



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

**Efecto de KdgR sobre la expresión de proteínas de virulencia en**

***Escherichia coli* enteropatógena**

Para obtener el título en:

Licenciada en Biomedicina

Presenta:

Gabriela Sanchez Ruiz

Director experto:

D. en C. Cristina Lara Ochoa

Puebla, Puebla.

Diciembre 2025





Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

**Efecto de KdgR sobre la expresión de proteínas de virulencia en  
*Escherichia coli* enteropatógena**

Para obtener el título en:

Licenciada en Biomedicina

Presenta:

Gabriela Sanchez Ruiz

Director experto:

---

D. en C. Cristina Lara Ochoa

Puebla, Puebla.

Diciembre 2025



*"The good thing about science is  
that it's true whether or not you  
believe in it"*

**"Lo bueno de la ciencia es que  
es verdad, creas o no en ella"**

*Neil deGrasse Tyson*

## **Agradecimientos**

Agradezco profundamente a mi familia por su apoyo y paciencia, a mi papá por todo lo que me ha dado y en todo lo que me ha apoyado, porque como dice la frase “si estás viviendo bien seguramente es porque hay alguien detrás que está trabajando duro para lograrlo” y sé que esa persona es mi Papá. A mi hermana por escucharme cada que lo necesitaba y a mi Mamá por todo su apoyo y sacrificio, por todo en lo que me han apoyado y yo no puedo ver.

A la Doc. Cristina por sus lecciones y enseñanzas de vida, así como a mis asesoras la Dra. Sandra Raquel Reyes Carmona y la Dra. María del Rocío Bustillos Cristales, por su tiempo, dedicación y consejos.

A mis amigos Luz, Sixta, Ana, Jaqueline, Carlos por apoyarme, por sus buenos deseos y por su amistad que me permitió recordarme que en este camino no estoy sola. Por hacerme parte de su vida, amigos, por eso y más de verdad muchas gracias. Six gracias por estar ahí para mí, por esperarme en aquellas ocasiones, por alimentarme, por preocuparte por mí y considerarme parte de tu vida.

A Rebeca, mi amiga de laboratorio, compañera de aprendizaje y lecciones de vida, a mis compañeros y amigos de laboratorio, a Nitza por escucharme, platicar conmigo y por acompañarme. A Rodrigo y Edvin por hacer más amena y divertida la convivencia. A doña Rosi, por su agradable compañía. Gracias equipo por compartir un pedacito de su vida conmigo.

A todos los que no agradecí y debo agradecer.

Gracias a todos y espero, en un futuro poder compensar todo lo que hicieron por mí porque un simple gracias no es suficiente.

Y, por último, un arrogante gracias a mí, que valientemente has escrito estas palabras.

Muchas gracias.

# Índice

<b>Abreviaturas</b> .....	<b>iv</b>
<b>Índice de figuras</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índice de tablas</b> .....	<b>viii</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>ix</b>
<b>1. Introducción</b> .....	<b>1</b>
1.1 <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC).....	4
1.1.1 Adherencia localizada (LA) .....	5
1.1.2 Adherencia y borrado de microvellosidades (A/E) .....	5
1.1.3 Determinantes genéticos de EPEC.....	6
1.1.4 Mecanismo de patogenicidad de EPEC.....	10
<b>2. Antecedentes</b> .....	<b>15</b>
2.1 Antecedentes generales .....	15
2.1.1 Reguladores H-NS y Ler.....	15
2.1.2 Reguladores PerA y PerC.....	16
2.1.3 Complejo regulador GrIR-GrIA .....	16
2.1.4 Percepción del quórum .....	17
2.1.5 Respuesta al estrés .....	18
2.2 Antecedentes específicos.....	20
2.2.1 PerA.....	20
2.2.2 KdgR.....	23
<b>3. Justificación</b> .....	<b>28</b>
<b>4. Hipótesis</b> .....	<b>29</b>
<b>5. Objetivos</b> .....	<b>29</b>
5.1 Objetivo general.....	29
5.2 Objetivos específicos.....	29
<b>6. Materiales y métodos</b> .....	<b>30</b>
6.1 Análisis bioinformáticos .....	30
6.1.1 Diseño de oligonucleótidos .....	30
6.2 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento .....	31
6.3 Extracción de ADN genómico y plasmídico .....	32
6.4 Electroforesis en gel de agarosa .....	33

6.5	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	34
6.5.1	Purificación de los productos de PCR	34
6.6	Clonación de <i>kdgR</i>	35
6.6.1	Transformación por electroporación	36
6.6.2	PCR de colonia	37
6.7	Purificación de KdgR-6XH	39
6.8	Sobreexpresión de la proteína MBP-PerA	40
6.9	Interacción MBP-PerA y KdgR-6XH por Pull-down	40
6.10	Perfil de proteínas secretadas	41
6.10.1	Western Blot	41
<b>7.</b>	<b>Resultados</b>	<b>43</b>
7.1	Análisis bioinformáticos	43
7.1.1	Búsqueda <i>in silico</i> de la interacción entre KdgR y PerA	43
7.1.2	Búsqueda de los posibles sitios de interacción entre KdgR y PerA	45
7.1.3	Estimación de la afinidad entre KdgR y PerA	47
7.1.4	Predicción de las estructuras terciarias de KdgR y PerA	49
7.1.5	Modelado de la interacción entre KdgR y PerA	53
7.2	Análisis experimental de la interacción entre KdgR y PerA	56
7.2.1	Clonación de <i>kdgR</i>	56
7.2.2	Sobreexpresión de KdgR-6XH	58
7.2.3	Purificación de KdgR-6XH	62
7.2.4	Sobreexpresión de MBP-PerA	62
7.2.5	Interacción proteína-proteína entre KdgR-PerA	63
7.3	Efecto de KdgR sobre proteínas de virulencia en EPEC	64
7.3.1	Perfil de proteínas secretadas en EPEC	64
7.3.2	Evaluación del efecto de KdgR sobre BfpA de EPEC	66
<b>8.</b>	<b>Discusión</b>	<b>68</b>
<b>9.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>74</b>
<b>10.</b>	<b>Perspectivas</b>	<b>75</b>
<b>11.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>76</b>
<b>12.</b>	<b>Anexos</b>	<b>91</b>

## Abreviaturas

A/E	Adherencia y destrucción ( <u>A</u> taching and <u>E</u> ffacing)
ADN	Ácido desoxirribonucleico ( <u>D</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>A</u> cid)
aEPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena atípica ( <u>A</u> typical <u>E</u> nteropathogenic <u>E. coli</u> )
Amp.	Ampicilina (Ampicillin)
BFP	Pilus formador de mechones ( <u>B</u> undle <u>F</u> orming <u>P</u> ilus)
CPR	Proteína receptora de cAMP ( <u>C</u> yclic AMP <u>R</u> eceptor <u>P</u> rotein)
Cpx	<u>C</u> onjugative <u>p</u> lasmid <u>e</u> xpression
CTD	Extremo Carboxilo Terminal
DAEC	<i>E. coli</i> difuso adherente ( <u>D</u> iffusely <u>A</u> dherent <u>E. coli</u> )
DBD	Dominio de unión al DNA ( <u>D</u> NA- <u>B</u> inding <u>D</u> omain)
DEC	<i>E. coli</i> diarrogénica ( <u>D</u> iarrheagenic <u>E. coli</u> )
DMEM	Medio Eagle modificado de Dulbecco ( <u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>eae</i>	<u>E. coli</u> <u>a</u> taching- <u>a</u> nd- <u>e</u> ffacing
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa ( <u>E</u> nteroaggregative <u>E. coli</u> )
<i>eda</i>	2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldolasa
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético (Ethylenediaminetetraacetic Acid)
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica ( <u>E</u> ntero <u>h</u> emorrhagic <u>E. coli</u> )
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva ( <u>E</u> ntero <u>i</u> nvasive <u>E. coli</u> )
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena ( <u>E</u> nteropathogenic <u>E. coli</u> )
Esp	Proteínas Secretadas de EPEC ( <u>E</u> PEC- <u>s</u> ecreted <u>p</u> rotein)
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica ( <u>E</u> nterotoxigenic <u>E. coli</u> )
ExPEC	<i>E. coli</i> extraintestinal ( <u>E</u> xtraintestinal <u>p</u> athogenic <u>E. coli</u> )
Fis	<u>F</u> actor for <u>i</u> nversion <u>s</u> imulation
GrlA	<u>G</u> lobal <u>r</u> egulator of <u>L</u> EE <u>A</u> ctivator
GrlR	<u>G</u> lobal <u>r</u> egulator of <u>L</u> EE <u>R</u> epressor
H-NS	<u>H</u> istone-like <u>N</u> ucleoid- <u>S</u> tructuring Protein
HTH	Hélice— Giro— Hélice ( <u>H</u> elix- <u>T</u> urn- <u>H</u> elix)
IHF	Factor de integración del huésped (Integration <u>H</u> ost <u>F</u> actor)

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
ITU	<u>I</u> nfecciones del <u>T</u> racto <u>U</u> rinario (Urinary Tract Infection)
KDG	2-ceto-3-desoxi-gluconato
KDPG	2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato
Km	Kanamicina (Kanamycin)
LA	Adherencia localizada ( <u>L</u> ocalized <u>A</u> dherence)
LAL	Similar a LA ( <u>L</u> A-like)
LB	<u>L</u> uria <u>B</u> ertani
LEE	Locus de destrucción del enterocito ( <u>L</u> ocus of <u>E</u> nterocyte <u>E</u> ffacement)
Ler	Regulador codificado en LEE ( <u>L</u> EE encoded <u>r</u> egulator)
LT	Enterotoxinas termolábiles (Heat <u>L</u> abile <u>T</u> oxin)
MAP	Proteína Asociada a Mitochondrias ( <u>M</u> itochondrial <u>P</u> rotein <u>A</u> ssociated)
MNEC	<i>E. coli</i> asociada a meningitis ( <u>N</u> eonatal <u>M</u> eningitis- <u>C</u> ausing <u>E. coli</u> )
MPM	<u>M</u> arcador de <u>P</u> eso <u>M</u> olecular
NaCl	Cloruro de sodio
NCBI	<u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> io <b>te</b> chnology <u>I</u> nformation
Nck	<u>N</u> on- <u>C</u> atalytic region of tyrosine <u>K</u> inase adaptor protein
Nle	<u>N</u> on- <u>L</u> EE- <u>e</u> ncoded
NTD	Extremo Amino Terminal
OMS	<u>O</u> rganización <u>M</u> undial de la <u>S</u> alud
ORF	Marco de Lectura Abierto ( <u>O</u> pen <u>R</u> eading <u>F</u> rame)
PAE	Error de alineamiento Predicho ( <u>P</u> redicted <u>A</u> ligned <u>E</u> rror)
PAI	Isla de Patogenicidad ( <u>P</u> athogenicity <u>I</u> sland)
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa ( <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
pEAF	Plásmido del factor de adherencia de EPEC ( <u>P</u> lasmid <u>E. coli</u> <u>A</u> dherence <u>F</u> actor)
<i>per</i>	Regulador codificado en plásmido ( <u>P</u> lasmid- <u>e</u> ncoded <u>r</u> egulator)
pLDDT	<u>P</u> ru <sup>e</sup> ba de <u>D</u> iferencia de <u>D</u> istancia <u>L</u> ocal <u>P</u> redicha
QseA	<u>Q</u> uorum-sensing <u>E. coli</u> regulator <u>A</u>

RNAP	ARN polimerasa ( <u>R</u> NA <u>p</u> olymerase)
SDS	Dodecilsulfato sódico ( <u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate)
SEPEC	<i>E. coli</i> causante de sepsis (Human sepsis-associated <i>E. coli</i> )
Str	Estreptomicina (Streptomycin)
ST	Enterotoxinas Termoestables
T3SS	Sistema de secreción tipo III ( <u>T</u> ype <u>III</u> <u>S</u> ecretion <u>S</u> ystem)
T6SS	Sistema de Secreción Tipo VI ( <u>T</u> ype <u>VI</u> <u>S</u> ecretion <u>S</u> ystem)
TF	Factores Transcripcionales ( <u>T</u> ranscriptional <u>F</u> actors)
Tir	Receptor de intimina translocado ( <u>T</u> ranslocated <u>i</u> ntimin <u>r</u> eceptor)
UPEC	<i>E. coli</i> uropatógena ( <u>U</u> ropathogenic <u>E.</u> <i>coli</i> )

## Índice de figuras

Figura 1: Sitios de colonización de las <i>E. coli</i> patógenas.....	3
Figura 2: Modelo de patogénesis de EPEC. ....	14
Figura 3: Regulación de los genes de virulencia en LEE y pEAF de EPEC.....	19
Figura 4: Dominios característicos de la familia Arac/XylS. ....	21
Figura 5: Búsqueda de posibles sitios de interacción.....	46
Figura 6: Modelado 3D de PerA obtenido con AlphaFold2. ....	50
Figura 7: Modelado 3D de KdgR obtenido con AlphaFold2. ....	51
Figura 8: Comparación del modelo 3D generado por AlphaFold2 vs. la estructura cristalina del CTD de KdgR. ....	52
Figura 9: Modelado predictivo de la interacción KdgR-PerA empleando AlphaFoldColab2.....	54
Figura 10: Aminoácidos involucrados en la interacción entre KdgR y PerA.....	55
Figura 11: PCR para la caracterización de las colonias candidatas con la construcción pBAD-KdgREP.....	57
Figura 12: Segunda PCR de las colonias candidatas que contienen pBAD-KdgREP. ....	57
Figura 13: Sobreexpresión de KdgR-6XH en <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ transformadas. ....	59
Figura 14: Identificación de KdgR-6XH mediante Western Blot. ....	60
Figura 15: Inducción de la proteína KdgR-6XH en <i>E. coli</i> BL21.....	61
Figura 16: Inducción de MBP-PerA. ....	63
Figura 17: Perfil de proteínas secretadas de EPEC. ....	65
Figura 18: Detección de MBP y KdgR-6XH.....	67
Figura 19: Detección de BfpA, con anticuerpos $\alpha$ -BfpA. ....	67
Figura 20: Modelo hipotético del papel de KdgR sobre genes de virulencia de EPEC. ....	73

## Índice de tablas

Tabla 1: Principales proteínas efectoras de EPEC.....	8
Tabla 2: Principales reguladores candidatos a interactuar con PerA .....	23
Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo .....	31
Tabla 4: Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo .....	32
Tabla 5: Condiciones y componentes de PCR usadas en este trabajo.....	34
Tabla 6: Componentes del proceso de digestión .....	35
Tabla 7: Componentes y cantidades del proceso de ligación .....	36
Tabla 8: Condiciones y componentes de PCR de colonia usadas en este trabajo	38
Tabla 9: Predicción <i>in silico</i> de la interacción entre KdgR y PerA .....	44
Tabla 10: Estimación <i>in silico</i> de la afinidad entre KdgR y PerA.....	48

## Resumen

Las enfermedades diarreicas son un problema de salud a nivel mundial y en países de ingresos bajos o en vías de desarrollo, representa la quinta causa de defunción, con aproximadamente 444,000 niños fallecidos al año. La diarrea tiene diferentes agentes etiológicos, entre los que destacan las DEC como EPEC, un patotipo capaz de colonizar el intestino delgado humano y alterar el equilibrio electrolítico en niños menores de 6 meses de edad. Los responsables genéticos de su mecanismo de patogenicidad y virulencia se encuentran ubicados en la isla LEE y el pEAF, los cuales están sometidos a estrictos mecanismos de regulación que responden a los cambios ambientales. Entre sus reguladores destaca la proteína PerA, miembro de la familia de reguladores transcripcionales Arac/XylS. PerA se encarga de la expresión de *bfpA*, el primer gen del operón *bfp* del pEAF y de la activación de su propio promotor. *In vitro* su expresión es reprimida durante su crecimiento en medio LB, en presencia de amonio o a temperaturas mayores o menores a 37°C, por el contrario, su expresión es favorecida por el medio DME a 37°C. En este sentido es pertinente suponer que existen efectores encargados de reprimir, interactuar o competir con PerA, para modular su función, por lo que, nuestro grupo de trabajo se propuso identificar las proteínas implicadas en dicha regulación. González-Lara *et al.*, identificaron las posibles interacciones que PerA establece con otras proteínas en condiciones de represión y que podrían influir en su función, de manera interesante se obtuvo a KdgR una proteína involucrada en la regulación de genes que codifican para varios tipos de pectinasas, para proteínas necesarias para la secreción de pectinasas, enzimas intracelulares implicadas en la escisión de dímeros, el catabolismo de monómeros y la regulación de otras proteínas moduladoras de diversas enterobacterias. Dada la probabilidad de su participación en la regulación de las proteínas de virulencia de EPEC, ya sea mediante su unión al ADN o su interacción con otro regulador como PerA, se realizaron análisis *in silico* de la probabilidad de interacción de ambas proteínas, de su sitio de interacción y de su afinidad, donde se obtuvieron resultados prometedores. Del mismo modo se hizo el modelado 3D de cada proteína y de su interacción, del cual se obtuvo un modelo que permitió dilucidar que los sitios de interacción se encuentran entre el CTD de PerA y el extremo NTD de KdgR. Con la finalidad de respaldar dichos resultados, se realizaron diversos procedimientos experimentales, en primera instancia se clonó a *kdgR* de EPEC en el pBAD/Myc-HisA, y con esta construcción se transformó una *E. coli* DH5α y *E. coli* BL21, de las cuales se evaluó su transformación, expresión y sobreexpresión. La transformación de *E. coli* DH5α, permitió determinar la concentración a la cual KdgR se sobreexpresa mejor, resultado en una concentración de 0.2% de arabinosa. La proteína también fue identificada por WB con una sonda His-Probe HRP, con la finalidad de determinar que la etiqueta de polihistidas se encontrara en fase. De igual manera se hicieron ensayos de Pull-down para comprobar la interacción entre KdgR y PerA, sin embargo, se reveló que KdgR podría interactuar con MBP, la proteína a la que se encuentra fusionada PerA. Basándonos en la posibilidad de interacción entre KdgR y PerA, se evaluó el efecto de KdgR sobreexpresado sobre el perfil de proteínas secretadas, en el que se observó una disminución de EspA, EspC y Esp B/D, lo que indica que KdgR, tiene un efecto negativo probablemente sobre PerA, pero también se sugiere que tiene un efecto sobre BfpA, al bloquear la actividad de PerA u otros efectores de LEE. Finalmente, se propone que KdgR bloquea la expresión de genes de virulencia mediante su interacción con PerA o Ler, bloqueando la activación transcripcional de *bfpA* y *per*, o bien compitiendo con PerA por su unión a los promotores *per* y *bfpA*. Concluimos que KdgR si reprime la expresión de las proteínas de virulencia de EPEC, mediante mecanismos aún desconocidos, con una mayor posibilidad de que esto ocurra por su interacción con PerA.

## 1. Introducción

*Escherichia coli* fue aislada y descrita por primera vez en 1885 por Theodor Escherich (un microbiólogo y pediatra de origen Bávaro), gracias a su trabajo titulado: “The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant” en el cual analizó los “microbios” intestinales de los bebés y su papel en la digestión y las enfermedades. Escherich observó y aisló 19 bacterias diferentes, entre ellas un bacilo gramnegativo de aproximadamente 1.1-1.5  $\mu\text{m}$  x 2-6  $\mu\text{m}$ , al que llamó *Bacterium coli commune*. Posteriormente, en 1919 Castellani y Chalmers propusieron el nombre *Escherichia coli* con el fin de honrar a Escherich. Más adelante, en 1958 fue oficialmente nombrado *E. coli* por la Comisión Judicial del Comité Internacional de Bacteriología Sistemática y finalmente en 1980 se incluyó en las Listas Aprobadas de Nomenclatura Bacteriana (Han *et al.*, 2023; Foster-Nyarko y Pallen, 2022; Blount, 2015).

*E. coli* es un bacilo flagelado miembro de la familia *Enterobacteriaceae*, anaerobio facultativo y mesófilo no esporulante (Mueller y Tainter, 2023; Allocati *et al.*, 2013). En la naturaleza, es un residente común en vertebrados y, en menor frecuencia, de algunas plantas y hábitats como el agua, el suelo, el estiércol y alimentos (Foster-Nyarko y Pallen, 2022; Blount, 2015). En el humano, *E. coli* pertenece a la microbiota total que habita en la superficie y el interior del cuerpo. Principalmente, forma parte de la microbiota intestinal y suele constituir alrededor del 0.1-5% de la población microbiana total, sin embargo, este porcentaje puede variar debido a diversas razones (Blount, 2015).

Es una de las primeras bacterias en colonizar el intestino delgado humano, al ser adquirida a pocas horas de nuestro nacimiento, ya sea por el contacto con la madre, el modo y lugar del parto u otros factores externos y ambientales (Coscia *et al.*, 2021). Esto permite el desarrollo de una relación mutualista entre el humano y *E. coli*, lo que implica que el humano proporcione un beneficio a la bacteria, por ejemplo: un lugar para su supervivencia, proliferación y segregación de nutrientes e inmunoglobulinas (IgA) a través del moco intestinal, que facilitan la formación de biopelículas de *E. coli*. Por su parte, *E. coli* ayuda a la digestión de los alimentos, a sintetizar vitaminas, a excluir competitivamente la invasión de patógenos, al

adecuado funcionamiento del sistema inmunológico y a promover la salud e integridad de la barrera de la mucosa intestinal (Han *et al.*, 2023; Blount, 2015; Peekhaus y Conway, 1998).

Naturalmente, la relación entre *E. coli* y el ser humano no es del todo benigna, algunos tipos también pueden causar problemas de salud, sobre todo en niños, pacientes inmunodeprimidos y viajeros (Han *et al.*, 2023; Cabrera-Sosa y Ochoa, 2020). De hecho, es una de las principales causas de peritonitis, colitis, bacteriemia, neumonía, enfermedades diarreicas e infecciones del tracto urinario (ITU) y en casos extremos puede llegar a causar cáncer e incluso la muerte (Han *et al.*, 2023; Blount, 2015).

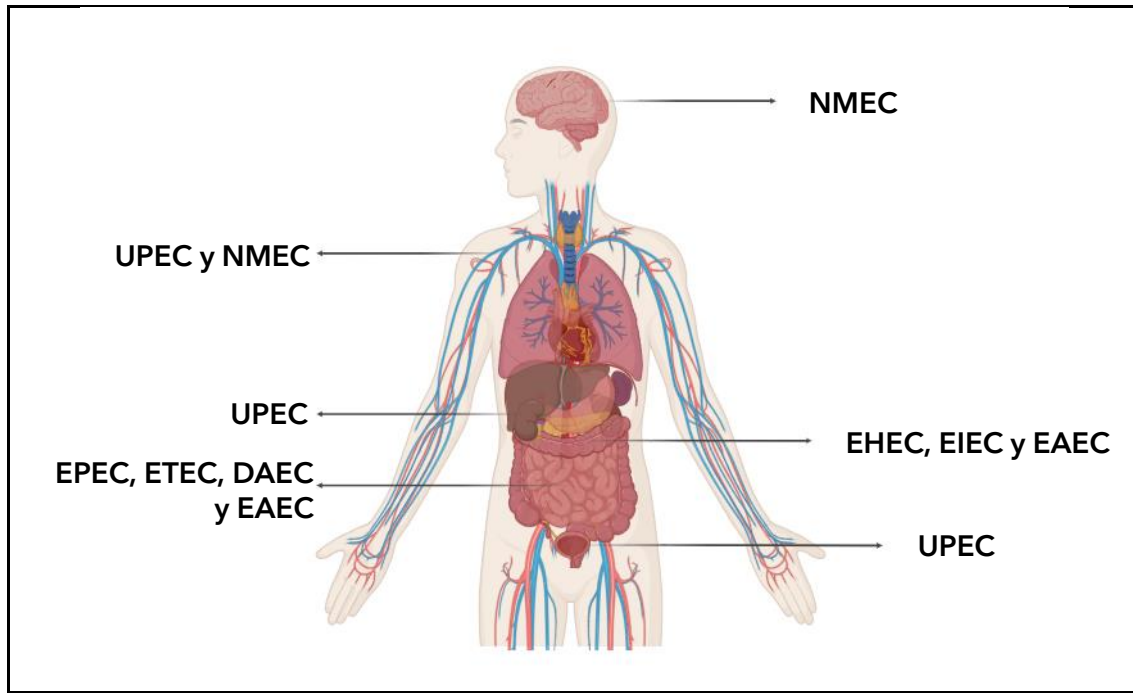
Las *E. coli* patógenas se clasifican en “patotipos” o “patovares”, basándose en su sitio de infección y su patogenia (figura 1). Al respecto se han descrito de ocho a nueve patovares los cuales a su vez se agrupan en: *E. coli* diarrogénica (DEC) y *E. coli* extraintestinal (ExPEC). Tres patovares son ExPEC: *E. coli* uropatógena (UPEC), *E. coli* asociada a meningitis (MNEC) y *E. coli* causante de sepsis (SEPEC). Mientras que seis patovares son DEC: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* difuso adherente (DAEC) (Govindarajan *et al.*, 2024; Croxen y Finlay, 2010).

