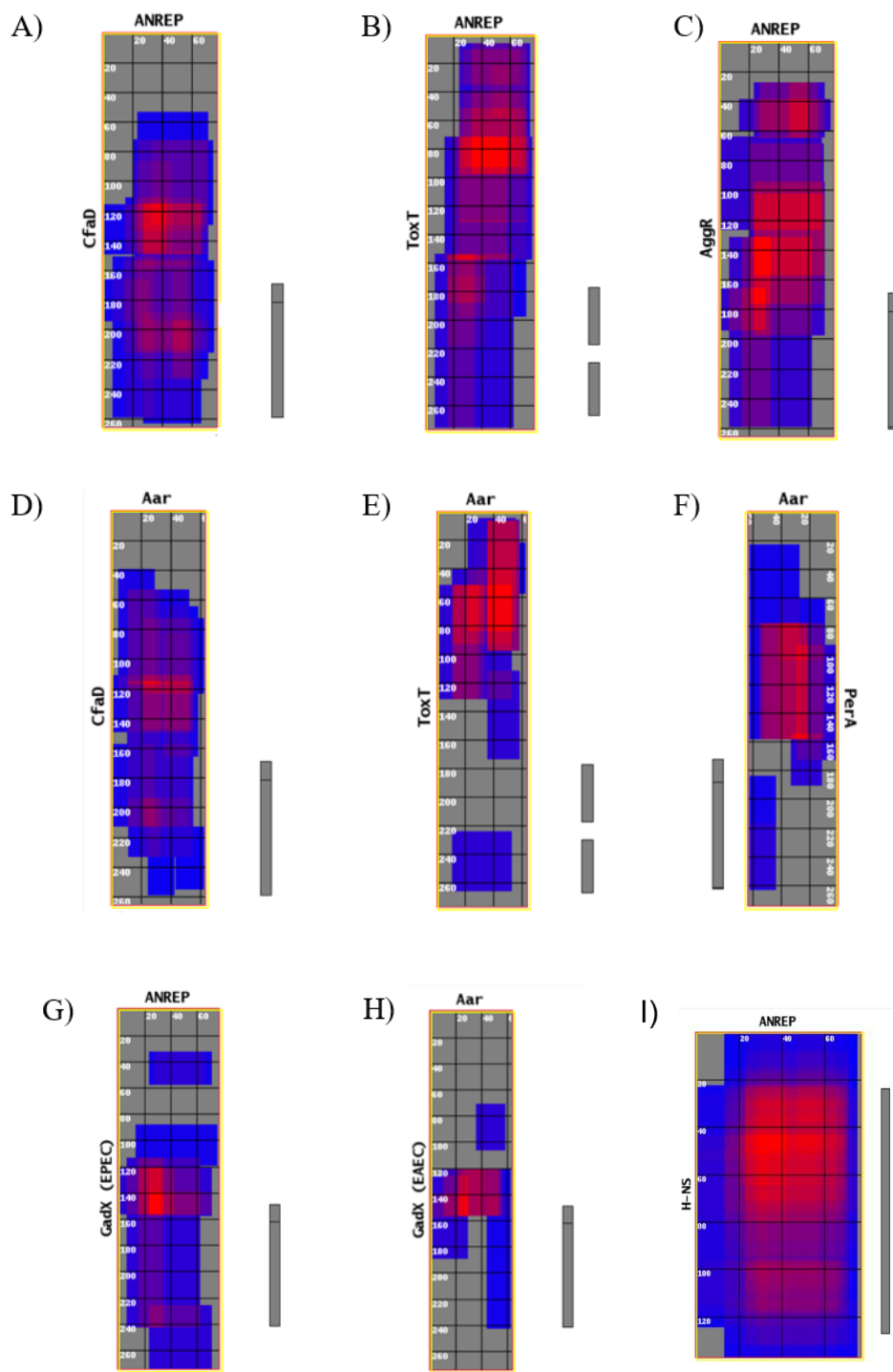
Young, Joanna C., Abigail Clements, Alexander E. Lang, James A. Garnett, Diana Munera, Ana Arbeloa, Jaclyn Pearson, Elizabeth L. Hartland, Stephen J. Matthews, Aurelie Mousnier, David J. Barry, Michael Way, Andreas Schlosser, Klaus Aktories, and Gad Frankel. 2014. “The Escherichia Coli Effector EspJ Blocks Src Kinase Activity via Amidation and ADP Ribosylation.” *Nature Communications* 5(1):5887.

Yugandhar, K., and M. Michael Gromiha. 2014. “Protein–Protein Binding Affinity Prediction from Amino Acid Sequence.” *Bioinformatics* 30(24):3583–89.

## 12. ANEXOS



**Figura A1.** “Western blot” de las proteínas purificadas MBP y MBP-PerA. Del orden de los carriles: 1) MBP, 2) MBP-PerA, 3) MBP y 4) MBP-PerA. Se utilizo como anticuerpo primario los anticuerpos policlonales de MBP.



**Figura A2.** Búsqueda de los sitios probables de interacción entre diferentes miembros de las familias ANR y AraC/XylS. **A)** ANREP-CfaD, **B)** ANREP-ToxT, **C)** ANREP-AggR, **D)** Aar-CfaD, **E)** Aar-ToxT, **F)** Aar-PerA, **G)** ANREP-GadX (EPEC), **H)** Aar-GadX (EAEC) **I)** ANREP-H-NS. Imágenes generadas en: “iFrag” (<http://sbi.imim.es/web/index.php/research/servers/iFrag?>).