Las enfermedades extraintestinales más comunes son: las infecciones del tracto urinario, causadas por UPEC, meningitis neonatal causada por MNEC y sepsis, causada por SEPEC (Govindarajan *et al.*, 2024; Johnson *et al.*, 2003).

Por su parte, las enfermedades diarreicas son comúnmente causadas por las DEC como: EHEC que causa diarrea sanguinolenta o colitis hemorrágica, diarrea no sanguinolenta y síndrome urémico hemolítico; ETEC causa diarrea acuosa leve autolimitada o grave; EAEC causa diarrea aguda y persistente; EIEC causa colitis inflamatoria invasiva, disentería y diarrea acuosa; DAEC es la causa de enfermedades inflamatorias intestinales y EPEC es la causa de diarrea aguda y persistente en menores de 6 meses de edad (Scaletsky, 2019; Ochoa y Contreras, 2011).

Aunado a esto, además de las DEC, también encontramos a otras bacterias, virus, hongos y parásitos como los principales agentes etiológicos de diarrea, donde los

rotavirus, *Giardia* y *Cryptosporidium*, son los más frecuentes (WHO, 2024; Ochoa y Contreras, 2011).



**Figura 1: Sitios de colonización de las *E. coli* patógenas.**

EPEC, ETEC y DAEC colonizan el intestino delgado; EHEC y EIEC colonizan el intestino grueso; EAEC puede colonizar el intestino delgado y grueso; UPEC, coloniza el tracto urinario y junto con NMEC puede llegar a circulación sanguínea y NMEC puede llegar al sistema nervioso central (Obtenido y modificado de: Govindarajan *et al.*, 2024; Croxen y Finlay, 2010 / Hecho con: Biorender.com).

Las enfermedades diarreicas son un problema de salud pública, representando la quinta causa de defunción a nivel mundial sobre todo en los países de bajos ingresos y en vías de desarrollo (OMS, 2023). La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima un total de 1.6 millones de defunciones por diarrea cada año, de los cuales aproximadamente el 27% son niños menores de 5 años, lo que implica el fallecimiento de alrededor de 1,200 infantes cada día, es decir, aproximadamente 444,000 niños fallecidos al año (UNICEF, 01/24; OMS, 2023; Troeger *et al.*, 2018). La diarrea es definida como la deposición de tres o más veces de heces sueltas o líquidas al día (WHO, 2024). Puede ser transmitida entre personas, a través de los alimentos mediante la ruta fecal oral y/o agua contaminados, así como líquidos de destete (WHO, 2024; Ochoa y Contreras, 2011).

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

En 1955, Neter *et al.*, introdujeron por primera vez el término *Escherichia coli* enteropatógena en su investigación titulada "Demonstration of antibodies against enteropathogenic *Escherichia coli* sera of children of various ages", en el cual describieron a EPEC como la cepa epidemiológicamente relacionada con una serie de brotes de diarrea infantil en Reino Unido, entre los 40's y 50's (Scaletsky, 2019; Gomes *et al.*, 2016). Más tarde entre las décadas de 1950 y 1960, Levite *et al.*, la reconocieron como la causante de diarrea infantil en países en desarrollo, gracias a investigaciones en humanos voluntarios (Scaletsky, 2019). Posteriormente, a finales de los 60's y principios de los 70's, la definición de EPEC cambió a: "*E. coli* diarreicas pertenecientes a serogrupos epidemiológicamente incriminados como patógenos, pero cuyos mecanismos patogénicos han demostrado no estar relacionados con enterotoxinas termolábiles (LT) o termoestables (ST) ni con invasividad similar a *Shigella*" [Revisado en (Scaletsky, 2019)].

Más adelante, en 1979 Cravioto *et al.*, describen la primera característica fenotípica de EPEC, conocida actualmente como "adherencia localizada". En 1983 Moon *et al.*, publicaron micrografías electrónicas de biopsias de tejido intestinal de cerdos y conejos infectados con EPEC, donde utilizan el término "adherencia y borrado", para describir la pérdida de microvellosidades, adhesión íntima y la formación de pedestales. Posteriormente, en 1987 la relación entre estos dos fenotipos fue aclarada y además se confirmó su conexión con el plásmido EAF (EPEC Adherence Factor), lo que permitió la distinción entre EPEC típica y EPEC atípica. Finalmente, en 1992 Donnenberg y Kaper propusieron un modelo de tres etapas de la patogénesis de EPEC que comprende: la adherencia localizada, la transducción de señales y la unión íntima (Scaletsky, 2019; Deborah Chen y Frankel, 2005).

Actualmente, EPEC se define como aquellas cepas de *E. coli* que tienen la capacidad de causar diarrea, de producir la histopatología tipo A/E (Ataching and Effacing) y la incapacidad de producir toxinas shiga, LT o ST (Gomes *et al.*, 2016). Coloniza la mucosa del intestino delgado y provoca diarrea acuosa, acompañada de vómitos y fiebre, afectando principalmente a niños menores de 2 años, con mayor prevalencia en niños de 6 meses (Vidal *et al.*, 2007).

Tradicionalmente, EPEC se clasifica en “típicas” (tEPEC o tipo I) y “atípicas” (aEPEC o tipo II) basándose en la presencia o ausencia del plásmido EAF respectivamente, que contiene genes que codifican para el pilus BFP (Bundle Forming Pilus). Las cepas tEPEC, además de causar diarrea y portar el plásmido EAF, inducen el fenotipo LA (Localized Adherence) y el fenotipo A/E, sobre las células del intestino delgado. En contraste, las aEPEC no poseen el plásmido EAF, lo que se traduce como la falta del pilus BFP y en su lugar exhiben una variante del patrón LA denominada LA-like (LAL), el cual se caracteriza por la presencia de microcolonias bacterianas compactas, sueltas o en grupos y también son capaces de formar lesiones A/E (Kaur y Dudeja, 2023; Scaletsky, 2019; Gomes *et al.*, 2016).

#### 1.1.1 Adherencia localizada (LA)

Las cepas tEPEC producen el fenotipo LA que se caracteriza por estar implicado en la adherencia inicial de EPEC a la superficie de las células intestinales, formando agregados bacterianos que se unen en microcolonias. LA está mediado principalmente por el pilus BFP, que contribuye a la autoagregación bacteriana y a la formación de biofilms (Scaletsky, 2019; Gomes *et al.*, 2016).

BFP es un pilus de tipo IV-B y es definido como un orgánulo fibrilar dinámico, compuesto por subunidades repetidas de bundlina (monómeros de pilina) con capacidad de extenderse y retraerse en la superficie bacteriana. Tienen un tamaño aproximado de 50 a 500 nm de ancho por 14 a 20  $\mu$ m de largo que permite la unión entre bacterias y la formación de redes tridimensionales (Scaletsky, 2019; Donnenberg, 2013; Clarke *et al.*, 2003).

#### 1.1.2 Adherencia y borrado de microvellosidades (A/E)

EPEC pertenece a una familia de bacterias llamadas patógenos A/E, a la que también pertenecen EHEC y *Citrobacter rodentium*, un patógeno murino capaz de causarle hiperplasia colónica (Serapio-Palacios y Finlay, 2020). La lesión A/E es una histopatología caracterizada por la capacidad bacteriana de adherirse a las células epiteliales íntimamente, alterar los bordes en cepillo en los enterocitos, generar el borramiento de las microvellosidades e inducir la formación de la

estructura en forma de copa o pedestal rica en actina (Serapio-Palacios y Finlay, 2020; Scaletsky, 2019; Cepeda-Molero *et al.*, 2017).

### 1.1.3 Determinantes genéticos de EPEC

Los elementos genéticos responsables del fenotipo A/E se encuentran en la isla de patogenicidad LEE (Locus of Enterocyte Effacement), mientras que, para el pilus BFP se encuentran ubicados en el plásmido EAF (Donnenberg, 2013).

#### 1.1.3.1 Plásmido EAF

El pEAF tiene un tamaño de ~80 Kb y contiene dos conjuntos de genes importantes para la patogenicidad: el grupo de genes *bfp* que codifican para BFP y el locus *per* (Plasmid-Encoded Regulator) que codifica para proteínas reguladoras de virulencia (Scaletsky, 2019; Donnenberg, 2013).

El operón *bfp* ocupa una región de 12 Kb del plásmido y está compuesto por 14 genes. El primer gen del operón es *bfpA* y se encarga de codificar la pre-bundlina, que posteriormente es procesada por una peptidasa de pre-pilina codificada por *bfpP* produciendo bundlina madura. Los genes restantes son: *bfpB*, *bfpC*, *bfpD*, *bfpE*, *bfpF*, *bfpG*, *bfpH*, *bfpI*, *bfpJ*, *bfpK*, *bfpL* y *bfpU*, de los cuales aún se desconoce su función exacta. Sin embargo, se ha propuesto que los productos de *bfpB* y *bfpG* se encargan de la formación de complejos similares a la secretina de la membrana externa. Las proteínas codificadas por *bfpC*, *bfpI*, *bfpJ*, *bfpK* y *bfpL* forman un componente estructural de la membrana interna de la subunidad principal del pilus, mientras que la proteína codificada por el gen *bfpU* es un componente periplasmático. El gen *bfpE* codifica para una proteína que podría estar funcionando en la estabilización de todos los componentes en la membrana interna, ya sea formando un andamio para el complejo de ensamblaje o para el transporte de otros componentes de membrana. Las funciones de las proteínas codificadas por *bfpH* y *bfpF* aún se desconocen, sin embargo, se cree que tienen un papel en la adherencia y autoagregación bacteriana (Donnenberg, 2013; Okeke *et al.*, 2001; Tobe *et al.*, 1999).

Además de los genes *bfp*, el pEAF también contiene al operón *perABC*, que se encuentra a 6,7 Kb río abajo del operón *bfp*. Son genes involucrados en la expresión

completa de BFP y en la activación transcripcional de genes ubicados en la isla LEE (Yamani y Elhadi, 2022; Pearson *et al.*, 2016; Donnenberg, 2013; Tobe *et al.*, 1999). El operón *perABC* comprende tres genes designados como: *perA*, *perB* y *perC*. El gen *perA*, el primer gen del operón codifica para una proteína de la familia de activadores transcripcionales AraC/XylS, llamada PerA, la cual activa la expresión de *bfpA*, así como a su propio promotor (Pearson *et al.*, 2016; Donnenberg, 2013). El producto de *perB* (14.8 kDa), aún se encuentra bajo investigación, sin embargo, se cree que tiene un papel independiente a la activación de los genes de virulencia de EPEC, o bien ayuda a la activación de *bfp* y/o a controlar el transcriptoma de EPEC (Platenkamp y Mellies, 2018; Porter *et al.*, 2004). El último gen del operón es *perC*, que codifica para una proteína de 89 aminoácidos con el mismo nombre. PerC, se encarga del control de la regulación de la isla de patogenicidad LEE a través de la modulación directa de Ler (LEE encoded regulator) (Mellies *et al.*, 2017; Porter *et al.*, 2005).

#### 1.1.3.2 Isla de patogenicidad LEE

La capacidad de EPEC para inducir la lesión A/E está asociada a una isla de patogenicidad cromosómica (PAI), denominada locus de borramiento de enterocitos o LEE. Esta isla tiene un tamaño de 35.624 Kb, con 41 genes que se encuentran organizados en 5 operones policistrónicos (LEE1 a LEE5), 2 operones bicistrónicos (LEE6 y LEE7) y 4 unidades transcripcionales (*egtA*, *cesF*, *map* y *escD*) [Revisado en (Kaur y Dudeja, 2023; Lee *et al.*, 2022; Scaletsky, 2019; Mellies *et al.*, 2007; Porter *et al.*, 2005)].

LEE1 a LEE5 se dividen en tres dominios funcionales: una región que codifica para la adherencia íntima, una región que codifica las proteínas secretadas por EPEC y a sus chaperonas y, por último, una región que codifica para un Sistema de Secreción Tipo 3 (T3SS: Type Ill Secretion System) (Deborah Chen y Frankel, 2005).

El operón LEE1 codifica para un regulador maestro de LEE denominado Ler, que se encarga del aumento de la transcripción de los operones LEE2-LEE5, así como de *espC* y genes fuera de LEE. LEE1 junto con los operones LEE2 y LEE3 contienen los genes necesarios para la producción, ensamblaje y regulación del T3SS,

incluyendo SepD y SepQ, la ATPasa EscN y la chaperona CesAB (Platenkamp y Mellies, 2018; Porter *et al.*, 2005).

Por su parte, LEE4 codifica para algunas de las proteínas efectoras secretadas extracelularmente por el T3SS, las cuales se indican en la tabla 1, así como para el aparato de translocación EspABD (EspA, EspB y EspD) y SepL. LEE5 codifica para la intimina y su receptor Tir (Translocated intimin receptor) (una proteína de membrana externa de 94 kDa, que es translocada a la membrana del huésped a través del T3SS), así como para la chaperona de Tir, CesT (Kaur y Dudeja, 2023; Lee *et al.*, 2022; Platenkamp y Mellies, 2018; Mellies *et al.*, 2007). Mientras que LEE6 codifica para una proteína efectora de función desconocida y LEE7 codifica para los reguladores globales de LEE: GrIR (Global regulator of LEE Repressor) y GrIA (Global regulator of LEE Activator), los cuales actúan como regulador negativo, y positivo respectivamente (Barba *et al.*, 2005; Deng *et al.*, 2003).

Cabe mencionar que existen varios elementos integrativos (IE) y profagos (PP), dispersos por el genoma de EPEC que albergan genes que codifican para proteínas efectoras conocidas como Nle (non-LEE-encoded) que son translocadas al enterocito mediante el T3SS. De manera general, el papel de estos efectores es la modulación y el control del huésped (tabla 1) (Kaur y Dudeja, 2023; Scaletsky, 2019; Cepeda-Molero *et al.*, 2017).

**Tabla 1: Principales proteínas efectoras de EPEC**

Proteína efectora	Actividad o función	Referencia
<b>EspA</b>	Formación de enlace directo entre la bacteria y la célula huésped y formación de lesiones A/E.	(Hartland <i>et al.</i> , 2000; Kenny <i>et al.</i> , 1996)
<b>EspB</b>	Translocación de otros efectores. Inhibición de la fagocitosis. Interferencia con la hemólisis de los glóbulos rojos y la acumulación de actina.	(Pakbin <i>et al.</i> , 2021; Knappstein <i>et al.</i> , 2004)
<b>EspC</b>	Actividad citotóxica en células epiteliales, escisión de diversos objetivos intracelulares. Redondeo y desprendimiento celular. Muerte celular por apoptosis y necrosis.	(Tejeda-Dominguez <i>et al.</i> , 2017)
<b>EspD</b>	Translocación de efectores de virulencia. Participa en la biosíntesis de filamentos de EspA.	(Neves <i>et al.</i> , 2003; Goldberg <i>et al.</i> , 2001)

<b>EspF</b>	Remodelación de membranas, nucleación de actina, muerte mitocondrial, ruptura de la unión estrecha, evasión inmunitaria, muerte de la célula huésped.	(Pearson <i>et al.</i> , 2016; Pakbin <i>et al.</i> , 2021)
<b>EspG y EspG2</b>	Inhibición del reciclaje de endosomas, inhibición de la secreción de citocinas, alteración de microtúbulos y ruptura de la unión estrecha. Estabilización simultánea de ARFF1-GTP e inhibición de la señalización de Rab1.	(Pearson <i>et al.</i> , 2016; Pakbin <i>et al.</i> , 2021)
<b>EspH</b>	Inhibición de la fagocitosis, formación de filopodiales, formación de pedestales y unión al dominio catalítico DH-PH de los RhoGEFs.	(Kaper <i>et al.</i> , 2004; Pearson <i>et al.</i> , 2016)
<b>NleA/Espl</b>	Inhibición de la secreción de proteínas y activación del inflamósoma. Establece enlace con Sec 24 B y HLRP3.	(Pearson <i>et al.</i> , 2016; Pakbin <i>et al.</i> , 2021)
<b>EspJ</b>	Inhibición de la opsonofagocitosis y la formación de biopelículas. Doble amidación/ ribosilación de ADP.	(Pearson <i>et al.</i> , 2016; Pakbin <i>et al.</i> , 2021)
<b>EspM</b>	Activación de Rho GTPasas.	(Arbeloa <i>et al.</i> , 2009; 2010)
<b>EspT</b>	Activación de Rho GTPasas Rac1 y Cdc42, formación de pliegues de membrana, lamelipodios e invasión de células huésped.	(Bulgin <i>et al.</i> , 2009)
<b>EspZ</b>	Inhibición de la citotoxicidad celular. Unión a CD98.	(Pearson <i>et al.</i> , 2016)
<b>NleB1</b>	Arginina glicosiltransferasa, dirigida a la arginina conservada en el dominio of death, FADD, TraDD y RipK1. Inhibición de la señalización del receptor of death.	(Pearson <i>et al.</i> , 2016)
<b>NleB2</b>	Glicosiltransferasa putativa. Posiblemente, complementa la actividad de NleB1.	(Pearson <i>et al.</i> , 2016)
<b>NleC</b>	Zinc metaloproteasa degradadora de las subunidades de NF- $\kappa$ B p65 y p50. Inhibición de la señalización de NF- $\kappa$ B.	(Pearson <i>et al.</i> , 2016)
<b>NleD</b>	Zinc metaloproteasa degradadora de p38 y JNK. Inhibición de la señalización de MAPK.	(Pearson <i>et al.</i> , 2016)
<b>NleE</b>	Inhibición de la señalización de NF- $\kappa$ B y reparación del ADN. Cisteína metiltransferasa dirigida al dominio dedo de zinc de TAB2/3 y ZRANB3.	(Pearson <i>et al.</i> , 2016)
<b>NleF</b>	Proteína de unión a caspasas -4, -8 y -9. Inhibición de la muerte celular y activación del inflamósoma.	(Pearson <i>et al.</i> , 2016; Pakbin <i>et al.</i> , 2021)
<b>NleG/NleI</b>	Imitación estructural y funcional de las ligasas de ubiquitina U-box/RING E3 eucariota.	(Wu <i>et al.</i> , 2010)
<b>NleH1 y NleH2</b>	Cinasa de unión a RPS3 y Bi-1, fosforilación <i>in vitro</i> de CRKL (NleH1). Inhibición de la inflamación y señalización de la muerte celular intrínseca.	(Pearson <i>et al.</i> , 2016)

<b>NleL/EspX7</b>	Imitación funcional y estructural de las ligasas HECT E3 eucariotas y catálisis de la formación de la cadena de poliubiquitina no anclada.	(Lin <i>et al.</i> , 2011)
<b>Map</b>	Alteración de membrana mitocondrial y del potencial de membrana, muerte de la célula huésped.	(Kaper <i>et al.</i> , 2004; Pearson <i>et al.</i> , 2016; Pakbin <i>et al.</i> , 2021)
<b>Cif</b>	Inhibición de la progresión del ciclo celular (bloqueo de G <sub>2</sub> /M), inactivación de Cdk1, retraso de la apoptosis, desamidación de NEDD8 e inhibición de CRL con neddilación.	(Kaper <i>et al.</i> , 2004; Pearson <i>et al.</i> , 2016; Pakbin <i>et al.</i> , 2021)

#### 1.1.4 Mecanismo de patogenicidad de EPEC

La adhesión de EPEC a las células huésped es un requisito indispensable para lograr una infección exitosa. Una vez adherida, la bacteria subvierte los procesos de la célula huésped utilizando proteínas efectoras que en consecuencia permiten el secuestro y manipulación de las vías de señalización de la célula (Croxen y Finlay, 2010). A este mecanismo se le conoce como “mecanismo de patogenicidad” el cual, para fines prácticos, se ha descrito como un modelo de patogénesis de tres etapas que implica: 1) adherencia inicial; 2) transducción de señales y 3) adherencia íntima (figura 2) (Vidal *et al.*, 2007; Deborah Chen y Frankel, 2005; Vidal-Graniel, 2003).

##### 1.1.4.1 Adherencia inicial

La primera etapa de la patogénesis de EPEC implica la adherencia inicial de la bacteria al epitelio intestinal del huésped. En esta etapa, EPEC forma microcolonias densas distribuidas sobre la superficie en un patrón conocido como adherencia localizada y ocurre principalmente por el pilus BFP (figura 2). Aquí participan dos proteínas de unión a nucleótidos, primero BfpD que media la extensión del pilus BFP y después BfpF que interviene en su retracción. Asimismo, BfpD promueve la agregación bacteriana, mientras que BfpF facilita la separación de EPEC de los agregados celulares que nutren y suministran los nutrientes necesarios para las etapas posteriores (Lee *et al.*, 2022; Pakbin *et al.*, 2021; Pearson *et al.*, 2016; Saldaña *et al.*, 2009; Deborah Chen y Frankel, 2005).

Múltiples investigaciones sugieren que este proceso no es completamente dependiente de BFP y en su defecto, es un fenómeno multifactorial que involucra

diversas adhesinas, tales como: flagelos, pilus ECP, Efa1/LifA, LPF, ToxB, StcE, Iha, OmpA, curli, entre otros (Lee *et al.*, 2022; Pearson *et al.*, 2016; Deborah Chen y Frankel, 2005).

#### 1.1.4.2 Inyección de efectores y transducción de señales

La segunda etapa implica el borrado de microvellosidades y la translocación de proteínas efectoras del citoplasma bacteriano a las células epiteliales intestinales mediante el T3SS (figura 2). La estructura del T3SS está compuesta por más de 20 proteínas, que se resumen en tres componentes principales: I) un complejo de agujas en la membrana externa (EscC, EscD, EscF y EscI); II) un aparato de exportación de membrana interna (EscRTS, EscU y EscV) y III) una plataforma de clasificación citoplasmática (EscA, EscL, EscN y EscQ) (Kaur y Dudeja, 2023; Lee *et al.*, 2022; Donnerberg, 2013).

EspA produce apéndices filamentosos que rodean a la bacteria e interactúan con la célula huésped, EspB es translocado a la membrana del huésped y junto con EspD, forman un poro en la membrana del hospedero, que a su vez envuelve a la estructura en forma de aguja permitiendo la translocación directa de las moléculas efectoras mencionadas en la tabla 1 (Kaur y Dudeja, 2023; Pakbin *et al.*, 2021; Pearson *et al.*, 2016; Croxen y Finlay, 2010; Vallance y Finlay, 2000).

Una vez translocadas las moléculas efectoras se desencadenan diversos eventos de señalización (tabla 1); por ejemplo: la proteína asociada a mitocondrias (Map) se activa e induce el factor Cdc42 que contribuye a la formación de filopodios en el sitio de unión, altera la funcionalidad de la membrana mitocondrial y contribuye junto con EspF, EspT, y Cif (Cycle Inhibiting Factor), a la muerte de las células epiteliales al bloquear la progresión del ciclo celular. NleA (EspI), activa el inflamósoma NLRP3 e interrumpe las uniones estrechas, contribuyendo a la evasión del sistema inmune y junto con EspB, H y J inhibe la fagocitosis. Mientras que NleF activa el inflamósoma moderando la respuesta inmunitaria (Kaur y Dudeja, 2023; Pakbin *et al.*, 2021; Croxen y Finlay, 2010).

Tir una vez translocado se inserta en la membrana plasmática del enterocito en una forma similar a una horquilla con los extremos C y N terminal ubicados en el citoplasma, donde sirve como receptor para intimina y, además inhibe la

señalización de NF- $\kappa$ B, lo que facilita la evasión de la respuesta inmune. La interacción Tir-intimina desencadenan eventos de señalización que conducen al reordenamiento del citoesqueleto y la formación de pedestales (figura 2) (Pakbin *et al.*, 2021; Croxen y Finlay, 2010; Vallance y Finlay, 2000).

#### 1.1.4.3 Unión íntima

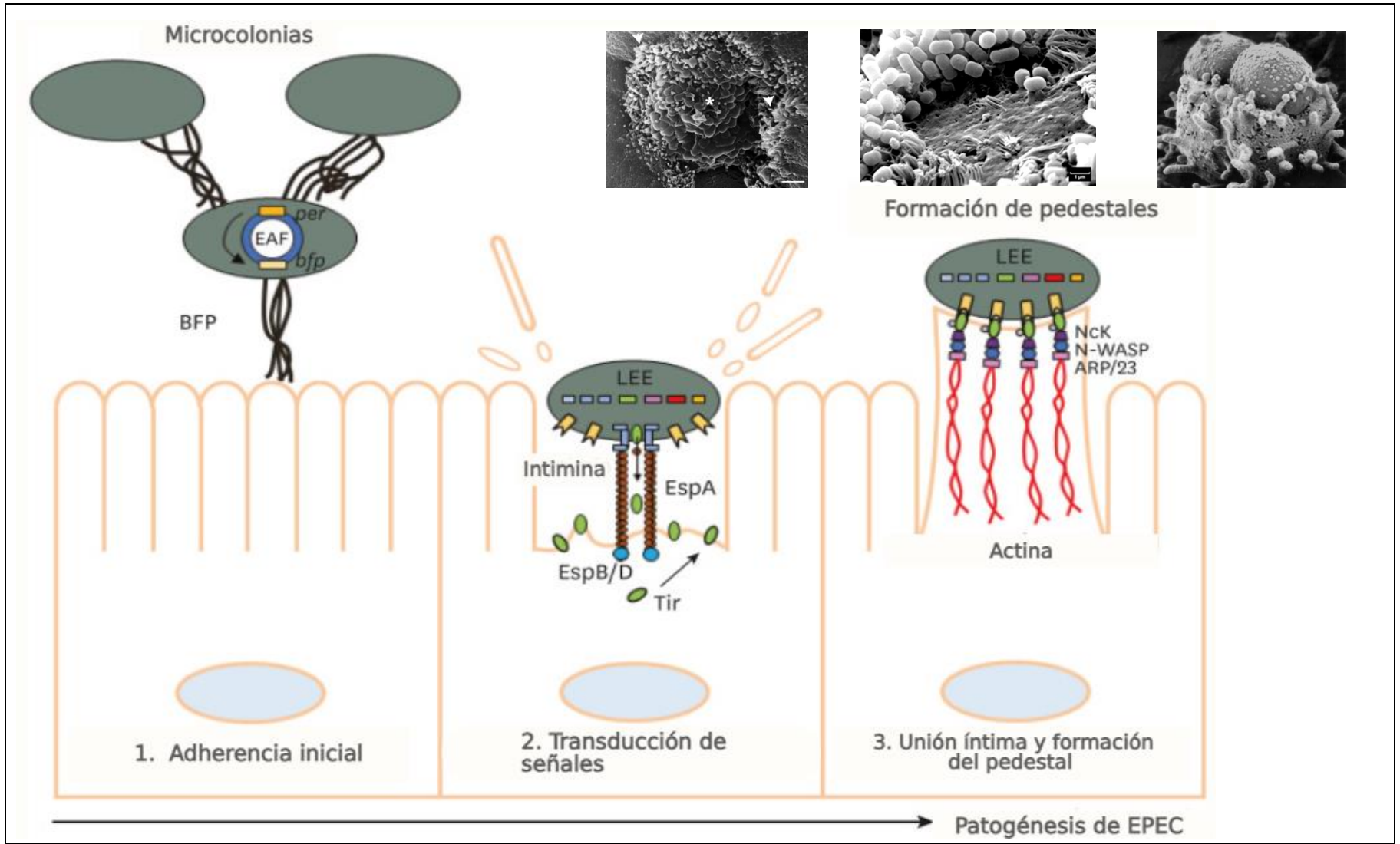
La tercera etapa se caracteriza por el borramiento de las microvellosidades de los enterocitos, la formación de pedestales y la unión íntima de las bacterias a la célula huésped (figura 2). Las cinasas de las familias Ab1/Arg, Src y Tec conducen a la fosforilación del residuo 474 (Y474) de Tir, lo que genera el reclutamiento e interacción con las proteínas adaptadoras Nck1 y Nck2 (Non-Catalytic region of tyrosine Kinase adaptor protein), esto conduce a la activación de la proteína N-WASP (Neu-tral-Wiskott Aldrich Syn-drome Protein), la cual a su vez activa el complejo Arp2/3 (Actin-Related Protein 2/3), que ensambla la actina debajo de EPEC causando la elevación de la membrana epitelial, formando una estructura en forma de pedestal que puede extenderse hasta los 10  $\mu$ m (Kaur y Dudeja, 2023; Pakbin *et al.*, 2021; Pearson *et al.*, 2016; Croxen y Finlay, 2010; Vallance y Finlay, 2000).

Otro mecanismo por el cual Tir dirige la formación de pedestales consiste en el reclutamiento de la inositol 5-fosfatasa (SHIP2) a través de dos de sus residuos de tirosina (Y438 e Y511) que imitan a los motivos ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-Based Inhibition Motif), normalmente presentes en receptores inmunológicos. El reclutamiento de la SHIP2 por Tir interrumpe la interacción de la SHIP2 con los motivos ITIM permitiendo la formación de pedestales al haber un reclutamiento desordenado de actina (Kuijpers, 2014; Pearson *et al.*, 2016; Barrow y Trowsdale, 2006).

Se cree que además de actina filamentosa, los pedestales contienen predominantemente talina, ezrina, vanillina, miosina II no muscular, tropomiosina y una fosfoproteína estimulada por vasodilatadores (VASP) (Kaur y Dudeja, 2023; Pakbin *et al.*, 2021).

En resumen, los procesos celulares que desencadenan las moléculas efectoras tienen como consecuencia la pérdida de la integridad de las uniones estrechas,

pérdida de la función mitocondrial y del tráfico vesicular, alteración de la polimerización de la actina, inhibición de la transición de G<sub>2</sub>/M del ciclo celular, alteración de la apoptosis y de la respuesta inmune, reducción de la capacidad de absorción intestinal, aumento de la permeabilidad de la mucosa y pérdida de electrolitos. Tales alteraciones conducen a la alteración del equilibrio electrolítico, que desencadena diarrea secretora persistente, fiebre baja, anorexia y en casos graves puede conducir a la muerte (Kaur y Dudeja, 2023; Platenkamp y Mellies, 2018; Deborah Chen y Frankel, 2005).



**Figura 2: Modelo de patogénesis de EPEC.**

El mecanismo por el cual EPEC coloniza el intestino delgado humano y causa enfermedad se describe como un modelo de 3 etapas: 1) Adherencia inicial, que implica la adherencia inicial de la bacteria al epitelio intestinal. 2) Transducción de señales, que implica el borrado de microvellosidades y la translocación de proteínas efectoras del citoplasma bacteriano a las células epiteliales intestinales. 3) Unión íntima, que implica el borramiento de los enterocitos, la formación de pedestales y la unión íntima de las bacterias a la célula huésped. Ver texto para más detalle (Obtenido y modificado de Lee *et al.*, 2022; Dean *et al.*, 2006; Kaper *et al.*, 2004 / Hecho con: Biorender.com).

## 2. Antecedentes

### 2.1 Antecedentes generales

El mecanismo de propagación de EPEC requiere de su capacidad de adaptación al entorno, es decir, adaptarse al ambiente exterior e interior del hospedero, al ambiente ácido del estómago y a la capa mucosa viscosa sobre el epitelio. Visto así, el proceso adaptativo recae sobre los mecanismos de regulación y expresión de genes de virulencia (Platenkamp y Mellies, 2018). La importancia de la estricta regulación radica en la oportuna expresión y represión de las proteínas de virulencia, ya que, si hay una expresión inapropiada, la bacteria gasta recursos metabólicos y alerta al sistema inmune del huésped alterando su proceso infeccioso (Clarke *et al.*, 2003).

La expresión de los factores de virulencia están controlados, en una primera etapa, por la acción de proteínas específicas llamadas factores transcripcionales (TF), que responden a la diversidad ambiental. De manera general, estas proteínas se unen al ADN y ejercen su actividad promoviendo, reprimiendo o ambos la transcripción de un gen dependiendo de las señales ambientales (Cortés-Avalos *et al.*, 2021). Entre los reguladores más importantes que modulan la expresión de los genes que codifican proteínas de virulencia de EPEC encontramos los descritos a continuación:

#### 2.1.1 Reguladores H-NS y Ler

H-NS (Histone-like Nucleoid-Structuring Protein), es una proteína de unión al ADN de 15.6 kDa que existe predominantemente en su forma tetramérica. Su estructura consiste en un dominio C-terminal de unión al ADN y un dominio de dimerización N-terminal. *In vitro* e *in vivo* es capaz de condensar al ADN de manera similar a las histonas de los eucariotas y de responder al entorno en el que se encuentre. Afecta negativamente la transcripción de diversos grupos de genes, entre ellos a los ubicados en LEE y el pEAF (figura 3) (Platenkamp y Mellies, 2018; Mellies *et al.*, 2007; Dame *et al.*, 2000; Atlung y Ingmer, 1997).

La proteína Ler tiene un peso de 15.1 kDa y muestra una gran similitud con el extremo C-terminal de H-NS. El mecanismo de acción de Ler es interrumpir los complejos proteicos de H-NS mediante su unión competitiva al ADN de los genes que regula, es decir, Ler interrumpe el silenciamiento de la expresión de dichos genes al desplazar a H-NS y a otras proteínas asociadas al ADN (Mellies *et al.*, 2007; Platenkamp y Mellies, 2018).

Ler es un modulador positivo de la expresión de los operones ubicados en LEE, así como genes fuera de LEE (figura 3) (Platenkamp y Mellies, 2018; Mellies *et al.*, 2007). Para la expresión de Ler es necesaria la proteína PerC, GrIA, Fis (Factor for inversion simulation) o IHF (Integration Host Factor), entre otras (Mellies *et al.*, 2007).

### 2.1.2 Reguladores PerA y PerC

El operón *per*, ubicado en el pEAF, es el determinante genético responsable del fenotipo LA e indirectamente el encargado de regular la formación de la lesión A/E a través de Ler. El primer gen del operón es *perA* que codifica a PerA, un regulador que activa su propio promotor y a *bfpA* que codifica para BfpA el cual se encarga de la activación a PerC (figura 3). La represión de PerA es dependiente de diversas proteínas como H-NS y GadX (figura 3), un regulador miembro de la familia AraC/XylS necesario para la activación de *gadA*, un gen que codifica para una glutamato descarboxilasa involucrada en la regulación de la resistencia al pH ácido (Platenkamp y Mellies, 2018; Mellies *et al.*, 2007; Clarke *et al.*, 2003; Tramonti *et al.*, 2002).

PerC activa la transcripción de LEE1 a través de Ler (figura 3) e indirectamente la transcripción del operón *fim*, genes del metabolismo, entre otros (Platenkamp y Mellies, 2018; Mellies *et al.*, 2007; Clarke *et al.*, 2003; Tramonti *et al.*, 2002).

### 2.1.3 Complejo regulador GrIR-GrIA

En el operón LEE7, se ubican 2 genes que codifican para las proteínas reguladoras GrIA y GrIR. GrIA contiene un motivo Hélice- Giro- Hélice (HTH: Helix-Turn-Helix) en su extremo N-terminal con el que une a la región promotora de LEE1 (entre el sitio -51 y el inicio de la transcripción) para la activación transcripcional de *ler*,

favoreciendo el incremento de Ler (figura 3). Este último, se encarga de modular la expresión de GrlA en un bucle de retroalimentación positiva (Jimenez *et al.*, 2010). Relevantemente, se ha encontrado que la unión de GrlA al ADN no solo regula positivamente la virulencia, sino también la motilidad flagelar de EPEC [Revisado en (Mellies *et al.*, 2007)].

En contraste, GrlR actúa como un represor formando una estructura dimérica de subunidades  $\beta$ -barril antiparalelas. GrlR dimeriza e interactúa con el dominio HTH y el extremo C-terminal de un monómero de GrlA, bloqueando la región de unión al ADN de GrlA evitando su función como activador transcripcional (figura 3) (Jimenez *et al.*, 2010; Millies *et al.*, 2007).

Cabe mencionar, que a pesar de que GrlR y GrlA actúan como un complejo regulador, se ha descrito que GrlR actúa como represor de genes LEE independiente de su interacción con GrlA, posiblemente interactuando con otros promotores de genes asociados a la regulación de Ler (figura 3) (Lara-Ochoa *et al.*, 2023).

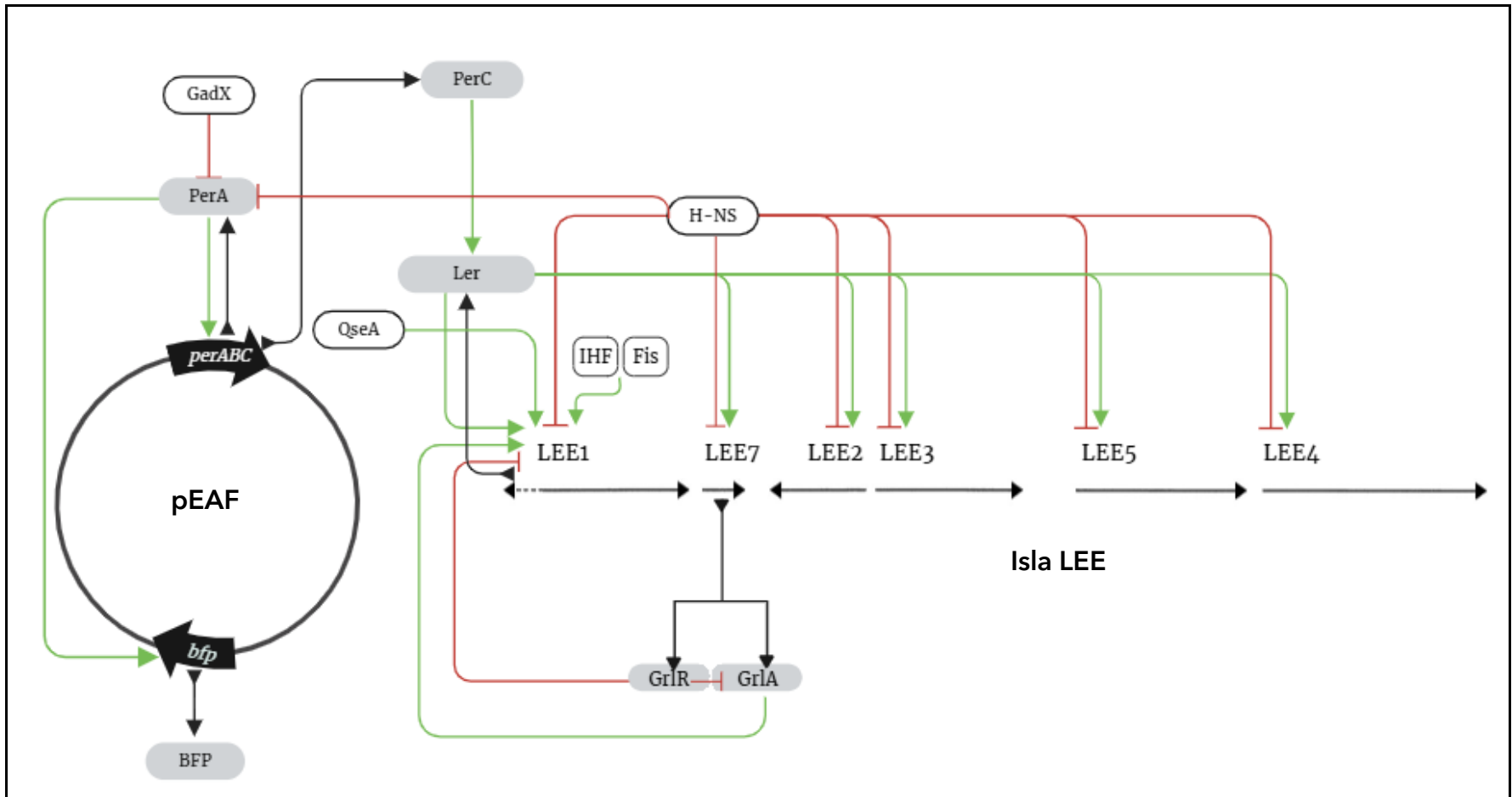
#### 2.1.4 Percepción del quórum

La percepción del quórum es un tipo de comunicación que permite a las bacterias regular su expresión génica en respuesta a la densidad celular. Se han descrito diversos sistemas de percepción de quórum para bacterias gramnegativas: el sistema LuxIR, descrito inicialmente para *Vibrio*, el sistema LuxS/AI-2 y el sistema de señalización AI-3 dependiente de *luxS*. Para EPEC se ha reportado la participación de la proteína QseA (Quorum-sensing *E. coli* regulator A) de la familia de reguladores LysR, que es activada por la furanona AI -2 (autoinducer 2) una molécula sensible al quórum, codificada por el gen *luxS*. La cascada de regulación, aún no se conoce por completo y continua bajo intensa investigación, sin embargo, se sabe que QseA activa la transcripción del operón LEE1 y por ende a Ler, lo que conduce al aumento de la expresión de genes de virulencia ubicados en LEE (figura 3). Cabe señalar que la percepción del quórum también activa la expresión de otros sistemas Qse, así como al regulón flagelar a través del sistema de dos componentes QseB (Platenkamp y Mellies, 2018; Sircili *et al.*, 2004; Clarke *et al.*, 2003).

### 2.1.5 Respuesta al estrés

La respuesta al estrés está relacionada con la atenuación de la virulencia de la bacteria, en donde participa el sistema de dos componentes CpxRA. Este sistema está compuesto por: CpxA una cinasa sensora en la membrana interna y CpxR un regulador de respuesta ubicado en el citosol encargado de reprimir la virulencia en presencia de una serie de señales que incluyen: indol, alta osmolaridad, etanol, n-butanol, cobre, pH alcalino, antibióticos aminoglúcidos, adhesión, crecimiento y disrupciones de fosfolípidos o proteínas de membrana o periplásmicas (Platenkamp y Mellies, 2018).

En EPEC, el sistema Cpx (Conjugative plasmid gene expression) está involucrado en la represión directa de LEE, específicamente de los operones LEE4 y LEE5 e indirectamente en la activación de proteínas reguladoras de diversos factores de virulencia, como: DsbA (una disulfuro oxidasa que facilita la estabilidad de BFP), PipA (un peptidil-prolil-isomerasa que facilita la biogénesis de los flagelos y del T3SS) y DegP (una proteína degradadora de BFP y proteínas mal plegadas en el periplasma y además corta las uniones adherentes del huésped) (Hunke *et al.*, 2012).



**Figura 3: Regulación de los genes de virulencia en LEE y pEAF de EPEC.**

El operón LEE1 codifica a Ler, el cual promueve la transcripción de todos los operones, está regulado por una serie de proteínas que incluyen a Ler, H-NS, Fis, IHF, QseA y PerC. El pEAF, contiene dos operones importantes; *bfp* y *perABC*. PerA promueve la transcripción de *bfp* y regula su propio promotor y en condiciones ácidas los genes *per* son reprimidos por GadX. QseA también regula el operón *perABC* y LEE1. GrA y GrR son un activador y represor de LEE, respectivamente. Las flechas verdes representan las vías reguladoras positivas, mientras que las flechas rojas representan la regulación negativa. Las flechas negras con inicio rombo indican la expresión de proteínas. Las proteínas reguladoras se muestran como óvalos. Ver texto para más detalle (Obtenido y editado de Platenkamp y Mellies, 2018; Mellies *et al.*, 2007; Kaper *et al.*, 2004; Clarke *et al.*, 2003/ Hecho en: Biorender.com).

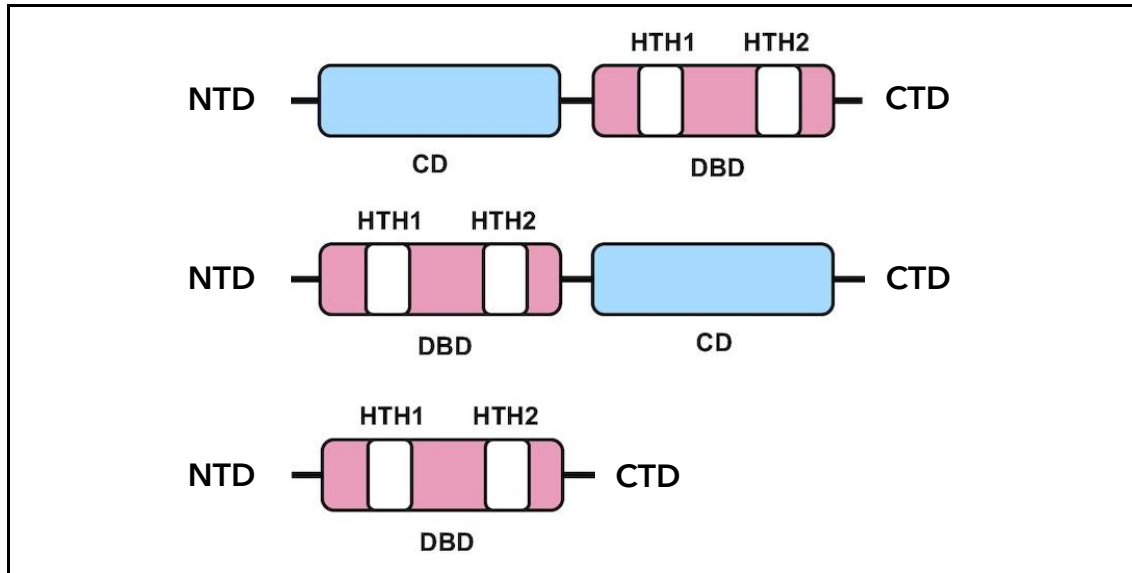
## 2.2 Antecedentes específicos

### 2.2.1 PerA

PerA (también llamado BfpT), es una proteína de 31.783 kDa y 274 aminoácidos, que pertenece a la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS (Martínez-Laguna *et al.*, 1999).

Esta familia fue descrita inicialmente en 1990 por Henikoff *et al.*, durante la aplicación de las primeras herramientas bioinformáticas en proteínas. Comprende alrededor de 1500 miembros distribuidos en bacterias gramnegativas y se caracteriza por ser una familia de activadores transcripcionales que tienen tres funciones reguladoras principales: metabolismo de carbono (CelD, RhaR, MelR, XylS, entre otros), respuestas al estrés (SoxS, Rob, MarA, AarP, entre otros) y reguladores de virulencia (PerA, AggR, Rns, AfrR, entre otros) (Santiago *et al.*, 2016; Gallegos *et al.*, 1997).

La familia AraC se distingue por contener un segmento de 99 aminoácidos que contienen dos motivos HTH, separados por una hélice  $\alpha$ . Los motivos HTH hacen contactos específicos con una secuencia de ADN y forman parte del dominio de unión al ADN llamado DBD (DNA-Binding Domain). El dominio DBD contiene siete  $\alpha$ -hélices ( $\alpha$ 1-  $\alpha$ 7) y puede estar ubicado en el extremo carboxilo (CTD), en el extremo amino terminal (NTD) o en la parte central, dependiendo de la función de la proteína (figura 4). Algunas proteínas de la familia AraC/XylS están formados exclusivamente por el DBD, pero en su mayoría (~65.4%), cuentan al menos con otro dominio, que es altamente variable, llamado dominio complementario/efector/regulatorio o de dimerización (CD), encargado de detectar moléculas de señalización (cofactores) y en algunos casos de la autodimerización, esta región suele estar ubicada en el NTD o en el CTD de la proteína (figura 4). Otra característica de algunos miembros de la familia AraC/XylS es su interdominio “linker” que une el DBD con el CD (figura 4) (Cortés-Avalos *et al.*, 2021; Santiago *et al.*, 2016).



**Figura 4: Dominios característicos de la familia AraC/XylS.**

La familia AraC/XylS se distingue por contener dos dominios: DBD y CD. El dominio DBD puede estar ubicado en el extremo CTD o NTD, pero también en la parte central de la proteína. El dominio CD puede estar ubicado en NTD o en el CTD de la proteína. Ver texto para más detalle. Dominio DBD es mostrado en rosa, los motivos HTH en blanco y el dominio CD mostrado en azul. (Obtenido y modificado de Cortés-Avalos *et al.*, 2021).

En PerA, el dominio DBD, está situado en el CTD y contiene dos motivos HTH de unión al ADN, encargados de la activación transcripcional de PerA. Por su parte el dominio CD se encuentra ubicado en el NTD de la proteína, y se propone que su función principal es la activación de PerA (Ibarra *et al.*, 2013).

PerA se encarga de la expresión de *bfpA*, y de la mediación de la autoactivación de su promotor, ya que se une como un monómero a una secuencia conservada rica en AT de entre 29-40 pb, ubicada río arriba de los promotores de *perA* y *bfpA* (Porter *et al.*, 2005; Ibarra *et al.*, 2003). El motivo de unión de PerA en *perA* está ubicado aproximadamente una vuelta hélice río arriba de la secuencia promotora -35, entre las posiciones -75 y -47 y en *bfpA* se encuentra a dos vueltas hélice río arriba del promotor (20 pb), entre las posiciones -83 y -55 (Ibarra *et al.*, 2003; Martínez-Laguna *et al.*, 1999). Para la expresión de *bfpA* y *perA*, PerA actúa como un activador que se pone en contacto con la RNA polimerasa (RNAP) a través de la subunidad  $\alpha$  que permite el reclutamiento de la RNAP a las regiones promotoras de los genes (Lara-Ochoa *et al.*, 2021).

La expresión de PerA continúa con muchas incógnitas sobre todo porque es modulada por diversas señales ambientales como la temperatura, la disponibilidad

de nutrientes y la presencia de sales de amonio. Martínez-Laguna *et al.*, llevaron a cabo ensayos *in vitro* que demostraron que su expresión es favorecida cuando la bacteria crece en medio DME a 37°C y reprimida durante el crecimiento en medio LB, afectando la transcripción de los genes *bfpA*, *perA* y los genes de LEE (Martínez-Laguna *et al.*, 1999). El mecanismo molecular que impide el funcionamiento de PerA en presencia de sales de amonio aún se desconoce, sin embargo, se propone la existencia de un efector o efectores exclusivos de EPEC encargados de reprimir a PerA al competir por los sitios de unión con las regiones reguladoras de *perA* y *bfpA* o bien por la existencia de una interacción proteína-proteína que bloquea o modula la función de PerA en respuesta a las condiciones ambientales (González-Lara, 2019).

En nuestro grupo de trabajo, González-Lara identificó las posibles interacciones que PerA establece con otras proteínas en condiciones de inducción y represión de los operones *bfp* y *per*, que en consecuencia influyen en su función como activador transcripcional de virulencia en EPEC (González-Lara, 2019). En un inicio, con la finalidad de identificar las probables proteínas que interactúan con PerA, González-Lara purificó a PerA fusionada a la MBP (Maltose Binding Protein), realizó ensayos de interacción proteína-proteína (Pull-down y Co-purificación) usando extractos proteicos de EPEC WT y  $\Delta perA$ , crecidas en condiciones de expresión (DMEM 37°C) y represión (LB). Los resultados obtenidos se analizaron por espectrometría de masas, donde se identificaron diversas proteínas candidatas que podrían tener un efecto importante sobre la función de PerA. En este grupo también se identificaron reguladores transcripcionales (tabla 2) como DeoR, XRE, AsnC, Fad, PurR, IciR, AraC, CysB y la proteína de interés del presente trabajo KdgR, que en su mayoría comparten un motivo de unión al ADN tipo HTH, proponiéndose que aquellas proteínas con actividad represora en procesos metabólicos regulan a PerA en respuesta a las señales ambientales, con la finalidad de garantizar una colonización exitosa (González-Lara, 2019).

**Tabla 2: Principales reguladores candidatos a interactuar con PerA**

Regulador transcripcional	Peso (kDa)	Función
<b>KdgR</b>	30	Involucrado en la regulación de la vía Entner Doudoroff, genes del catabolismo de pectina y factores de virulencia.
<b>SlyA</b>	16.3	Involucrado en la regulación de la virulencia, respuestas al estrés, motilidad bacteriana, quimiotaxis y secreción de proteínas.
<b>CysB</b>	36.1	Involucrado en la regulación negativa de su propia expresión y la activación de genes implicados en el metabolismo de sulfanato-azufre.
<b>AsnC</b>	16.8	Involucrado en la regulación de su propia expresión y la síntesis de asparagina.
<b>FadR</b>	26.9	Involucrado en la optimización de metabolismo de ácidos grasos.
<b>IclR</b>	31	Involucrado en el metabolismo de carbono, resistencia a multidrogas, regulación de la virulencia y señales quórum sensing.
<b>GntR</b>	28.2	Involucrado en la regulación de ácidos grasos, catabolismo de aminoácidos y carbohidratos, en la producción de ácidos orgánicos, y degradación de complejos orgánicos.
<b>AraC</b>	9.8	Involucrado en la represión de la transcripción del operón araBAD en ausencia de arabinosa.
<b>SlyA/ HosA</b>	16.3	Involucrado en la movilidad dependiente de la temperatura, pH y fase de crecimiento.

Obtenido y modificado de González-Lara, 2019.

### 2.2.2 KdgR

KdgR (**KDG Represor**) tiene un peso molecular de 30.03 kDa y 263 aminoácidos. Es un regulador transcripcional global miembro de la familia IclR (**I**socitrate **L**yase **R**egulator) (Bouyioukos *et al.*, 2016; Krell *et al.*, 2006).

En esta familia se incluyen proteínas activadoras, represoras, autorreguladoras e incluso con una doble función. Las proteínas de esta familia controlan genes cuyos productos están involucrados en la regulación de una amplia variedad de procesos en enterobacterias patógenas de humanos y de plantas, regulan el metabolismo de carbono y determinantes de patogenicidad; en bacterias del suelo regulan la degradación de compuestos aromáticos y la resistencia a múltiples fármacos; en *Agrobacterium* participan en la inactivación de las señales de percepción del quórum; en *Pseudomonas* están involucrados en la tolerancia a solventes y en

*Streptomyces* regulan la esporulación (Lu *et al.*, 2011; Krell *et al.*, 2006; Molina-Henares *et al.*, 2006).

Las proteínas de la familia IclR se caracterizan por estar formadas de ~240-280 residuos de aminoácidos que conforman dos dominios: el dominio de unión a ADN estructurado por un motivo HTH ubicado en su extremo NTD, que se une a una secuencia palindrómica rica en AT de 12-14 pb y un dominio regulador en el CTD, el cual funciona como un dominio de unión a una molécula señal (o ligando pequeño) (Molina-Henares *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2002).

Hay más de 100 miembros conocidos de la familia IclR que se encuentran en 44 especies bacterianas y 2 arqueas. Sin embargo, los miembros mejor caracterizados incluyen a IclR en *E. coli*, GylR (represor de la vía del catabolismo del glicerol) en *Streptomyces coelicolor* y el objeto de investigación del presente trabajo KdgR en el género *Pectobacterium*, *Dickeya* y *Xanthomonas* (Zhang *et al.*, 2002).

En bacterias gramnegativas, se demostró que KdgR contribuye a la regulación de la vía de Entner Doudoroff (ED), que cataboliza la glucosa a piruvato, alimenta a la glucólisis y contribuye de manera indirecta a la colonización del intestino humano. Esta vía es preferida por microorganismos anaerobios y aerobios facultativos, ya que tiene la ventaja de requerir menos proteínas enzimáticas para catabolizar glucosa a piruvato y de metabolizar gluconato que no puede metabolizarse por la vía del metabolismo de glucosa (Bouyioukos *et al.*, 2016; Peekhaus y Conway, 1998).

El esquema general de la vía ED incluye dos enzimas únicas; la 6-fosfogluconato deshidratasa (EDD) y la aldosa 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato aldosa (EDA). El proceso inicia cuando el 6-fosfogluconato es deshidratado por EDD para formar KDPG (2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato), que posteriormente es escindido por EDA para formar piruvato y glicerol 3-fosfato (G3PS) (Peekhaus y Conway, 1998). Se ha demostrado que en la vía ED, los genes *eda* y *edd* están implicados en las respuestas al estrés e inanición de fosfato y nitrógeno (Bouyioukos *et al.*, 2016; Peekhaus y Conway, 1998). El posible mecanismo de regulación de KdgR sobre el gen *eda*, en dichas condiciones, inicia con la unión de KdgR como dímero a la

región promotora del gen (17 pb de largo), reprimiendo así su expresión (George *et al.*, 2016; Murray y Conway, 2005; Peekhaus y Conway, 1998).

### 2.2.2.1 Papel de KdgR en la regulación de la virulencia

Si bien se ha documentado en patógenos de plantas que KdgR, *eda* y otros genes y operones, son necesarios para la expresión de la virulencia, su papel no está del todo claro, por lo que aún se encuentra bajo intensa investigación (Wang *et al.*, 2020). En este contexto la relación entre la virulencia y KdgR ha sido ampliamente estudiada en patógenos de plantas, entre los que destacan; los géneros bacterianos *Pectobacterium*, *Dickeya* y *Xanthomonas* (Golanowska *et al.*, 2018). *Pectobacterium carotovorum* es un patógeno de plantas, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* capaz de causar la enfermedad de la podredumbre blanda en las plantas de repollo, papa, cebolla y rábano. Es descrito como un patógeno de “fuerza bruta”, porque su estrategia de virulencia involucra; enzimas degradadoras de la pared celular vegetal o PCWDE (Plan Cell Wall-Degrading Enzymes) (que son secretadas a través del T2SS: Type II Secretion System), proteínas de virulencia como Nip y SvX, flagelos, T3SS y T6SS (Type VI Secretion System). La regulación de estos factores está controlada por una compleja red reguladora que incluyen al sistema quórum, el sistema de dos componentes GacA/GacR, reguladores de la familia IclR y sistemas de ARN (RsmA/RsmB/RsmC) (Golanowska *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2013; Mole *et al.*, 2010).

Los reguladores que controlan la producción de los PCWDE incluyen a KdgR, HexA y RsmA. En *P. carotovorum* KdgR actúa como un regulador maestro de los PCWDE y otros factores de virulencia, mediante el sistema Rsm en respuesta a la ausencia de productos de degradación de la pectina (Mole *et al.*, 2010). Su mecanismo de acción implica la represión de *rsmB* (ARN funcional) quien secuestra a RsmA, evitando así la traducción de los genes PCWDE y, por lo tanto, la degradación de la pared celular vegetal (Mole *et al.*, 2010).

Otro ejemplo es *Dickeya dadantii* (anteriormente conocida como *Erwinia chrysanthemi*), comúnmente relacionada con la enfermedad de la podredumbre blanda en plantas de papa, arroz, maíz, piña, plátano, entre otras (Pereire *et al.*, 2024). Su mecanismo de patogenicidad y virulencia depende principalmente de

enzimas pectinolíticas (que degradan la pectina de la pared celular de las plantas) y el uso de los productos de degradación de la pectina como fuente de carbono para el crecimiento, propagación e infección bacteriana (Reverchon *et al.*, 1991). KdgR funciona como un regulador global de los genes implicados en el catabolismo de la pectina, de monómeros y ramnogalacturonato, induciendo alrededor de 50 genes en presencia de pectina y controlando alrededor de al menos 13 operones (Golanowska *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2011; Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2004; Reverchon *et al.*, 1997, 1991).

El mecanismo por el cual KdgR regula estos genes es mediante su funcionamiento en conjunto con otros reguladores como CRP (un represor de catabolitos; Cyclic AMP Receptor Protein) o FurR (un regulador global de la utilización de carbono), al unirse con el motivo HTH a las regiones promotoras de los genes blanco, promoviendo la ruptura de la pared celular de las plantas y la liberación de los nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano (Golanowska *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2011; Hugouvieux-Cotte-Pattat, 2004; Reverchon *et al.*, 1997, Reverchon *et al.*, 1991).

En especies del género *Xanthomonas* están relacionadas con la infección y colonización del tejido mesófilo de plantas de arroz, tomate, plátano, frijol, pimiento, entre otras (Cardoso *et al.*, 2022; Timilsina *et al.*, 2020). KdgR regula negativamente la expresión de genes HRP, así como a sus reguladores (*hrpG* y *hrpX*). HrpG y HrpX son las principales proteínas reguladoras de la expresión del regulón *hrp*. Mientras que los genes HRP, codifican los componentes del T3SS, a enzimas necesarias para la síntesis de glucanos y a elicitores proteicos capaces de causar hipersensibilidad en plantas no hospederas y resistentes. El mecanismo de regulación implica la unión de KdgR a las regiones promotoras de los genes *hrp*, bloqueando así su expresión (Lu *et al.*, 2011; Lindgren, 1997).

En patógenos de humanos, como *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenémicos (CRKP) se ha reportado que KdgR participa en la represión de la expresión de *ompK26* el cual codifica una porina de la familia KdgM. Se plantea que OmpK26 participa en la atenuación de la virulencia y resistencia a carbapenémicos o bien en la patogénesis de *K. pneumoniae*, permitiendo que la bacteria se adapte y persista dentro del huésped (Ye *et al.*, 2022).

Por lo anterior, en el presente trabajo estudiamos el efecto de la proteína KdgR como posible regulador de la expresión de los genes de virulencia controlados por el activador PerA en EPEC.

### 3. Justificación

Las enfermedades diarreicas son un problema a nivel mundial, en países en vías de desarrollo, se ubican como la quinta causa de defunción provocando alrededor de 1.5 millones de decesos al año, de los cuales aproximadamente 444,000 son niños menores de 5 años. La diarrea tiene diferentes causas, pero con mayor frecuencia es originada por microorganismos bacterianos, virales y parasitarios. Entre los microorganismos bacterianos, EPEC es uno de los principales agentes etiológicos de diarrea en niños, sus principales determinantes genéticos de virulencia son la isla LEE y el pEAF. La expresión de los genes de virulencia está controlada por proteínas reguladoras que responden a los cambios ambientales, permitiendo que la bacteria sobreviva y responda al entorno en el que se encuentra. Una de estas proteínas reguladoras es PerA, un activador transcripcional de los genes *bfp* y *per* e indirectamente de genes de la isla LEE. El mecanismo que utiliza este regulador aún se encuentra bajo investigación, sin embargo, estudios en nuestro grupo de trabajo sugieren que la función de PerA es modulada por las interacciones que establece con otras proteínas en función de las condiciones ambientales. Una de estas proteínas candidatas es KdgR un regulador global de unión a ADN que modula la expresión de genes implicados en diversas vías metabólicas y en la modulación de los genes de virulencia en algunas enterobacterias. Por lo anterior, en este trabajo se evaluó el efecto de KdgR en la modulación de la expresión de las proteínas de virulencia que están controlados directa o indirectamente por PerA en EPEC. Los resultados obtenidos permitirán aportar una mayor comprensión en los mecanismos de regulación de los factores de virulencia en EPEC, así como el desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento y/o anti-virulencia contra esta bacteria.

## 4. Hipótesis

KdgR es un regulador negativo de la expresión de proteínas de virulencia reguladas directa e indirectamente por PerA en EPEC.

## 5. Objetivos

### 5.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de KdgR como modulador negativo de la expresión de proteínas de virulencia en EPEC

### 5.2 Objetivos específicos

1. Analizar mediante herramientas bioinformáticas la interacción proteína-proteína entre KdgR y PerA.
2. Diseñar oligonucleótidos para clonar *kdgR* en el vector pBAD/Myc-HisA.
3. Evaluar el efecto de la sobreexpresión de KdgR sobre las proteínas de virulencia de EPEC.
4. Analizar experimentalmente la interacción proteína-proteína entre KdgR y PerA mediante ensayos Pull-down.

## 6. Materiales y métodos

### 6.1 Análisis bioinformáticos

Para realizar los análisis bioinformáticos de la interacción entre KdgR y PerA, se buscaron sus secuencias primarias en formato FASTA en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), KdgR con ID: CAS09500.1 y PerA con ID: CAS07456.1. Además, con la finalidad de determinar la existencia del modelo tridimensional de las proteínas obtenido por cristalografía de rayos X, espectrometría de NMR (Nuclear Magnetic Resonance) o microscopía electrónica (EM), se consultó la base de datos PDB (Protein Data Bank). Posteriormente, para predecir la probabilidad de interacción entre KdgR y PerA se empleó el servidor PSOPIA (Prediction Server Of Protein-Protein Interactions), también se realizó la búsqueda de los posibles sitios de interacción entre ambas proteínas con ayuda del servidor iFrag (Protein-Protein Interface Prediction Server Based on Sequence Fragments). Asimismo, se calculó la afinidad de interacción entre ambas proteínas con ayuda del software PPA-Pred2 (Protein-Protein Affinity Predictor). Para complementar los análisis, se realizó la predicción del modelo tridimensional de ambas proteínas utilizando AlphaFold2. Finalmente, se generó un modelo tridimensional de la interacción entre KdgR y PerA usando los softwares, AlphaFoldColab2, ChimeraX versión 1.6 y PyMOL.

#### 6.1.1 Diseño de oligonucleótidos

Para realizar la clonación de *kdgR* en el vector pBAD-Myc/His A (tabla 4) se diseñaron los oligonucleótidos enlistados en la tabla 3, siguiendo lo descrito a continuación:

La secuencia nucleotídica de *kdgR* en EPEC E2348/69 O127:H6 se consultó en la base de datos NCBI y se obtuvo su secuencia primaria en formato FASTA (ver anexos, código GenBank: FM180568.1). Se diseñaron los oligonucleótidos delantero y reverso de forma manual y se verificaron con ayuda del software Serial Cloner versión 2.6. El oligonucleótido delantero introduce el sitio *Nco*I en el 5' del gen y el oligonucleótido reverso el sitio *Hind*III en el 3' del gen, generando un amplicón de 792 pb. Además, se calculó su temperatura de hibridación con ayuda

de la siguiente operación:  $2(A+T) + 4(C+G)$  y empleando el servidor Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator. Finalmente, se mandaron a sintetizar con la compañía T4 OLIGO.

Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo				
Nombre	Secuencia (5'-3')	Descripción		Referencia
KdgRfW	TAACCATGGCTAACGCA GATCTGG	Introduce el sitio <u>NcoI</u> en el 5' del gen <i>kdgR</i>	Amplifica el gen <i>kdgR</i>	Este estudio
KdgRrV	TCCAAGCTTTCAGAA CGGTAGTCGTGATAA C	Introduce el sitio <u>HindIII</u> en el 3' del gen <i>kdgR</i>		
pBAD-Fw	ATGCCATAGCATT ATCC	Amplificación de un fragmento de 304 pb del vector pBAD/Myc-HisA		(ThermoFisher)
pBAD-Rv	GATTTAATCTGTATCA GG			

Nota: el doble subrayado representa los sitios *NcoI* y *HindIII* que se introducen en *kdgR*.

## 6.2 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas utilizadas en el presente estudio se enumeran en la tabla 4.

Para el crecimiento de los cultivos bacterianos se utilizó medio Luria Bertani (LB) (peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%) o medio DME (glucosa 0.45%, L-glutamina 534 g/L, suplementado con 1% de LB), según fuera el caso. Cuando fue necesario, se suplementó con antibióticos en las siguientes concentraciones: ampicilina (Amp) 100 µg/mL; estreptomycin (Str) 100 µg/mL y kanamicina (Km) 30 µg/mL.

Los cultivos bacterianos se incubaron bajo agitación en una incubadora (GYROMAX 929, Amerex Instruments, Inc) a 37°C y 120-210 rpm.

Tabla 4: Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo		
Cepas	Descripción/Genotipo (G)	Fuente o referencia
<b>EPEC WT-E2348/69</b>	<i>E. coli</i> enteropatógena O127:H6, Str <sup>R</sup>	(Levine <i>et al.</i> , 1978)
<b><i>E. coli</i> BL21 (DE3)</b>	Cepa no patógena de <i>E. coli</i> , adecuada para la transformación, expresión y purificación de proteínas. Cepa de expresión T7 y deficiente de proteasas <i>Lon</i> y <i>OmpT</i> . G: <i>fhuA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHlo ΔEcoRI-B int:: (lacI::PlacUV5 :: T7 gene1) i21 Δnin5</i>	(New England, Biolabs)
<b><i>E. coli</i> DH5α</b>	Cepa no patógena de <i>E. coli</i> . G: <i>F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1</i>	(Woodcock <i>et al.</i> , 1989)
Plásmidos	Descripción	Fuente o referencia
<b>pBAD/Myc-HisA</b>	Vector optimizado para <i>E. coli</i> (pBR322 ori). Permite la expresión de proteínas nativas o de fusión con etiquetas de polihistidina (6XHis) y un epítotope <i>c-Myc</i> en el C-terminal. Contiene una región promotora <i>araBAD</i> , un sitio ATG y de multiclonación, una región de terminación de la transcripción <i>rrnB</i> , un ORF de ampicilina y <i>AraC</i> .	(ThermoFisher, Scientific)
<b>pMALT2</b>	Vector derivado de pMalC2xa con la fusión de MBP-PerA.	(Ibarra <i>et al.</i> , 2003)
<b>pBAD-KdgR-6XH</b>	Derivado del plásmido pBAD/Myc-His-A que codifica para KdgR-6XH bajo el control del promotor <i>araBAD</i> , entre los sitios <i>NcoI</i> y <i>HindIII</i> ; Amp <sup>R</sup> .	Este estudio

### 6.3 Extracción de ADN genómico y plasmídico

La extracción del ADN plasmídico se realizó con “Zyppy Plasmid Miniprep Kit” (Zymo Research), para lo cual, se cultivó la cepa portadora del plásmido de interés en 5 mL de medio LB a 37°C con 120 rpm por toda una noche. Posteriormente, se realizó el concentrado celular de los 5 mL del precultivo a 13000 rpm/ 1m, la pastilla celular resultante se resuspendió en 600 µL de H<sub>2</sub>O grado biología molecular, se le adicionaron 150 µL de Buffer de lisis 7X y se vortexeó por 2 min, hasta obtener una coloración azul claro. Una vez lisadas las células, se agregaron 350 µL de buffer de neutralización frío (4°C) y se mezcló por inversión hasta que la mezcla viró a color amarillo y se formó un precipitado. Posteriormente, se centrifugó a

13000 rpm/ 4 min. Se insertó la columna (zyzo-spin IIN) en el tubo de colección y el sobrenadante del paso anterior se transfirió a la columna y se centrifugó a 13000 rpm/ 1 min, se desechó el líquido del tubo de colección y se centrifugó nuevamente. A la columna se le agregaron 200  $\mu$ L de buffer endo-wash y se centrifugó a 13000 rpm/ 1 min posteriormente, la columna se lavó con 400  $\mu$ L de zippy wash buffer y se centrifugó dos veces a 13000 rpm/ 1 min. Se transfirió la columna a un tubo de 1.5 mL y se le agregaron 50  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O grado biología molecular (a 70°C), se incubó a 50°C/ 2 min, posteriormente se centrifugó a 10000 rpm/ 2 min y se recuperó la muestra. Para finalizar, el ADN plasmídico se visualizó en un gel de agarosa al 1% y se almacenó a -20°C.

La extracción del ADN total de EPEC WT se realizó según lo descrito por Miller *et al.*, (1988), para lo cual la cepa bacteriana se cultivó en 5 mL de medio LB con Str (100  $\mu$ g/mL), a 37°C con 120 rpm por toda una noche. Al día siguiente; las células se vortexearon y se concentraron a 13300 rpm/ 1 min a temperatura ambiente. La pastilla celular obtenida, se resuspendió en 570  $\mu$ L de buffer SET (20% sacarosa o glucosa, 50 mM Tris-HCL, pH 8.0, 50 mM EDTA) y 30  $\mu$ L de SDS al 20% (Dodecil sulfato Sódico), se vortexeó y se incubó a 80°C durante 5 min, se dejó enfriar a temperatura ambiente y posteriormente, se le adicionaron 200  $\mu$ L de NaCl 5M, se vortexeó durante 20 s (o hasta precipitar). A continuación, se incubó en hielo por 5 min y se centrifugó a 12000 rpm/ 15 min, el sobrenadante obtenido se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionaron 800  $\mu$ L de isopropanol, se vortexeó durante 1 min y posteriormente se centrifugó a 12000 rpm/ 25 min, la pastilla resultante se lavó 3 veces con 1 mL de etanol al 70% y el ADN obtenido se resuspendió con 150  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O libre de DNAasas. Finalmente, se visualizó en un gel de agarosa al 1% y se almacenó a -20°C.

#### 6.4 Electroforesis en gel de agarosa

Las muestras de ADN se mezclaron con buffer de carga (10mM Tris-HCL pH 7.6, 60% glicerol, 0.03% azul de bromofenol, 60mM EDTA) y se cargaron en geles de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (40mM Tris, 19mM ácido acético glacial, 1mM EDTA) y se separaron a 70-100 volts por 1-2 horas. Posteriormente los geles se

tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en un fotodocumentador de luz ultravioleta (ChemicDoc XRS, BIO-RAD).

### 6.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

*kdgR* se amplificó mediante la técnica convencional de PCR (Polymerase Chain Reaction), usando el reactivo: Dream Taq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific) al 1X, los oligonucleótidos a una concentración final de 0.3 mM y 1  $\mu$ L del ADN. Cada reacción fue preparada a un volumen final de 50  $\mu$ L y efectuadas en el termociclador Prime (Techne) por 35 ciclos durante 1 h y 40 min, con los componentes y condiciones indicados en la tabla 5.

El producto de amplificación por PCR se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se almacenó a -20°C.

**Tabla 5: Condiciones y componentes de PCR usadas en este trabajo**

Componentes de PCR		Condiciones de PCR			
Reactivo	Cantidad	Etapas	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Dream Taq Green PCR Master Mix (2X)	(1X) 25 $\mu$ L	Desnaturalización inicial	95°C	3 min	1
Oligo FW	[0.3 $\mu$ M]	Desnaturalización	95°C	30 s	35
Oligo RV	[0.3 $\mu$ M]	Alineamiento	60°C (T <sub>m</sub> del oligonucleótido)	1 min	
ADN	1 $\mu$ L	Extensión	72°C	1 min	
H <sub>2</sub> O	21.3 $\mu$ L	Extensión final	72°C	10 min	1
<b>Total</b>	50 $\mu$ L	<b>Total</b>	—	1 h y 40 min	

#### 6.5.1 Purificación de los productos de PCR

Para la purificación del producto de PCR se empleó el “Zymoclean gel DNA recovery kit” (Zymo Research). Para esto el producto de amplificación se separó en un gel de agarosa al 1%, y posteriormente se escindió la banda correspondiente al tamaño esperado, la cual se recuperó en un tubo de 1.5 mL. A la banda se le agregaron 300  $\mu$ L de ADB (Agarose Dissolving Buffer) y se incubó por 5 min a 55°C (hasta que la mezcla se homogenizó), vortexeando constantemente. Posteriormente, la mezcla se transfirió a la columna insertada en el tubo de colección, se centrifugó a 13000 rpm/ 30 s, se descartaron los residuos del tubo

de colección y a la columna se le agregaron 200  $\mu\text{L}$  de Buffer de lavado, se centrifugó a 12000 rpm/ 30 s, se desechó el buffer residual y se repitió este proceso nuevamente. Para finalizar, la columna se transfirió a un tubo de 1.5 mL y se agregaron 80  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  grado biología molecular, se dejó incubando por 5 min a  $55^\circ\text{C}$ , se centrifugó a 13000 rpm/1 min y se recuperó la muestra purificada. El producto purificado se corroboró con ayuda de un gel de agarosa al 1% y se almacenó a  $-20^\circ\text{C}$ .

### 6.6 Clonación de *kdgR*

Posterior a la extracción y purificación del plásmido, así como la amplificación y purificación del inserto, se construyó el plásmido pBAD-KdgREP.

Se prepararon reacciones para la digestión del plásmido y el inserto con las enzimas de digestión rápida para *NcoI* y *HindIII* (Thermo Fisher Scientific) las cuales, se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  por una noche, con los componentes enlistados en la tabla 6.

Las reacciones se visualizaron en un gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

Tabla 6: Componentes del proceso de digestión		
	PCR	Plásmido
Reactivo	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )	Cantidad ( $\mu\text{L}$ )
ADN	30	40
Buffer 10X	3.5	5
$\text{H}_2\text{O}$	0.5	4
Enzima ( <i>NcoI</i> )	0.5	0.5
Enzima ( <i>HindIII</i> )	0.5	0.5
Total	35	50

Posteriormente, ambos productos digeridos se purificaron empleando el “Silica Bead DNA gel extraction kit” (Zymo Research). Para ello, el producto de amplificación se separó en un gel de agarosa al 1% y posteriormente se escindió la banda correspondiente al tamaño esperado, la cual se recuperó en un tubo de 1.5 mL. A la banda se le agregaron 150  $\mu\text{L}$  de Binding Buffer y se incorporó por inversión. A continuación, se adiciono 5  $\mu\text{L}$  de Silica Powder Suspension, se resuspendió por inversión, se incubó por 15 min a  $55^\circ\text{C}$ , vortexeando

constantemente posteriormente, se centrifugó a 12000 rpm/ 1 min y se descartó el sobrenadante. A continuación, a la pastilla se le agregaron 500 µL de washing buffer frío y se resuspendió con ayuda de una micropipeta y se centrifugo a 10000 rpm/5 s, se descartó el sobrenadante y se repitió este procedimiento 2 veces más, se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente (hasta que el etanol se evaporó). Se resuspendió la pastilla en 50 µL de H<sub>2</sub>O grado biología molecular (a 55°C), se incubó por 5 min a 55°C, se centrifugó a 12000 rpm/ 1 min y se recuperó la muestra purificada. El producto purificado se corroboró con ayuda de un gel de agarosa al 1% y se almacenó a -20°C.

Finalmente se realizó la reacción de ligación del vector con los productos de PCR digeridos y purificados empleando la T4 DNA ligasa y su Buffer (10X) (Thermo Fisher Scientific) utilizando los componentes y cantidades descritos en la tabla 7. La reacción se incubo a 4°C por toda una noche, para posteriormente almacenarse a -20°C hasta su uso.

**Tabla 7: Componentes y cantidades del proceso de ligación**

Reactivo	Cantidad (µL)
Vector	6
Inserto (PCR)	2
T4 DNA Ligase	1
Buffer 10X	1
Total	10

### 6.6.1 Transformación por electroporación

Para la transformación de la cepa de interés se generaron las células químicamente competentes, según se describe a continuación: la cepa *E. coli* requerida se incubo en 5 mL de LB a 37°C con 120 rpm, por toda una noche. Pasado el tiempo, el cultivo fue inoculado en una proporción 1:100 en 100 mL de medio LB, complementado con Amp (100 µg/mL) a 37°C a 210 rpm hasta llegar una D.O<sub>600</sub> de 0.6. Pasado el tiempo, se incubó en hielo por 10 minutos, se centrifugó a 6000 rpm/ 15 min a 4°C y se desechó el sobrenadante. A la pastilla celular resultante se le agregaron 150 mL de H<sub>2</sub>O grado biología molecular fría y estéril, se centrifugó a 6000 rpm/ 10 min a 4°C y se desechó el sobrenadante.

Posteriormente se agregaron 20 mL de glicerol al 10%, se centrifugó a 6000 rpm/15 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con 1 mL de glicerol al 10%. Se hicieron alícuotas de 70 µL y se almacenaron a -70°C. Finalmente, las células químicamente competentes se transformaron por electroporación, según se describe a continuación: 70 µL de las células competentes se pasaron a una cubeta de choque frío estéril (previamente enfriada) y se les adiciono 1 o 2 µL de ADN plasmídico, la cubeta de choque frío se colocó en el electroporador (ECM830, BTX) y se le dio un pulso de 2.5 kv-2000 hms-25 µF (12.5 kv/cm). Inmediatamente, se adicionó 1 mL de medio SOC (Super Optimal Broth) (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub> y 20 mM glucosa) y se incubó a 37°C por 1 h con 120 rpm. Pasado el tiempo se concentraron las células bacterianas mediante centrifugación a 13000 rpm /5 min y se les retiró 800 µL del sobrenadante, los 200 µL restantes se mezclaron con ayuda de una pipeta, se plaquearon en una placa con agar LB complementada con Amp (100 µg/mL) y se incubaron a 37°C por una noche.

### 6.6.2 PCR de colonia

Para confirmar la clonación de la cepa de interés se realizaron dos reacciones de PCR con diferentes oligonucleótidos (1.- pBAD-Fw y pBAD-Rv. 2.-pBAD-Fw y KdgRRV) (tabla 3).

Se picaron colonias al azar con la finalidad de inocular una colonia en un tubo con la reacción de PCR, la cual contenía el reactivo Dream Taq Green PCR Master Mix (2X) (Thermo Fisher Scientific) al 1X y los oligonucleótidos anteriormente señalados a una concentración final de 0.3 mM. Cada reacción fue preparada a un volumen final de 20 µL y 15 µL respectivamente y efectuadas en el termociclador Prime (Techne) por 42 ciclos durante 2 h y 30 min, con los componentes y condiciones indicados en la tabla 8. Los productos de amplificación obtenidos por PCR se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio y las clonas que amplificaron el fragmento del tamaño esperado fueron almacenadas a -80°C.

Tabla 8: Condiciones y componentes de PCR de colonia usadas en este trabajo					
<b>Componentes de PCR con pBAD-Fw y pBAD-Rv</b>		<b>Condiciones de PCR con pBAD-Fw y pBAD-Rv</b>			
Reactivo	Cantidad	Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Dream Taq Green PCR Master Mix (2X)	(1X) 10 µL	Desnaturalización inicial	95°C	10 min	1
Oligo FW	[0.3 µM]	Desnaturalización	95°C	30 s	40
Oligo RV	[0.3 µM]	Alineamiento	50°C (T <sub>m</sub> del oligonucleótido)	1 min	
H <sub>2</sub> O	9 µL	Extensión	72°C	1 min	
Total	20 µL	Extensión final	72°C	10 min	1
		Total	—	2 h y 30 min	42
<b>Componentes de PCR con pBAD-Fw y KdgRRV</b>		<b>Condiciones de PCR con pBAD-Fw y KdgRRV</b>			
Reactivo	Cantidad	Etapa	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Dream Taq Green PCR Master Mix (2X)	(1X) 7.5 µL	Desnaturalización inicial	95°C	10 min	1
Oligo FW	[0.3 µM]	Desnaturalización	95°C	30 s	40
Oligo RV	[0.3 µM]	Alineamiento	56°C (T <sub>m</sub> del oligonucleótido)	1 min	
H <sub>2</sub> O	6.68 µL	Extensión	72°C	1 min	
Total	15 µL	Extensión final	72°C	10 min	1
		Total	—	2 h y 30 min	42

### 6.6.2.1 Sobreexpresión de KdgR-6XH

Para caracterizar si KdgR se encontraba en fase con la etiqueta de polihistidinas, se expresaba correctamente y a su vez poder determinar la concentración a la que mejor se expresaba, la cepa *E. coli* DH5α con pBAD-KdgREP se incubó en 3 mL de medio LB suplementado con Amp (100 µg/mL) a 37°C con 120 rpm por toda una noche. El cultivo de toda la noche se inoculó en una proporción de 1:100 en 5 mL de medio LB suplementado con Amp (100 µg/mL) y se incubó a 37°C con 200 rpm/ 1 h o hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.5, transcurrido el tiempo se le agregó arabinosa al 0.2%, 0.02% y 0.002% e incubó a 37°C con 200 rpm/ 4 h. Posteriormente se recuperaron todas las células mediante centrifugación a 6000

rpm/5 min a 4°C. La pastilla celular resultante se resuspendió en 500 µL de urea 8 M y se sónico por 10 min con pulsos de 1 min por 5 s de descansos. Posteriormente, se tomaron 20 µL de la muestra y se les adiciono 8 µL de sample buffer protein (Thermo Fisher Scientific) (50% glicerol, 4% SDS, 10 β-mercaptoetanol, 0.5M Tris.HCl pH 6.8, azul de bromuro y H<sub>2</sub>O), se vortexeo hasta obtener una coloración azul y se hirvió por 10 min. El extracto total fue separado y visualizados en un gel SDS-Page al 12% (Sodium-Duodecyl-Sulfate polyacrilamide gel electrophoresis) teñido con azul de coomassie y procesado para western blot usando la sonda His Probe HRP (Thermo Fisher Scientific), para identificar la etiqueta de polihistidinas.

### 6.7 Purificación de KdgR-6XH

Previamente, el plásmido pBAD-KdgREP se introdujo por electroporación en la cepa *E. coli* BL21, la cepa resultante se cultivó en 5 mL de LB con Amp (100 µg/mL) a 37°C con 120 rpm durante toda una noche. Pasado el tiempo, se incubó en una proporción de 1:100 en 250 mL de medio LB suplementado con Amp (100 µg/mL) y a 37°C con 200 rpm. Cuando el cultivo alcanzó una DO<sub>600</sub> de 0.5, se indujo con arabinosa al 0.2% y se incubó a 30°C con 200 rpm/ 4 h. Se recuperaron las células por centrifugación a 6000 rpm/25 min a 4°C, se resuspendieron en 5 mL de PBS 1X y se lisaron por sonicación en pulsos de 5 min por 3 s de descanso, se hicieron alícuotas de 1 mL y se almacenaron a -20°C. Finalmente, el extracto total fue separado y visualizado en un gel SDS-Page al 12%, teñido con azul de coomassie. La purificación de KdgR-6XH en condiciones nativas se realizó empleando Agarosa Ni-NTA (QIAGEN). Para esto, 5 mL del extracto total de la sobreexpresión de KdgR-6XH fueron puestos a interactuar con 3 mL de agarosa Ni-NTA (QIAGEN) (previamente lavada y resuspendida en 3 mL PBS 1X) a temperatura ambiente en un agitador orbital (Thermo Fisher Scientific) con 50 rpm durante 3 h. Pasado el tiempo se transfirió a una columna y posteriormente, se lavó con 15 mL de PBS 1X. A continuación, se realizó la elución de la proteína unida a la agarosa Ni-NTA (QIAGEN) con 10 mL de Imidazol (0.5 M) y se realizó un último lavado con 5 mL de PBS 1X. Las fracciones concentradas se alicuotaron y almacenaron a -20°C.

Posteriormente, se procesaron 20  $\mu\text{L}$  de la proteína sobrepresada y cada una de las fracciones para su análisis y visualización en SDS-Page al 12%.

### 6.8 Sobreexpresión de la proteína MBP-PerA

Previamente el plásmido pMALT2 se introdujo por electroporación en la cepa *E. coli* BL21, la cepa resultante se cultivó en 5 mL de LB con Str (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a 37°C con 120 rpm durante toda una noche. Pasado el tiempo, el cultivo se incubó en una proporción 1:100 en 250 mL de medio DMEM, suplementado con Str (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a 37°C con 200 rpm. Cuando el cultivo alcanzo una  $\text{DO}_{600}$  de 0.4, se agregó 0.3 mM de IPTG (isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranósido) y nuevamente se incubó a 30°C con 200 rpm/ 4 h, pasado el tiempo, los cultivos se pasaron a tubos de 50 mL y se centrifugaron a 6000 rpm/ 20 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y cada pastilla celular se resuspendió en 3 mL de buffer ice-cold column (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ -mercaptoethanol). Finalmente, las células se lisaron por sonicación en rondas de 3 min por 3 s de descansos. Los resultados separaron y visualizaron con ayuda de un gel SDS-PAGE al 15% y se almacenaron a -20°C.

### 6.9 Interacción MBP-PerA y KdgR-6XH por Pull-down

220  $\mu\text{L}$  de perlas magnéticas de agarosa Ni-NTA (QIAGEN) fueron concentradas y lavadas con PBS 1X en una gradilla magnética. Posteriormente en 4 tubos diferentes (tubo 1-4) se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de las perlas Ni-NTA (QIAGEN), y a cada tubo se le adicionaron: 1) 200  $\mu\text{L}$  de Buffer, 2) 300  $\mu\text{L}$  de MBP purificada, 3) 400  $\mu\text{L}$  del extracto total de la inducción de MBP-PerA y 4) 400  $\mu\text{L}$  del extracto total la inducción de KdgR. Posteriormente, se dejaron interactuar por 2 h a 4°C con 40 rpm en un agitador orbital (Thermo Fisher Scientific), pasado el tiempo se lavaron 10 veces con 200  $\mu\text{L}$  de buffer ice-cold. A continuación, se les adicionó 300  $\mu\text{L}$  del extracto total obtenido de la inducción de KdgR-6XH y se dejaron interactuar por 4 h a 4°C con 40 rpm en un agitador orbital (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente se les realizaron 10 lavados con 200  $\mu\text{L}$  de PBS 1X y finalmente las resinas con el complejo proteico se resuspendieron en 70  $\mu\text{L}$  de sample buffer proteín, se hirvieron por 10 min y se guardaron a -20°C. Las interacciones proteína-

proteína se visualizaron y separaron con ayuda de un gel SDS-Page al 12% teñido con azul de comassie y western blot.

## 6.10 Perfil de proteínas secretadas

Las cepas bacterianas se cultivaron en placas con agar LB con los antibióticos requeridos, de este cultivo una colonia se inoculó en 5 mL de medio LB suplementado con los antibióticos requeridos y se incubó por toda una noche a 37°C con 120 rpm. El cultivo de toda la noche se inoculó en una proporción 1:100 en 50 mL de medio DME suplementado con 1 mL de medio LB y su respectivo antibiótico, se incubó a 37°C con 220 rpm hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 1.2, o hasta tornarse rosáceo, posteriormente se recolectaron 1.5 mL del cultivo por triplicado y se centrifugó a 14000 rpm/ 5 min, mientras que la pastilla resultante se almaceno a -20°C. Al sobrenadante se le agregó 160 µL de ácido tricloroacético al 100%, se mezcló por inversión hasta tornarse naranja y se almacenó a 4°C por toda una noche. Posteriormente, se centrifugó a 13,300 rpm/ 40 min, se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 10 µL de sample buffer protein y de ser necesario se le agregó  $\geq 3$  µL de Tris pH 11 hasta que se tornara azul. Se vortexeo y se dejó reposando por 15 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12000 rpm/ 5 s y se hirvió por 10 min. Finalmente, las proteínas secretadas se separaron por SDS-PAGE al 12% y se visualizaron por tinción con azul de coomassie.

### 6.10.1 Western Blot

Para la detección de las proteínas de interés, las alícuotas de los extractos totales de las inducciones proteicas se prepararon para su separación en un gel de poliacrilamida al 12% o 15% en condiciones desnaturalizantes según fuera requerido. Posteriormente, se realizó la transferencia a una membrana de PVDF (Polyvinylidene Difluoride) con poros de 0.45 µm en una cámara transblot SD (semi dry transfer cell) (BIO-RAD) durante 1 h a 15 V. Una vez completada la transferencia, la membrana de PVDF se tiño con rojo de ponceau 1X hasta que se distinguieran las bandas transferidas y se lavó 3 veces con 20 mL de TBS-T (Tris HCl 1M pH 7.5, NaCl 5 M, Tween 20 0.1%) por 10 min, cada ronda. La membrana se bloqueó e incubó con 20 mL de leche descremada al 10% en buffer TBS-T

durante toda una noche a 4°C. Posteriormente, se lavó 3 veces con 20 mL de TBS-T por 10 min cada ronda y se incubó con 20 mL de alguno de los siguientes anticuerpos primarios:  $\alpha$ -MBP (Laboratorio de Biología Molecular, CBD) con una dilución de 1:20,000,  $\alpha$ -BfpA (Jorge Girón: Universidad de Virginia EUA) con una dilución 1:10,000, o en su defecto con una sonda His probe HRP (Thermo Fisher Scientific) a una dilución de 1:5000; por 2 h con 40 rpm en un agitador orbital (Thermo Fisher Scientific) a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se retiró el Ac y se lavó 3 veces con 20 mL de TBS-T por 10 min cada ronda. Cuando fue necesario, se incubó con una dilución de 1:10,000 del anticuerpo secundario  $\alpha$ -conejo (Pierce) durante 40 min con 40 rpm en un agitador orbital (Thermo Fisher Scientific), transcurrido el tiempo se realizó una segunda ronda de lavados con 20 mL de TBS-T. Finalmente, se reveló la membrana previamente tratada con luminol (500  $\mu$ L) y tampón de sustrato de peróxido estable (500  $\mu$ L) (Thermo Fisher Scientific). El revelado se hizo con ayuda de soluciones de revelado (solución reveladora y fijadora) (Carestream DENTAL), en un cuarto oscuro, expuesto a películas fotográficas (Kodak) a diferentes tiempos y en un fotodocumentador (BIO-RAD Gel Doc XRT), expuesto a una fuente de luz epi white.

## 7. Resultados

### 7.1 Análisis bioinformáticos

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

Con la finalidad de determinar el efecto de KdgR sobre la expresión de las proteínas de virulencia de EPEC que son reguladas directa o indirectamente por PerA, se hicieron una serie de análisis bioinformáticos; en primera instancia se consultó la base de datos del NCBI y se extrajeron las secuencias aminoacídicas de KdgR y PerA, así como su formato FASTA correspondiente, ambos obtenidos del genoma de *E. coli* 0127:H6 str. E2348/69. KdgR se encuentra en el cromosoma con ID: CAS09500.1 y PerA se encuentra en el pEAF de EPEC con ID: CAS07456.1. Una vez obtenidas ambas secuencias se inició el análisis *in silico* de la probabilidad de interacción entre ambas proteínas con ayuda del servidor PSOPIA, el cual predice las interacciones entre dos proteínas de estructura desconocida usando estimadores de dependencia promedio o AODE (Averaged One-Dependence Estimators) y basándose en los siguientes 4 parámetros: I) Fseq: una puntuación predicha utilizando solo información de similitudes de secuencia de interacciones proteicas ya demostradas experimentalmente, II) Sdom: una puntuación predicha utilizando solo información de predisposiciones estadísticas de interacciones dominio-dominio, III) Snet: una puntuación predicha utilizando los pesos y la distancia de interacción molecular más corta entre ambas proteínas, comparadas con sus posibles homólogos y IV) ALL: una puntuación promedio de las tres características antes mencionadas. Los resultados se muestran como puntuaciones de probabilidad del 0 al 1.0, siendo 1.0 la mayor probabilidad de interacción proteína-proteína (Murakmai y Mizuguchi, 2013).

Los resultados obtenidos se encuentran enlistados en la Tabla 9. Para la probabilidad de interacción entre KdgR y PerA, PSOPIA predijo un valor Fseq de 0.3613 y un valor promedio de 0.3613. Estos resultados permiten interpretar que nuestras proteínas de interés tienen una alta probabilidad de interacción. Adicionalmente, se introdujeron dos controles; un control positivo y un control negativo con el fin de comparar y verificar los resultados. Como control positivo se usaron a dos subunidades de la RNAP de *E. coli*; la subunidad  $\beta$  y la subunidad  $\alpha$ ,

cuya interacción ya ha sido explicada y demostrada experimentalmente (Sutherland y Murakami, 2018). Los resultados arrojados por PISOPIA, respaldan las pruebas experimentales al obtenerse valores  $F_{seq}$  de 0.3807 y  $F_{dom}$  de 0.9851, así como un valor promedio de 0.9462. Por el contrario, como control negativo se usaron dos proteínas cuya interacción no ha sido demostrada y sus funciones difieren una de la otra, siendo a la enolasa 1 (ENO I), una enzima que cataliza la conversión de 2-fosfoglicerato en fosfoenolpiruvato y regula el metabolismo de glucólisis y otros procesos fisiológicos; y la porina OmpF, una proteína de membrana externa de EPEC, las proteínas seleccionadas. El resultado obtenido de dicha interacción fueron valores iguales a 0, es decir una nula probabilidad de interacción (Gao *et al.*, 2025; Elías-López *et al.*, 2024; Belousov *et al.*, 2023).

**Tabla 9: Predicción *in silico* de la interacción entre KdgR y PerA**

GenBank	Proteína 1	Proteína 2	$F_{seq}^*$	$F_{dom}^*$	$F_{net}^*$	All*	
Sec* P1: CAS11842.1	Subunidad $\beta$ de la RNA polimerasa	Subunidad $\sigma$ RNA polimerasa	0.3807	0.9851	0.0000	0.9462	Control positivo
Sec P2: CAS11106.1							
Sec P1: CAS10594.1	ENO I	OmpF	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	Control negativo
Sec P2: CAS08470.1							
Sec P1: CAS09500.1	KdgR	PerA	0.3613	0.0000	0.0000	0.3613	
Sec P2: CAS07456.1							

\* $F_{seq}$ : una puntuación predicha utilizando solo información de similitudes de secuencia de interacciones proteicas ya demostradas experimentalmente.

\* $F_{dom}$ : una puntuación predicha utilizando solo información de predisposiciones estadísticas de interacciones dominio-dominio.

\* $F_{net}$ : una puntuación predicha utilizando los pesos y la distancia de interacción molecular más corta entre ambas proteínas, comparadas con sus posibles homólogos.

\*All: promedio de  $F_{seq}$ ,  $F_{dom}$  y  $F_{net}$

\*Sec: secuencia

Obtenido de PSOPIA (Prediction Server of Protein-Protein Interactions).

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

Para evaluar los posibles sitios de interacción en nuestras proteínas de interés se empleó el servidor web iFrag, una herramienta de predicción de sitios de unión proteína- proteína que se basa en la búsqueda de la similitud de fragmentos de secuencias mínimas entre un par de proteínas con secuencias de interacciones proteína-proteína demostradas experimentalmente. Este servidor compara las proteínas analizadas mediante BLAST contra secuencias de proteínas cuyas interacciones ya han sido reportadas. Aquí los múltiples alineamientos requieren del uso de analizadores de bases de datos como BIANA (Biotic Interactions and Network Analysis), que ayudan a predecir las posibles regiones de unión entre las dos proteínas. Los resultados obtenidos se muestran como mapas de calor, donde los píxeles color blanco indican los contactos reales encontrados entre las dos proteínas, los píxeles color azul indica las puntuaciones bajas de iFrag y, por el contrario, los píxeles color rojo indica las puntuaciones altas. Las secuencias de las proteínas se resaltan conforme se navega en el mapa de calor (Oliva, 2023).

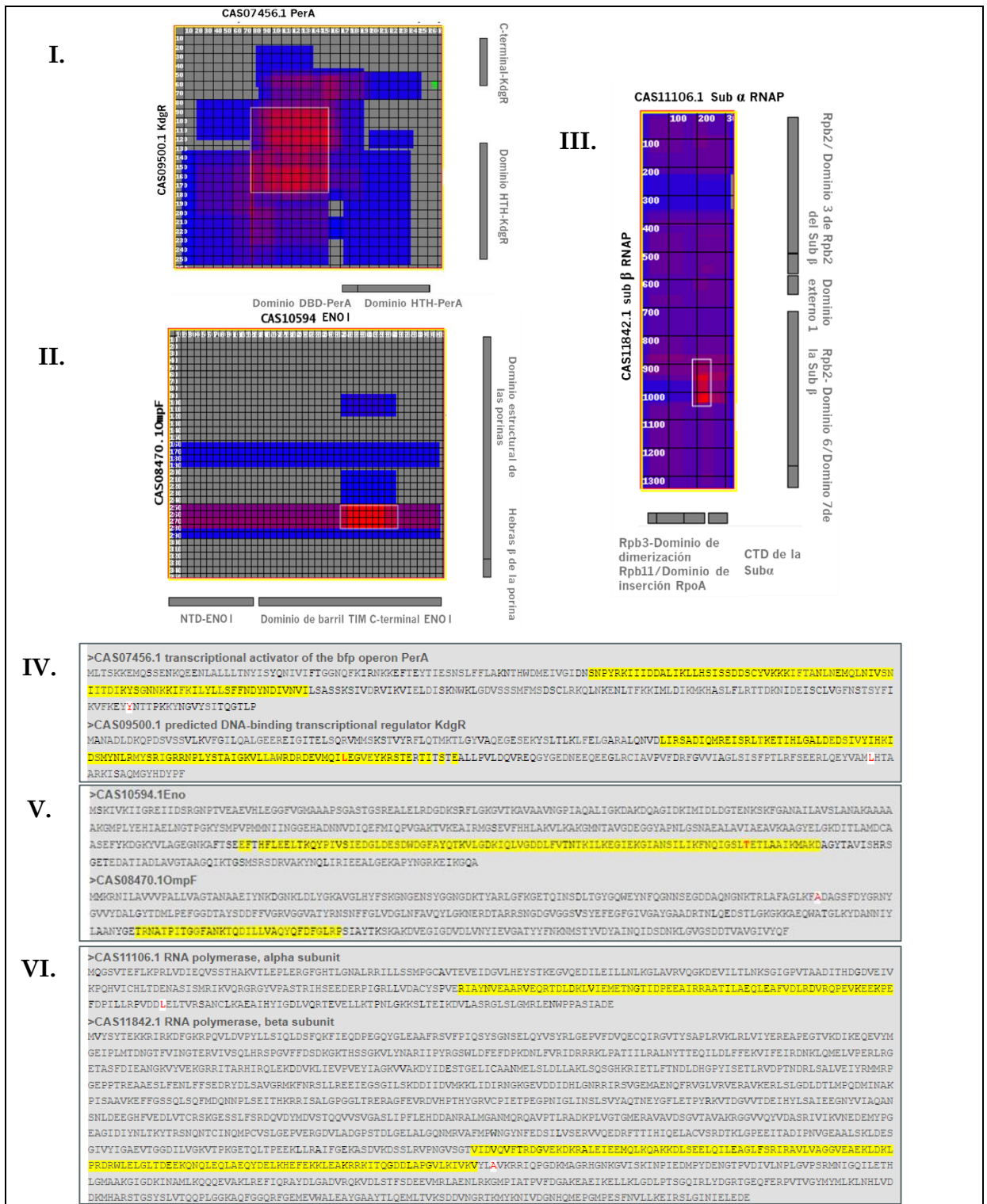


Figura 5: Búsqueda de posibles sitios de interacción.

I) Mapa de calor de los posibles sitios de interacción entre KdgR y PerA. II) Mapa de calor de los posibles sitios de interacción entre OmpF y ENO I (control negativo). III) Mapa de calor de los posibles sitios de interacción entre la subunidad  $\beta$  y  $\alpha$  de la RNAP (control positivo). IV) Secuencia PerA y KdgR. V) Secuencia ENO I y OmpF. VI) Secuencia de la subunidad  $\beta$  y  $\alpha$  de la RNAP. Los resultados obtenidos se muestran como mapas de calor; donde los píxeles color blancos indican los contactos reales encontrados entre las dos proteínas, los píxeles color azul indica las puntuaciones bajas de iFrag y, por el contrario, los píxeles color rojo indica las puntuaciones altas. Las barras grises laterales e inferiores representan los dominios característicos de las familias. Las secuencias de las proteínas se resaltan con color amarillo conforme se navega en el mapa de calor y se encuentran representados en IV-VI (obtenido y modificado de iFrag, 2011).

Los resultados obtenidos de este análisis se muestran en la figura 5

Para la interacción entre KdgR y PerA (figura 5. I) se obtuvo que los posibles sitios de interacción para PerA se encuentran entre la serina 78 (S78) y la leucina 158 (L158), que forman parte del final del dominio N-terminal (residuos 1-160) de PerA (Ibarra *et al.*, 2013).

En KdgR se encuentran entre la leucina 89 (L89) y al ácido glutámico 181 (E181), que forman parte del final del dominio HTH en el extremo NTD y el inicio del dominio CTD de KdgR (figura 5. IV) (Reverchon *et al.*, 1991).

Para el control positivo y negativo, se encontró que el posible sitio de interacción en la subunidad  $\alpha$  con la subunidad  $\beta$  de la ARNP (figura 5. III y 5. VI) se encuentra entre las posiciones R182 (Arginina 182) y E248 (Ácido glutámico 248), mientras que para la subunidad  $\beta$  se encuentra entre las posiciones V1052 (Valina 1052) y V928 (Valina 928). Curiosamente, para nuestro control negativo (figura 5. II y 5. V) se encontraron posibles sitios de interacción, lo que da pauta a nuevas investigaciones, sin embargo, estos resultados pueden ser a causa de la programación del servidor, que busca los posibles sitios de unión proteína-proteína, usando analizadores de bases de datos, descartando la posibilidad de que no exista dicha interacción (García-García *et al.*, 2010). Cabe mencionar que se realizaron múltiples análisis de interacciones proteína-proteína las cuales no contaban con registros de interacción y con funciones que diferían, sin embargo, estas arrojaron resultados similares, reforzando la hipótesis anteriormente propuesta (datos no mostrados).

### 7.1.3 Estimación de la afinidad entre KdgR y PerA

Para estimar la afinidad entre nuestras proteínas de interés, se empleó el servidor PPA-Pred2, el cual predice la afinidad de unión de complejos proteína-proteína mediante una metodología basada en: la clasificación funcional y criterios de refinamiento que implican el análisis estadístico de los modelos de afinidad predichos para cada complejo proteína- proteína. El servidor predice la afinidad de unión de un complejo a partir de: la secuencia de aminoácidos, función, peso molecular, porcentaje de residuos en el sitio de unión, sus propiedades estructurales y la afinidad de unión. Los resultados obtenidos se muestran en: I) energía libre de

Gibbs ( $\Delta G$ ), basándose en el principio termodinámico de que toda secuencia, estructura e interacción tiene  $\Delta G$ ; donde un valor alejado de 0 indica una interacción favorecida energéticamente; y II) la constante de disociación o  $K_d$ , una medida de equilibrio y/o afinidad entre la enzima y el sustrato, donde los valores negativos indican un mayor equilibrio (Keegan *et al.*, 2021; Morales-Rodriguez, 2012; Yugandhar y Gromiha, 2015, 2014; Lineweaver y Burk, 1934).

Los resultados obtenidos de estos análisis se muestran en la tabla 10.

Entre la interacción de KdgR y PerA se obtuvo una  $\Delta G$  de -9.38 kcal/mol y una  $K_d$  de  $1.31e^{-07}M$ , que indican una unión relativamente estable y energéticamente favorable coincidiendo con los valores obtenidos en interacciones ya demostradas como lo es la interacción entre la subunidad  $\beta$  y  $\alpha$  de la RNAP (control positivo) que presenta una  $\Delta G$  de -12.3 kcal/mol y una  $K_d$  de  $1.50e^{-09}M$ . Para la interacción entre ENO I y OmpF, se obtuvo una  $\Delta G$  de -7.53 kcal/mol y una  $K_d$  de  $3.00e^{-06}M$ , valores menores en comparación con las interacciones anteriores, pero que sugieren una baja probabilidad de interacción.

Tabla 10: Estimación <i>in silico</i> de la afinidad entre KdgR y PerA				
Proteína 1	Proteína 2	$\Delta G$ *	$K_d$ *	
Subunidad $\beta$ de la RNA polimerasa	Subunidad $\sigma$ RNA polimerasa	-12.3 kcal/mol	$1.50e^{-09}M$	Control positivo
Enol	OmpF	-7.53 kcal/mol	$3.00e^{-06}M$	Control negativo
KdgR	PerA	-9.38 kcal/mol	$1.31e^{-07}M$	

\* $\Delta G$ : energía libre de Gibbs

\* $K_d$ : constante de disociación

Realizado y obtenido de PPA-Pred2.

#### 7.1.4 Predicción de las estructuras terciarias de KdgR y PerA

Con la finalidad de familiarizarnos con las estructuras terciarias de las proteínas y así poder determinar su interacción tridimensional con mayor aproximación a la realidad, se hizo el modelado tridimensional de ambas proteínas empleando el servidor AlphaFold2 (AF2).

AF2 predice la estructura de las proteínas basándose en proteínas homólogas y alineaciones de secuencias múltiples, emplea AI (Artificial Intelligence) y algoritmos ML (Machine Learning) que finalmente permiten la generación de estructuras proteicas a partir de secuencias de aminoácidos (Mirdita *et al.*, 2022; Yang *et al.*, 2005).

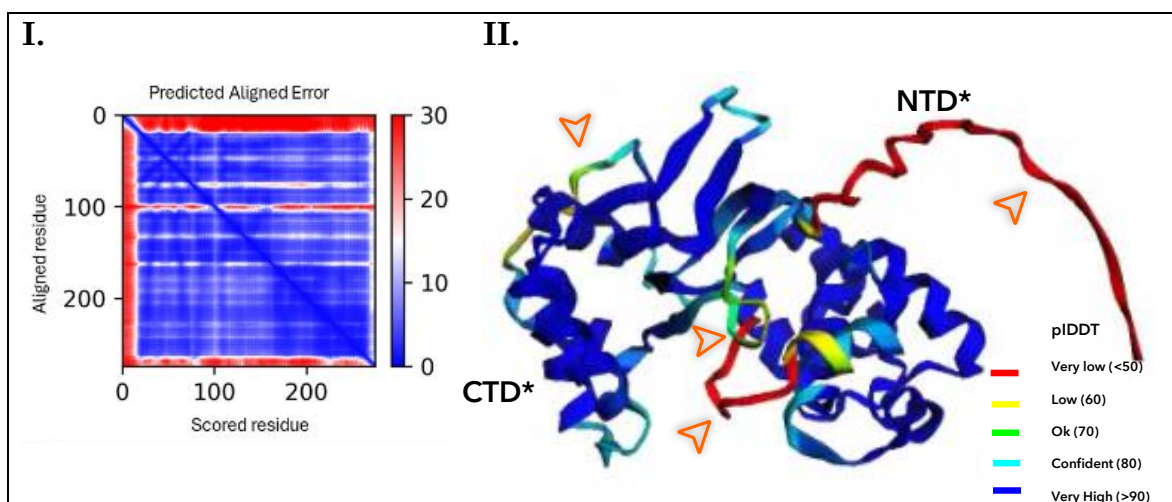
AF2 proporcionan los resultados principalmente como: un modelo tridimensional con un mapa de color pLDDT (prueba de diferencia de distancia local predicha) y métricas de confianza conocidas como error de alineamiento predicho (PAE). (Lin *et al.*, 2022; Mirdita *et al.*, 2022). pLDDT, es una medida de confianza local por residuo que tiene una escala del 0 al 100, donde 100 representa la puntuación más alta que indica confianza y precisión en el modelo resultante. Generalmente utiliza colores por cada residuo, siendo el color rojo el que representa a un pLDDT menor a 50, el color amarillo un pLDDT igual a 60, el color verde un pLDDT igual a 70, el color azul claro un pLDDT igual a 80 y el color azul fuerte un pLDDT mayor a 90 (Magana Gomez y Kovalevskiy, 2024; Varadi *et al.*, 2022).

PAE es una medida de confianza que indica si la posición, distribución y ubicación relativa de los dominios en la estructura predicha es correcta. El gráfico PAE se mide en Ångströms (Å) y es representada como un mosaico azul oscuro en regiones de alta confianza (puntuación  $\leq 10$  Å) y blanco y/o rojo en regiones de baja confianza (puntuación alta  $\geq 20$  o  $30$  Å) (Elfmann y Stülke, 2023; Magana Gomez y Kovalevskiy, 2024; Varadi *et al.*, 2022; Jumper *et al.*, 2021).

Los resultados obtenidos de los análisis con AF2 para este trabajo se muestran en las figuras 6 y 7.

El PAE resultante de PerA (figura 6. I) señala una confianza en el empaquetamiento y posición relativamente altos del dominio N-terminal con excepción de los residuos entre las posiciones M1 y A21, que indican ser menos confiables, ya que podemos observar un mosaico de color rojo y blanco. Para el dominio CTD de PerA, AF2

muestra una confianza en el empaquetamiento y posición relativamente alto, con excepción del extremo final del CTD entre los residuos Y266 y P274, los cuales muestran un mosaico color rojo y blanco. Mientras que la pLDDT en el modelo 3D de la predicción de AF2 para PerA (figura 6. II) revela niveles de confianza altos con valores mayores a 90 en casi toda la proteína, con excepción de las posiciones N264 y P274 del CTD, que presentan una pLDDT de entre 50 y 60. Otra excepción se presenta al inicio del NTD entre las posiciones M1 y L21, que muestran valores de confianza de entre 50 y 60. Curiosamente, donde se encuentren los bucles y giros de la proteína entre las posiciones G74- Y81, S98-K106, K130-N134 y K164-S160, se revelan valores de pLDDT menores de 70 que indican una menor confiabilidad (Magana Gomez y Kovalevskiy, 2024; Marks, 2015; Ibarra *et al.*, 2013).

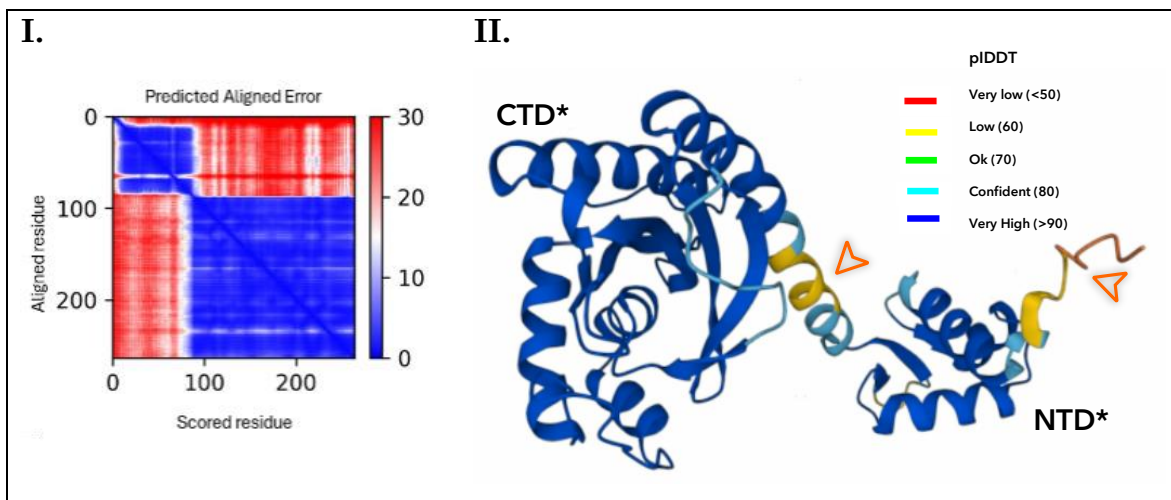


**Figura 6: Modelado 3D de PerA obtenido con AlphaFold2.**

I) Predicted Aligned Error. II) Modelo con mapa de color pLDDT, donde los pLDDT menores a 70 se encuentran señalados con una flecha con contorno naranja. \*CTD: Dominio C-terminal, NTD: Dominio N-Terminal

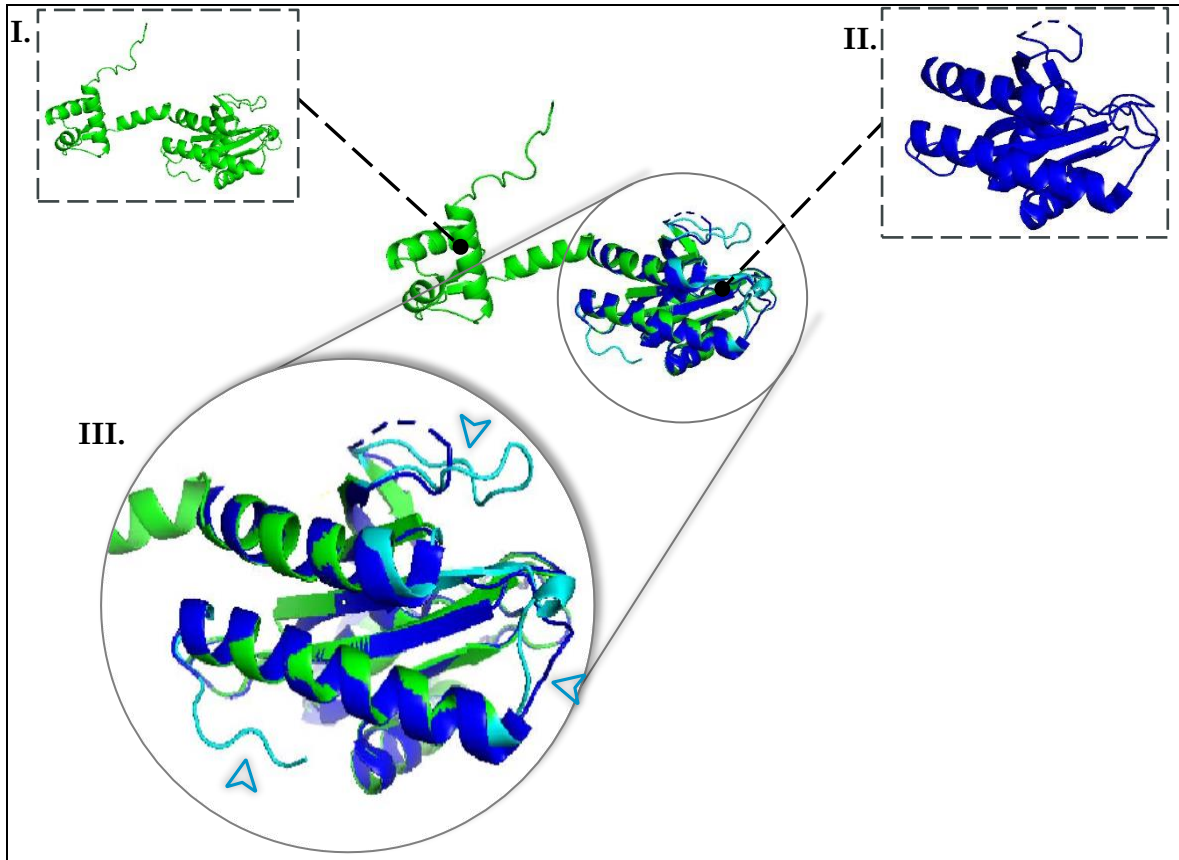
El PAE resultante para KdgR (figura 7. I), señala una confianza en el empaquetamiento y posición relativamente alto del dominio CTD de la proteína, sin embargo, para el dominio putativo HTH en el extremo N-terminal, entre las posiciones M1-Q9 y L76-D88 muestran mosaicos color rojo y blanco (puntuación mayor a 10), que representan una confiabilidad menor. La pLDDT en el modelo 3D de KdgR (figura 7. II), mostró puntuaciones de confianza mayores a 90 en el CTD y NTD, sin embargo, en el NTD entre las posiciones M1-S12 y L76-D88, mostraron

un pLDDT menor a 60, indicando una menor confiabilidad (Magana Gomez y Kovalevskiy, 2024; Reverchon *et al.*, 1991).



**Figura 7: Modelado 3D de KdgR obtenido con AlphaFold2.**

I) Predicted Aligned Error. II) Modelo con mapa de color pLDDT, donde los pLDDT menores a 70 se encuentran señalados con una flecha con contorno naranja. \* CTD: Dominio C-terminal, NTD: Dominio N-Terminal.



**Figura 8: Comparación del modelo 3D generado por AlphaFold2 vs. la estructura cristalina del CTD de KdgR.**

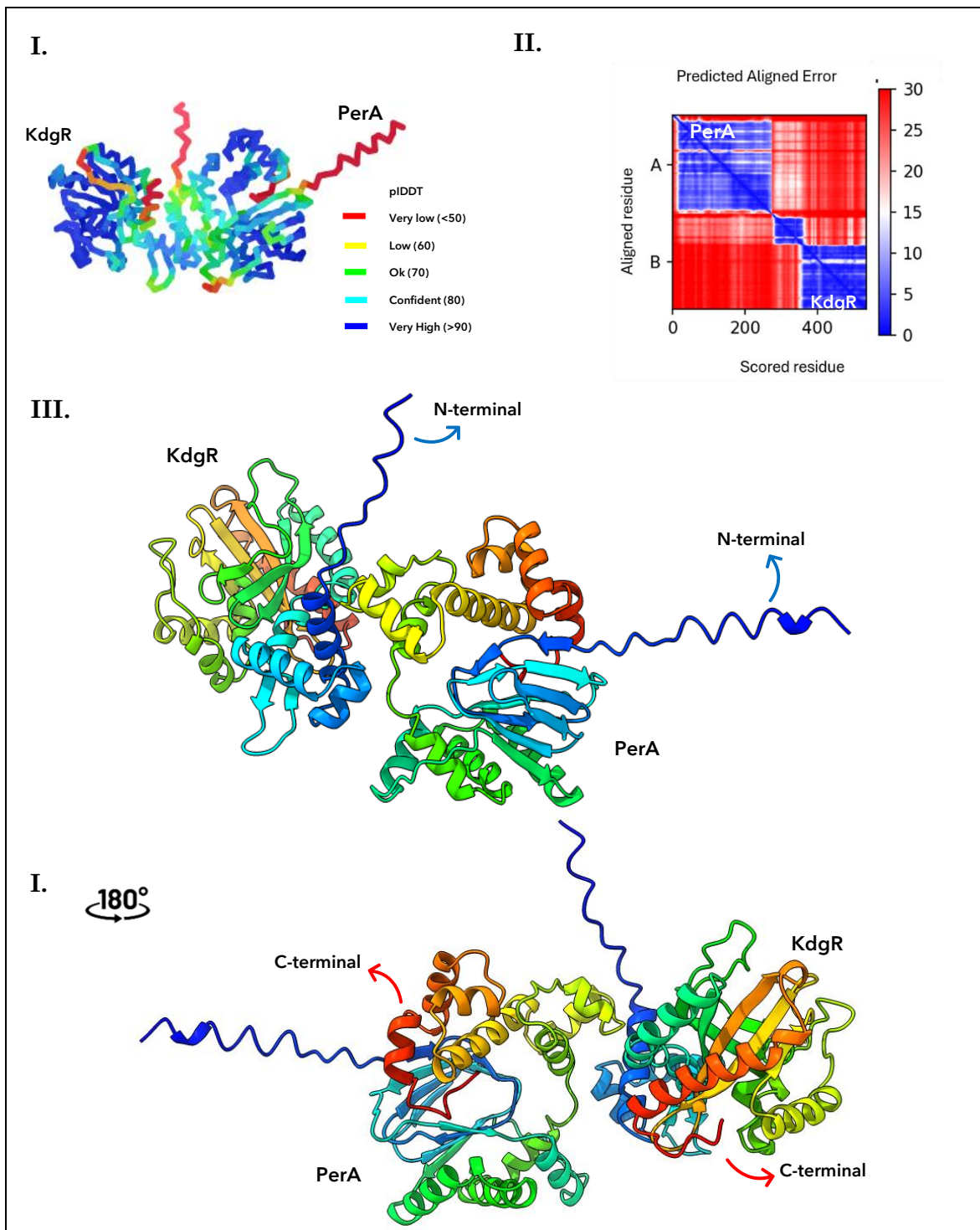
I) Modelo tridimensional de KdgR predicho por AlphaFold2 (verde). II) Modelo 3D del CTD de KdgR alojado en la base de datos PDB con ID: 1YSP (azul). III) Comparación entre ambas estructuras usando PyMOL. El color azul cian y las flechas azules señalan los bucles con una disposición diferente al modelo obtenido de PDB.

Finalmente, se realizó la comparación entre el modelo predicho por AlphaFold2 y la cristalografía de rayos X del dominio CTD de KdgR alojada en la base de datos PDB con ID: 1YSP (Burley *et al.*, 2025; H. Berman *et al.*, 2003; H. M. Berman, 2000). La comparación reveló que el extremo CTD predicho por AlphaFold2 es muy similar a la estructura obtenida por cristalografía de rayos X (abarca los residuos entre D88-F261), con excepción de los bucles en las posiciones R102-E106, I134-G137, S227-E236 y Q255-F263, ya que estos presenta una disposición ligeramente diferente respecto al modelo 1YSP (figura 8).

### 7.1.5 Modelado de la interacción entre KdgR y PerA

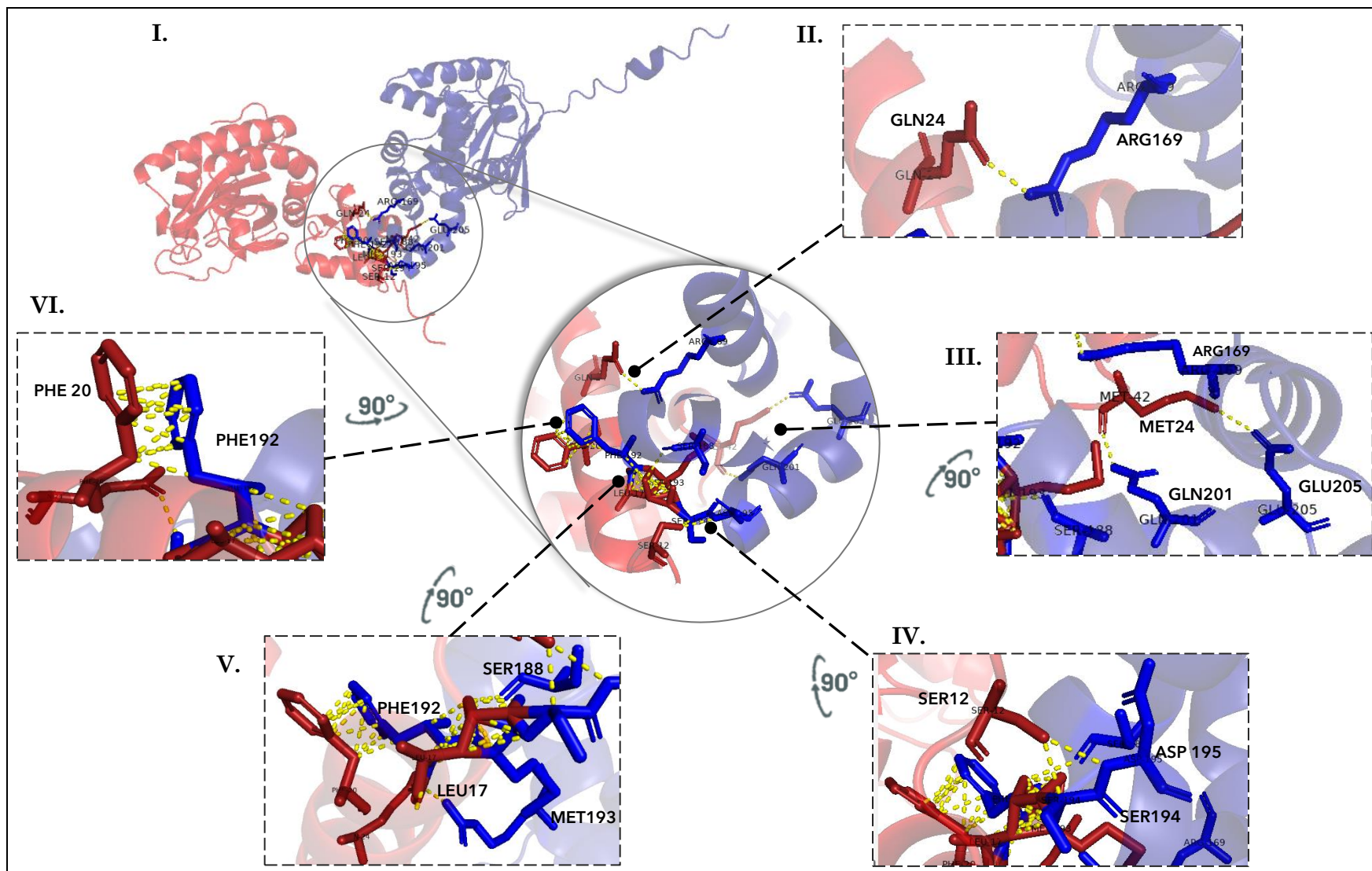
Para estudiar con mayor detalle la interacción entre KdgR y PerA, se realizó el modelado tridimensional de dicha interacción empleando AlphaFoldColab2 (AFC2), un software de desarrollo interactivo de código abierto dentro de Google Colaboratory. Su funcionamiento se basa en combinar la información de las secuencias de aminoácidos, las alineaciones de secuencia múltiples, las estructuras homólogas y las posiciones relativas de los aminoácidos para predecir la estructura de cadenas de proteínas. AFC2, arroja seis modelos de interacción y cada modelo se muestra como un modelo tridimensional con un mapa de color pLDDT y métricas de confianza PAE, posteriormente AFC2 enlista cada uno de los modelos seleccionando la interacción con menor PAE y mayor pLDDT como el modelo número 1 de la lista (Evans *et al.*, 2021; Jumper *et al.*, 2021).

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 9 y 10 (el primer modelo de la lista). El PAE y la pLDDT, predichos por AFC2, mostraron un patrón igual que los modelos individuales analizados anteriormente (figura 6 y 7). Los sitios de interacción observados en el modelo se encuentran en el CTD de PerA y el extremo NTD de KdgR. Los residuos del CTD de PerA que interactúan con el NTD de KdgR se encuentran en las posiciones R169, S188, F192, M193, S194, D195, Q201 y E205. Mientras que para KdgR los residuos del NTD que interactúan con el CTD de PerA, son S12, L17, F20, Q24 y M42 (figura 10). Las interacciones específicas son las siguientes: GLN24 de KdgR interactúa con la ARG 169 de PerA. MET 24 de KdgR con el GLN 201-GLU205 de PerA. SER12 de KdgR con la SER194 y ASP195 de PerA. La LEU17 de KdgR con la LEU17, MET193 y SER188, de PerA y la PHE20 de KdgR con la PHE192 de PerA. Las distancias entre las interacciones son  $\leq 3 \text{ \AA}$  (figura 10).



**Figura 9: Modelado predictivo de la interacción KdgR-PerA empleando AlphaFoldColab2.**

I) Modelo de interacción con color pLDDT. II) Predicted Aligned Error. III) Vista frontal del modelo, con color rainbow: N a C-terminal. IV) Vista frontal, con un giro de 180° sobre el eje X. Las flechas azules, señalan el N-terminal de cada proteína, mientras que las flechas rojas señalan el C-terminal de cada proteína.



**Figura 10: Aminoácidos involucrados en la interacción entre KdgR y PerA.**

I) Modelo de la interacción: PerA es la proteína color azul, mientras que la proteína roja es KdgR. II) Interacción entre la GLN24 de KdgR con la ARG 169 de PerA. III) Interacción entre MET 24 de KdgR y GLN 201-GLU205 de PerA. IV) Interacción entre SER12 de KdgR y SER194 y ASP195. V) Interacción entre LEU17 de KdgR y PHE1192, MET193 y SER188 de PerA. VI) Interacción entre PHE20 de KdgR y PHE192 de PerA. El símbolo 90° con la flecha representa el giro y la dirección del giro que sufrió la proteína durante el acercamiento. Las distancias entre las interacciones son  $\leq 3 \text{ \AA}$ . Ver texto para más detalle.

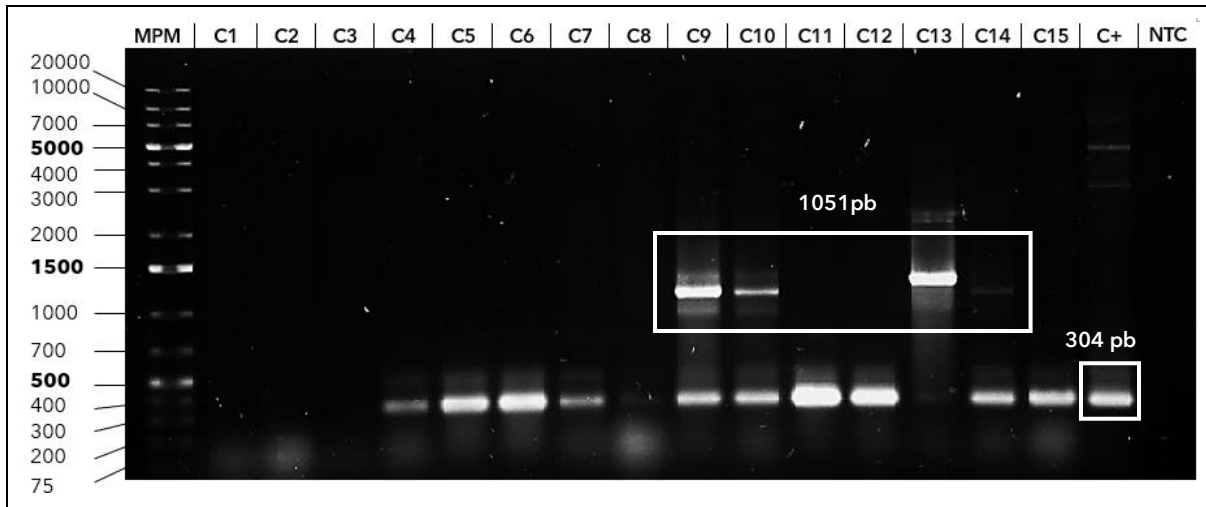
## 7.2 Análisis experimental de la interacción entre KdgR y PerA

### 7.2.1 Clonación de *kdgR*

Para el análisis del efecto de la sobreexpresión de KdgR sobre las proteínas de virulencia de EPEC, se clonó a *kdgR* en el vector pBAD/Myc-HisA. Para esto, se hizo la amplificación del gen *kdgR* (792 pb) de EPEC, mediante la técnica de PCR convencional usando los oligonucleótidos enlistados en la tabla 3 que introducen los sitios de restricción *NcoI* y *HindIII*. Posteriormente, se extrajo el plásmido de interés y se procedió a su digestión junto con el producto de amplificación de *kdgR*. Los productos digeridos fueron limpiados y posteriormente ligados, la construcción obtenida fue denominada pBAD-KdgREP. Una vez obtenida la construcción, fue introducida en la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  por transformación. Para confirmar la transformación, las cepas seleccionadas fueron cultivadas en placas de agar LB con Amp (100  $\mu$ g/mL) a 37°C por toda una noche y posteriormente, se hicieron dos rondas de PCR de colonia. En la primera ronda se hicieron un total de 17 PCR de colonia utilizando los oligonucleótidos del plásmido pBAD-Fv y pBAD-Rv, dos de los cuales fueron el control negativo y el control positivo (pBAD). Los productos de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

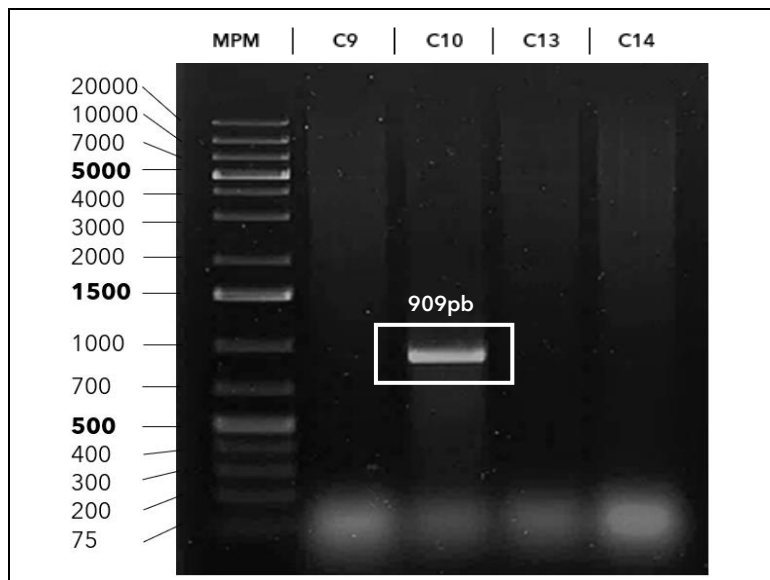
Los resultados obtenidos de este ensayo se muestran en la figura 11 y 12.

De las 15 colonias sometidas a la primera ronda de PCR de colonia, utilizando los oligonucleótidos del plásmido pBAD-Fv y pBAD-Rv, 4 de las colonias presentaron un producto de amplificación de aproximadamente 1051 pb (figura 11, carriles C9, C10, C13, C14), coincidiendo con el peso esperado, por lo que les realizó una segunda ronda de PCR de colonia, pero en esta ocasión usando los oligonucleótidos delantero del plásmido y reverso del gen; pBAD-Fv y KdgRRV, con un producto de amplificación esperado de 909 pb (figura 12). De las 4 colonias sometidas a esta ronda de PCR de colonia, solo una amplificó un producto de 909 pb, la cual se encuentra señalada como C10 en la figura 12.



**Figura 11: PCR para la caracterización de las colonias candidatas con la construcción pBAD-KdgREP.**

MPM corresponde al marcador del peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder Thermo Fisher Scientific). Los carriles C1 al C15 corresponden a los productos de amplificación por PCR de las colonias candidatas usando los oligonucleótidos del vector (pBAD-Fw, pBAD-Rv), con un peso esperado de 1051 pb. C+ corresponde el control positivo (pBAD). NTC representa control no templado de la reacción. Los rectángulos con contorno blanco señalan los productos de amplificación esperados. Electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.



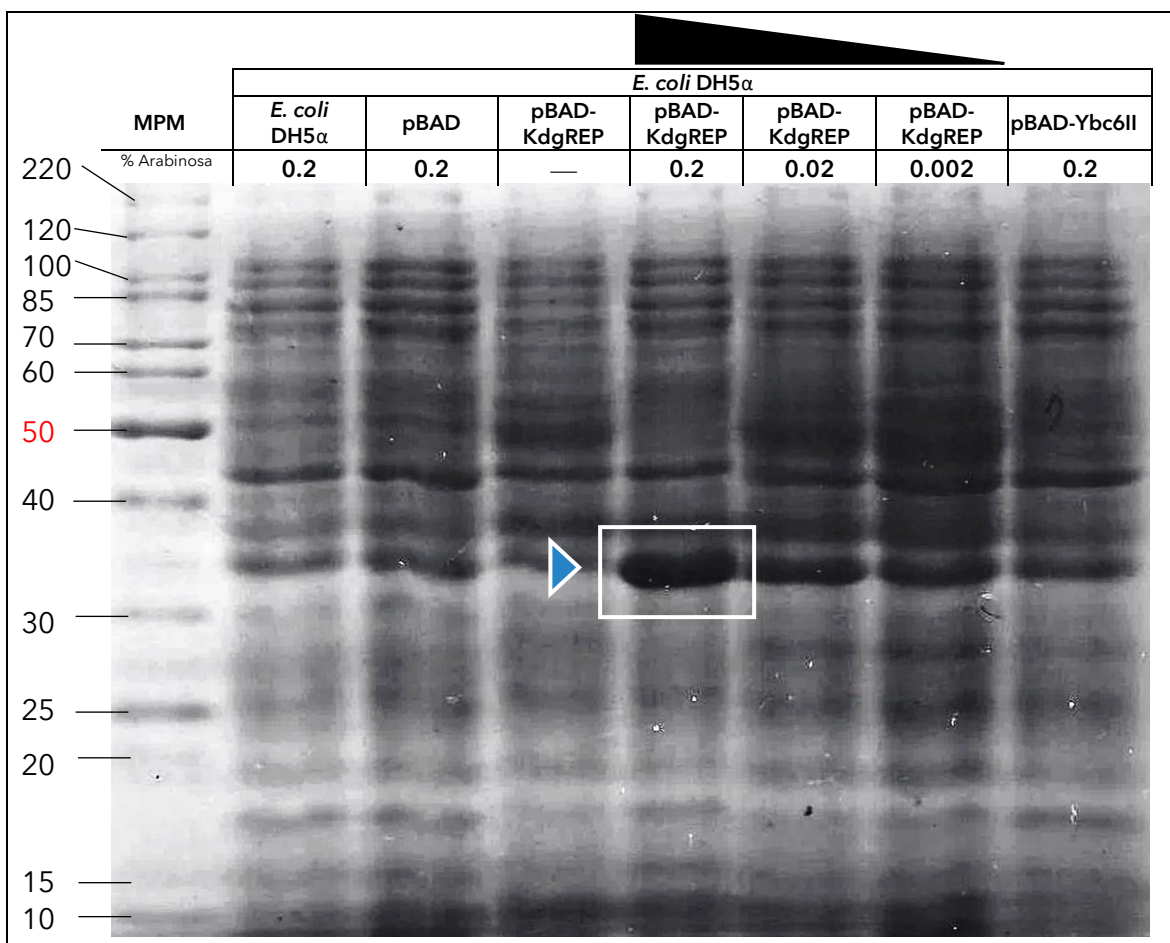
**Figura 12: Segunda PCR de las colonias candidatas que contienen pBAD-KdgREP.**

MPM corresponde al marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder Thermo Fisher Scientific). Los carriles C9, C10, C13 y C14 (colonias 9, 10, 13 y 14, confirmadas de la PCR anterior) corresponden a los productos de amplificación por PCR de colonia usando los oligonucleótidos pBAD-Fw y KdgRRV, con un peso esperado de 909 pb. El rectángulo con contorno blanco señala el producto de amplificación esperado. Electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñido con bromuro de etidio.

### 7.2.2 Sobreexpresión de KdgR-6XH

Para caracterizar si KdgR se encontraba en fase con la etiqueta de polihistidinas, se expresaba correctamente y a su vez, poder determinar la sobreexpresión de KdgR-6XH, la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada con la construcción pBAD-KdgREP, fue cultivada e inducida con arabinosa al 0.002%, 0.02% y 0.2% y como control se empleó la misma cepa transformada con pBAD y pBAD-Yb6II la cual expresa una adhesina de ~16-20 kDa.

Los resultados obtenidos de este ensayo se muestran en la figura 13, donde se observan bandas notablemente más gruesas a la altura de los ~30 kDa correspondiente al peso molecular de KdgR con la cola de polihistidinas, donde es posible observar que dicha banda mostró una mayor expresión a una concentración de 0.2% de arabinosa (figura 13 carril 5).



**Figura 13: Sobreexpresión de KdgR-6XH en *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas.**

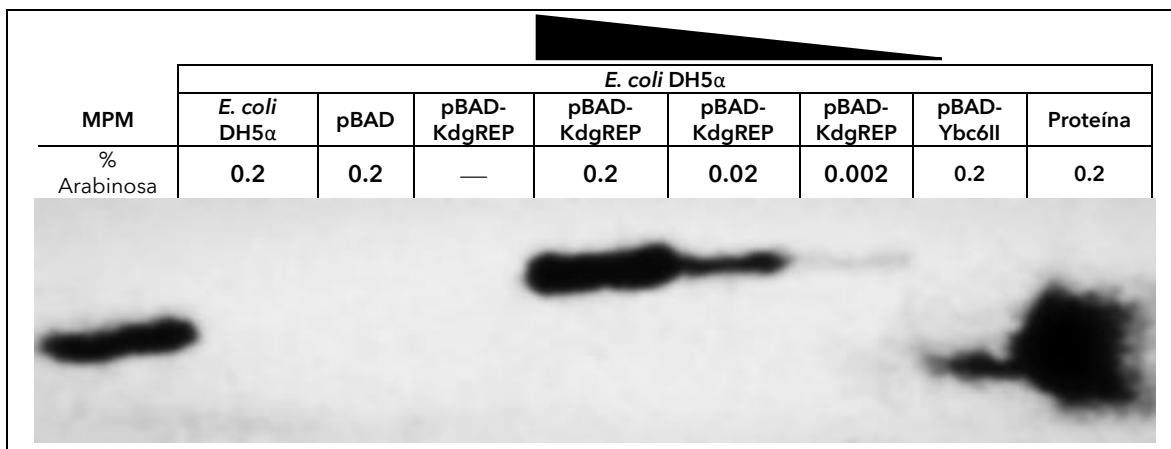
MPM corresponde al marcador de peso molecular (Thermo Fisher Scientific Page Ruler Unstained Protein Ladder). El carril 2 corresponde a *E. coli* DH5 $\alpha$  inducida con 0.2% de arabinosa, el carril 3 corresponde a *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada con pBAD, inducida con 0.2% de arabinosa, el carril 4 corresponde a *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada con pBAD-KdgREP, no inducida. El carril 5, 6 y 7 corresponden a *E. coli* DH5 $\alpha$  transformadas con pBAD-KdgREP, inducidas con 0.2%, 0.02% y 0.002% de arabinosa respectivamente. El carril 8 corresponde a *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada con pBAD-Ybc6II inducida con 0.2% de arabinosa. El triángulo representa las concentraciones crecientes de arabinosa. La flecha azul señala la sobreexpresión de KdgR-6XH. El rectángulo con contorno blanco señala a KdgR mejor sobreexpresada. Gel SDS-Page al 12%, teñido con azul de coomassie.

Una vez identificada la concentración de arabinosa que mejor inducía la sobreexpresión de KdgR-6XH, se evaluó su expresión a partir del extracto total inducido con 0.2%, 0.02% y 0.002% de arabinosa, mediante Western Blot utilizando la sonda His-Probe HRP para identificar la etiqueta de polihistidinas.

Los resultados obtenidos de este ensayo se muestran en la figura 14.

El carril 4 corresponde a *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada con pBAD-KdgREP no inducida, la cual no fue detectada por la sonda His-Probe. En el carril 5 se muestra la

sobreexpresión de KdgR-6XH inducida con 0.2% de arabinosa observándose una banda de ~30 kDa, reconocida por la sonda. Los carriles 6 y 7 corresponde a *E. coli* DH5α transformada con pBAD-KdgREP, inducidas con 0.02% y 0.002% de arabinosa, respectivamente, donde es posible observar una expresión disminuida de KdgR en comparación con la cepa inducida con 0.2% de arabinosa. El carril 8 corresponde a una *E. coli* transformada con pBAD-Ybc6II inducida con 0.2% de arabinosa, en donde se observar la expresión de la proteína fimbrial, verificando al promotor araBAD y a la arabinosa como inductor. El carril 9 contiene una proteína fimbrial ya purificada con una etiqueta de polihistidinas, usada como control de carga. Como fue esperado las únicas proteínas detectadas por la sonda His-Probe HRP fueron que contenían una cola de polihistidinas (carriles 5-8).



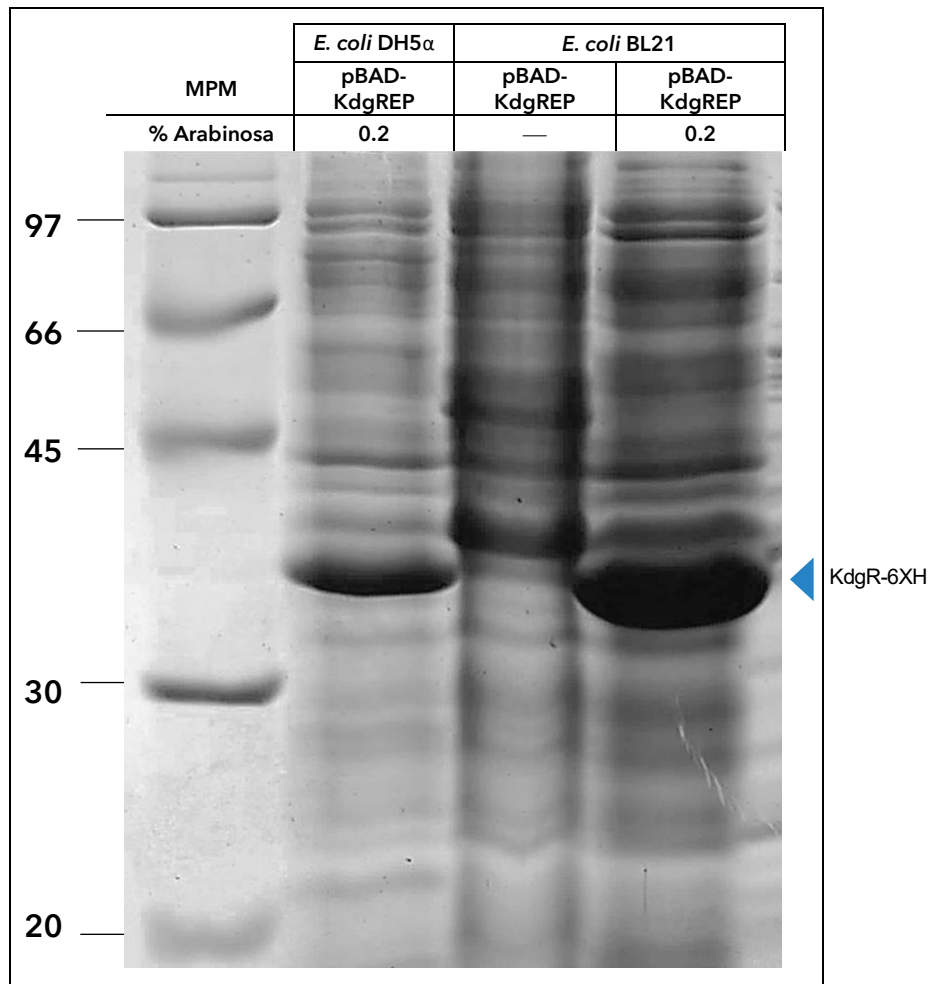
**Figura 14: Identificación de KdgR-6XH mediante Western Blot.**

MPM corresponde al marcador de peso molecular (Thermo Fisher Scientific Page Ruler Unstained Protein Ladder). El carril 2 corresponde a *E. coli* DH5α, inducida con 0.2% de arabinosa, el carril 3 corresponde a *E. coli* transformada con pBAD inducida con 0.2% de arabinosa, el carril 4 corresponde a *E. coli* DH5α transformada con pBAD-KdgREP no inducida. Los carriles 5, 6 y 7 corresponden a *E. coli* DH5α transformadas con pBAD-KdgREP, inducidas con 0.2%, 0.02% y 0.002% de arabinosa respectivamente. El carril 8 corresponde a *E. coli* DH5α transformada con pBAD-Ybc6II. El carril 9 corresponde a una proteína fimbrial ya purificada y marcada con una etiqueta de histidinas. El triángulo representa las concentraciones crecientes de arabinosa.

Con la finalidad de obtener una proteína adecuada para su expresión y purificación, la cepa *E. coli* BL21 fue transformada con el plásmido pBAD-KdgREP e inducida con 0.2% de arabinosa.

*E. coli* BL21 es una cepa adecuada para la expresión de proteínas, ya que se caracteriza por ser deficiente en proteasa como Lon y OmpT. Al respecto en la figura 15 es posible observar la diferencia de expresión de KdgR-6XH entre la *E. coli* DH5α

(carril 2) y *E. coli* BL21 (carril 4) inducidas con 0.2% de arabinosa, ya que ambas presentan una banda de ~30 kDa (flecha azul), notándose que el carril 4 es ligeramente más grueso, debido a la ausencia de dichas proteasas. El carril 3 corresponde a la *E. coli* BL21 no inducida.



**Figura 15: Inducción de la proteína KdgR-6XH en *E. coli* BL21.**

MPM corresponde al marcador de peso molecular. El carril 2 corresponde a *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada con pBAD- KdgREP inducida con 0.2% de arabinosa. El carril 3 corresponde a *E. coli* BL21 transformada con pBAD-KdgREP no inducida y el carril 4 corresponde a *E. coli* BL21 transformada con pBAD-KdgREP e inducida con 0.2% de arabinosa. Gel SDS-Page al 12%, teñido con azul de coomassie.

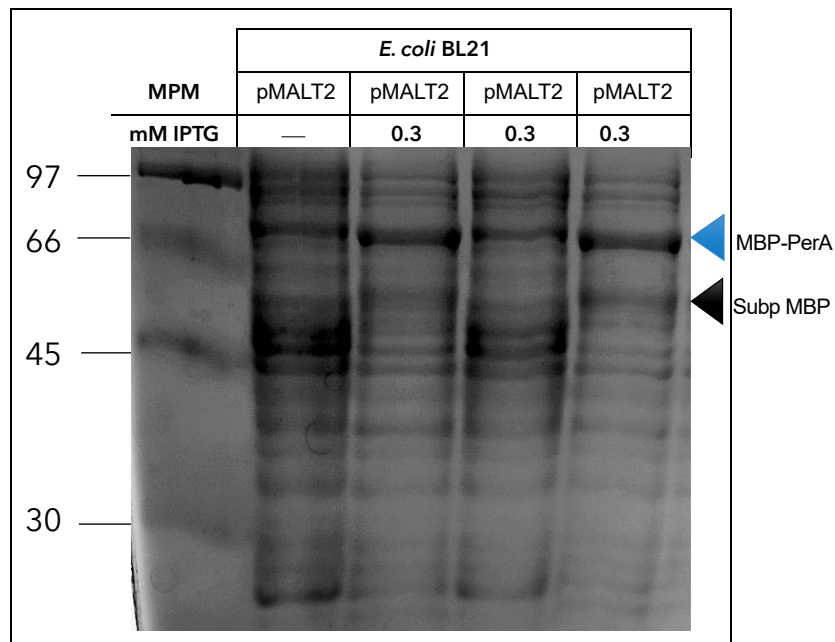
### 7.2.3 Purificación de KdgR-6XH

Se llevó a cabo la purificación de KdgR-6XH en condiciones nativas con ayuda de la agarosa de Ni-NTA y una columna. Este ensayo reveló que KdgR podría estar en la parte insoluble del extracto total inducido con 0.2% de arabinosa, o bien estar sufriendo un cambio conformacional que impida su funcionamiento, ya que la proteína fue observada en los carriles correspondientes a las alícuotas tomadas de los lavados llevados a cabo antes de las eluciones. De manera notable, no fue posible visualizar a KdgR-6XH en las eluciones con Imidazol (5M), ya que los carriles del gel SDS-Page al 12% se encontraban completamente vacíos (datos no mostrados). Una alternativa a la ausencia de KdgR-6XH en las eluciones con imidazol, es la probabilidad de que la integridad de la agarosa de Ni-NTA estuviera comprometida impidiendo la unión de KdgR-6XH.

### 7.2.4 Sobreexpresión de MBP-PerA

Con la finalidad de evaluar la interacción proteína-proteína de KdgR-PerA y como está influye en la regulación de las proteínas de virulencia de EPEC, fue necesaria la sobreexpresión de MBP-PerA. Primeramente, la cepa *E. coli* BL21 fue transformada con pMALT2 y cultivada en DMEM a 30°C e inducida con 0.3 mM de IPTG hasta alcanzar un DO<sub>600</sub> de 0.4. El extracto total fue cargado en un gel de poliacrilamida al 15%, teñido con azul de coomassie y visualizado con ayuda de un fotodocumentador.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 16, en la cual se observó un ligero doble bandeo (carriles 3 al 5), donde la banda de ~74.3 kDa (flecha azul) corresponde a la fusión completa de MBP-PerA y la banda inferior de ~51 kDa (flecha negra) corresponde a un subproducto truncado que contiene a MBP.



**Figura 16: Inducción de MBP-PerA.**

MPM corresponde al marcador de peso molecular. El carril 2 corresponde a *E. coli* BL21 transformada con pMALT2 sin inducir. Los carriles 3-5 a *E. coli* BL21 con pMALT2 inducida con 0.3 mM de IPTG. Las flechas señalan un ligero doble bandeo correspondiente a una banda de ~74.3 kDa (flecha azul) que representa a la fusión completa de MBP-PerA y una banda inferior de ~51 kDa (flecha negra) correspondiente a un subproducto truncado que contiene a MBP. Gel SDS-page al 15%, teñido con azul de coomassie.

### 7.2.5 Interacción proteína-proteína entre KdgR-PerA

Se determinó la posible interacción entre KdgR y PerA mediante ensayos de Pull down, usando los extractos totales de MBP-PerA, MBP y KdgR-6XH.

Los resultados sugirieron una posible interacción entre KdgR y PerA (anexos), sin embargo, también se reveló una interacción inespecífica entre KdgR con MBP, coincidiendo con los resultados bioinformáticos obtenidos previamente (datos no mostrados), por lo que se descartó la posibilidad de interacción entre KdgR-6XH con la fusión MBP-PerA, más no con PerA. Mediante esta técnica no fue posible confirmar la interacción entre nuestras proteínas de interés, principalmente por la presencia de MBP fusionada a PerA, sin embargo, la literatura, los análisis bioinformáticos previos y los ensayos experimentales posteriores realizados en el presente trabajo, señalan una alta probabilidad de interacción.

## 7.3 Efecto de KdgR sobre proteínas de virulencia en EPEC

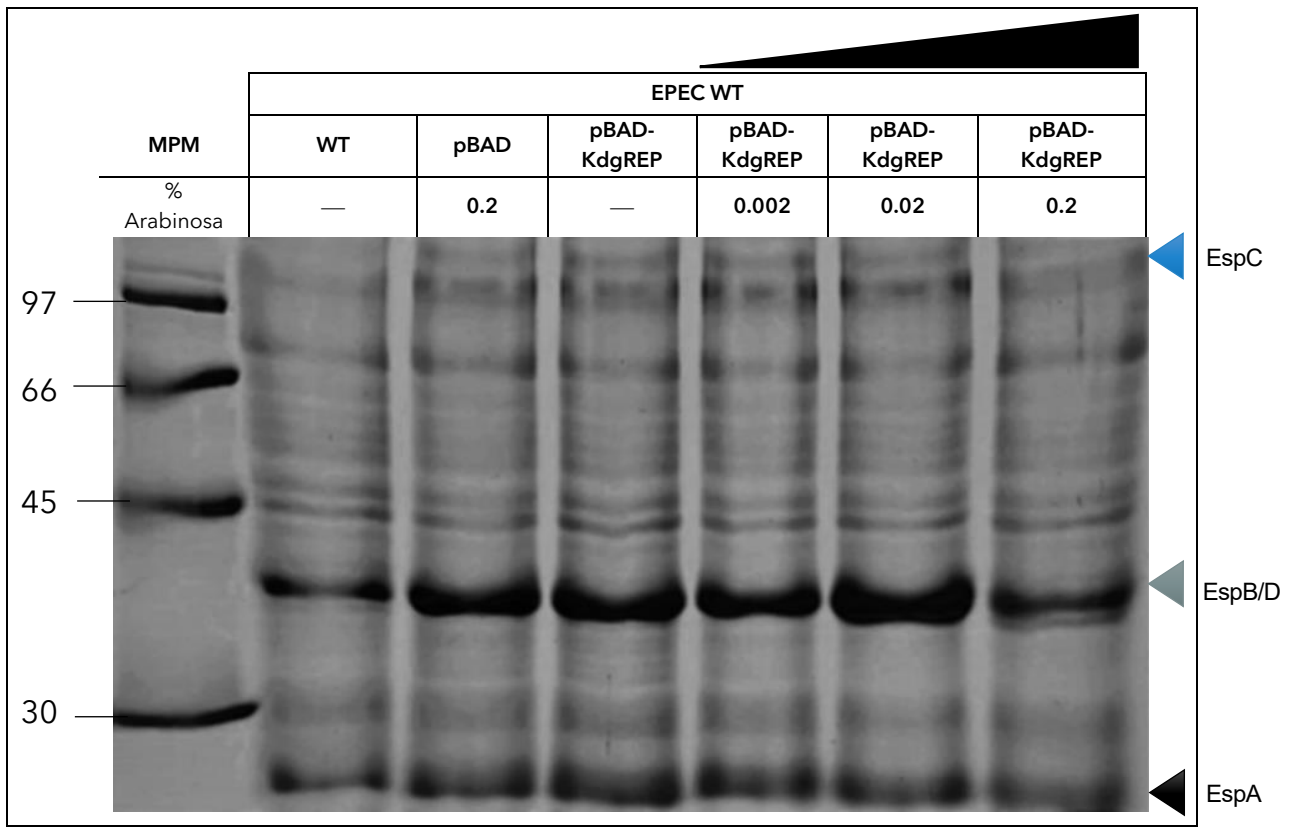
### 7.3.1 Perfil de proteínas secretadas en EPEC

La literatura señala que KdgR participa en la regulación de diversos mecanismos de patogenicidad y virulencia bacteriana, ya sea, mediante su interacción con otra(s) proteína(s) o por otro(s) mecanismo(s) aún desconocido(s). En 2019 González-Lara, obtuvo mediante ensayos de interacción proteína-proteína, que KdgR interactúa con PerA, sin embargo, la relevancia y función de dicha interacción no fue analizada, por lo que no se obtuvieron resultados confirmatorios (González-Lara, 2019; Rodionov *et al.*, 2004). Por lo que, en el presente trabajo proponemos que KdgR es el responsable de reprimir la expresión de PerA, BfpA y algunas otras proteínas de virulencia de EPEC. Para corroborar dicha hipótesis, evaluamos la expresión de las proteínas EspA, EspB/D y EspC usando la técnica de perfil de proteínas secretadas, además evaluamos la expresión de BfpA como una proteína regulada por el activador transcripcional PerA para dilucidar el efecto de la sobreexpresión de KdgR sobre estas proteínas de virulencia en EPEC.

Previamente, se transformó a EPEC WT con pBAD-KdgREP y se comprobó que su sobreexpresión fuera correcta (datos no mostrados).

Los resultados obtenidos del ensayo de perfil de proteínas secretadas se muestran en la figura 17.

El ensayo indica que la sobreexpresión de KdgR con 0.2% de arabinosa en EPEC WT es capaz de disminuir la secreción de las proteínas efectoras EspB/D, EspA y EspC (carril 7). En contraste, al haber una menor expresión de KdgR cuando es inducida con 0.02% y 0.002% de arabinosa, la secreción de las proteínas efectoras no se ve disminuida (carriles 5 y 6), siendo comparable con la expresión de KdgR sin inducir (carril 4), donde la secreción de dichas proteínas tampoco se ve afectada. Mientras que el control no sufre ningún cambio (carril 3) comprobando que el efecto visto en el carril 7 es específico de KdgR y que la inducción con arabinosa es correcta. La disminución de la secreción de dichas proteínas indica que KdgR sobreexpresada con 0.2% de arabinosa disminuye la expresión de EspB/D, EspA y EspC posiblemente por su efecto represor sobre PerA.



**Figura 17: Perfil de proteínas secretadas de EPEC.**

MPM corresponde al marcador de peso molecular. El carril 2 corresponde a EPEC WT sin inducir y el carril 3 corresponde al control *E. coli* DH5 $\alpha$ -pBAD inducida con 0.2% de arabinosa. El carril 4 corresponde a EPEC transformada con pBAD-KdgREP, no inducida. Los carriles 5,6 y 7 corresponden al EPEC transformada con pBAD-KdgREP inducida con 0.002%, 0.02% y 0.2% de arabinosa respectivamente. El triángulo corresponde las concentraciones crecientes de arabinosa. Gel SDS-Page al 12%, teñido con azul de coomassie.

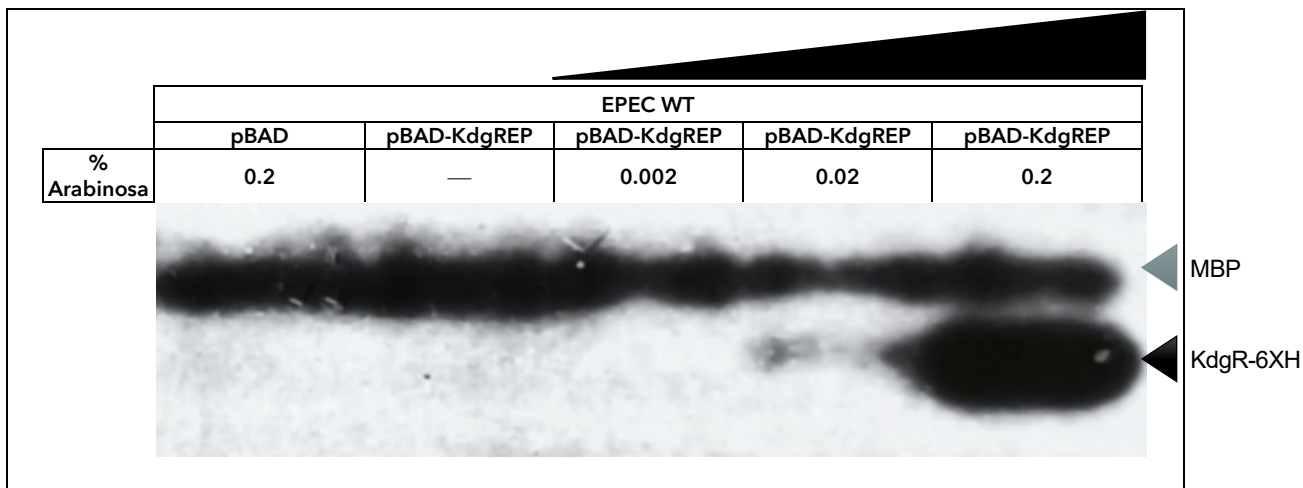
### 7.3.2 Evaluación del efecto de KdgR sobre BfpA de EPEC

Finalmente, se llevó a cabo la evaluación del efecto de KdgR sobre BfpA, mediante la técnica de western blot, utilizando la sonda His-Probe HRP y anti-BfpA, usando como control de carga a MBP. En primera instancia se detectó la presencia de KdgR sobreexpresada con 0.2% de arabinosa (figura 18, carril 5), con la sonda HRP y posteriormente se detectó a BfpA.

Los resultados obtenidos de estos ensayos se observan en la figura 18 y 19.

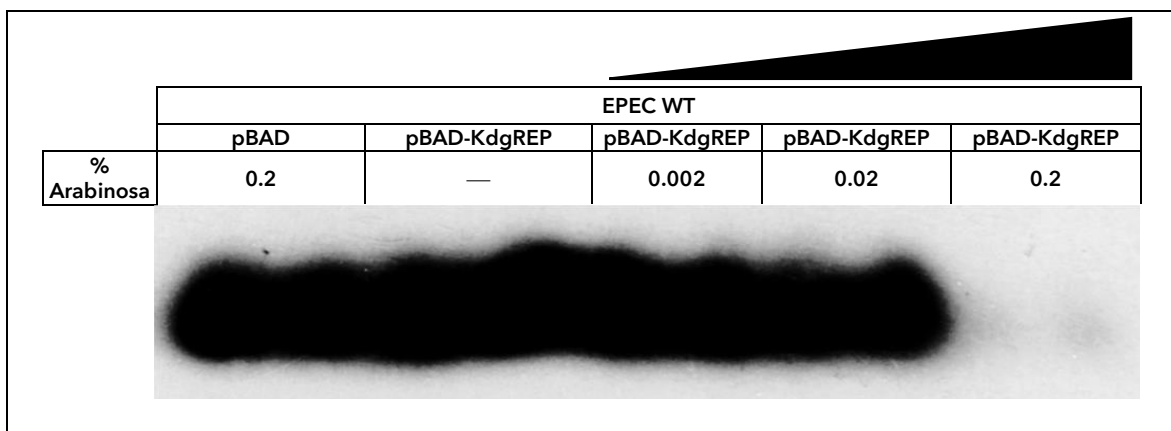
La figura 18 indica que la expresión de KdgR es favorecida cuando es inducida con 0.2% de arabinosa (carril 5) y por el contrario cuando es inducida con 0.002% y 0.02% de arabinosa su expresión se ve reducida (carril 3 y 4). Además, fue posible observar que los extractos proteicos poseen una concentración similar al observarse que las bandas detectadas por el anticuerpo anti-MBP, correspondientes al peso molecular de MBP (43 kDa) presentan una señal constante en todos los carriles.

En presencia de KdgR sobreexpresada (0.2% de arabinosa), se sugiere que la expresión de BfpA es reprimida casi por completo (figura 19, carril 5), por el contrario, cuando la expresión de KdgR es casi nula, la expresión de BfpA no se ve afectada (figura 19, carril 3 y 4), comparándose con la expresión de BfpA en las cepas control (figura 19, carril 1 y 2). Esto indica que KdgR está reprimiendo la expresión de las proteínas de virulencia de EPEC, controladas directamente por BfpA o indirectamente por PerA (EspA, EspB, EspD), posiblemente por la interacción proteína-proteína con este activador transcripcional.



**Figura 18: Detección de MBP y KdgR-6XH.**

Identificación de MBP y KdgR-6XH mediante Western Blot utilizando anticuerpos de conejo anti-MBP y la sonda His- Probe HRP. El carril 1 corresponde a *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada pBAD inducida con 0.2% de arabinosa. El carril 2 corresponde a EPEC transformada con pBAD-KdgREP no inducida. Los carriles 3, 4 y 5 corresponden a EPEC transformada con pBAD-KdgREP inducida con 0.002%, 0.02% y 0.2% de arabinosa, respectivamente. El triángulo corresponde las concentraciones crecientes de arabinosa.



**Figura 19: Detección de BfpA, con anticuerpos  $\alpha$ -BfpA.**

Identificación de BfpA, con anticuerpos  $\alpha$ -BfpA mediante Western Blot. El carril 1 corresponde a *E. coli* DH5 $\alpha$  transformada con pBAD inducida con 0.2% de arabinosa. El carril 2 corresponde a EPEC transformada con pBAD- KdgREP no inducida. Los carriles 3, 4 y 5 corresponden a EPEC transformada con pBAD-KdgREP inducida con 0.002%, 0.02% y 0.2% de arabinosa, respectivamente. El triángulo corresponde a las concentraciones crecientes de arabinosa.

## 8. Discusión

EPEC sobrevive a entornos hostiles como el ambiente ácido del estómago y la capa mucosa viscosa sobre el epitelio, donde la regulación de los genes de virulencia bacterianos juega un papel indispensable en la respuesta a estos cambios ambientales para garantizar que la bacteria tenga una colonización exitosa (Platenkamp y Mellies, 2018; Clarke *et al.*, 2003). La regulación transcripcional es uno de los principales modos de regulación de la expresión génica en todos los dominios de la vida, sucediendo por la acción de proteínas específicas conocidas como TF, que se unen al ADN inhibiendo, favoreciendo o funcionando como un regulador dual en el inicio de la transcripción, en respuesta a las señales ambientales (Cortés-Avalos *et al.*, 2021).

PerA y KdgR forman parte de dos de las familias con miembros pertenecientes a los TF, es decir la familia Arac/XylS (la cual tiene el mayor número de TF en bacterias) y la familia IclR (Cortés-Avalos *et al.*, 2021).

La familia de activadores transcripcionales Arac/XylS tienen tres funciones reguladoras principales: metabolismo de carbono, respuestas al estrés y reguladores de virulencia. En estos últimos destaca PerA (una de las proteínas objetivo del presente estudio), encargada de la expresión de *bfpA* y de la autoactivación de su propio promotor. Su expresión es dependiente de diversas señales ambientales; *in vitro*, su expresión se ve favorecida cuando la bacteria crece en medio DME a 37°C y, por el contrario, su expresión es reprimida durante su crecimiento en medio LB o en presencia de amonio, por mecanismos aún desconocidos (González-Lara, 2019; Ibarra *et al.*, 2013; Martínez-Laguna *et al.*, 1999). En este sentido es pertinente decir que hay efectores encargados de reprimir, interactuar o competir con PerA por su unión con *perA* y *bfpA* afectando la expresión de los genes en el pEAF y en LEE. Por lo que nuestro grupo de trabajo se propuso identificar las proteínas implicadas en dicha regulación. En 2019 González-Lara identificó las posibles interacciones que PerA establece con otras proteínas encargadas de reprimir o modular su función reguladora y de manera interesante

dentro de estas proteínas se encontró a KdgR, proteína de interés del presente trabajo (González-Lara, 2019).

Las proteínas de la familia lclR controlan genes cuyos productos están involucrados en una amplia variedad de procesos, como la regulación del metabolismo de carbono, de determinantes de patogenicidad y virulencia, la degradación de compuestos aromáticos, la resistencia a fármacos, la inactivación de señales quórum, la tolerancia a solventes y la esporulación (Lu *et al.*, 2011; Krell *et al.*, 2006; Molina-Henares *et al.*, 2006). KdgR es una proteína involucrada en la regulación de estructuras operónicas en una gran variedad de patógenos. Participa en la regulación de genes que codifican para; diferentes tipos de pectinasas, proteínas necesarias para la secreción de pectinas (como transportadores y sistemas de secreción), enzimas intracelulares implicadas en la escisión de dímeros, el catabolismo de monómeros, proteínas reguladoras, entre otras (Lu *et al.*, 2011; Krell *et al.*, 2006; Molina-Henares *et al.*, 2006; Rodionov *et al.*, 2004).

Dada la probabilidad de la participación de KdgR en la regulación de las proteínas de virulencia de EPEC, ya sea mediante su unión al ADN o su interacción con otras proteínas reguladoras como PerA, se procedió al análisis bioinformático de la interacción de KdgR con PerA. En primera instancia se hizo la búsqueda *in silico* de la probabilidad de interacción entre ambas proteínas, con ayuda del servidor PSOPIA (tabla 9), donde los resultados indican que KdgR y PerA tienen una probabilidad de 0.3613/1.0 de interactuar, que según el puntaje arrojado por PSOPIA, donde 1.0 representa una alta probabilidad de interaccionar, tomando en cuenta que nuestro control positivo que tiene una probabilidad de 0.9462/1.0 de interactuar, nuestros resultados representan una probabilidad moderada de interacción. Con la finalidad de respaldar dichos estudios, se determinaron los posibles sitios de interacción entre ambas proteínas empleando el servidor iFrag (figura 5). Los resultados indicaron que KdgR y PerA pueden interactuar a través de la parte final dominio NTD de PerA y la parte final del dominio HTH y la parte inicial del CTD de KdgR.

Adicionalmente, se hizo la estimación de la afinidad entre la interacción de nuestras proteínas de interés con ayuda del servidor PPA-Pred2, donde se observó que la

interacción entre ambas proteínas era energéticamente favorable y los complejos proteicos son relativamente estables (tabla 10), lo que sugiere que la interacción entre KdgR y PerA es posible y estructuralmente viable, sin embargo presenta una afinidad moderada en comparación con las interacciones ya demostradas experimentalmente.

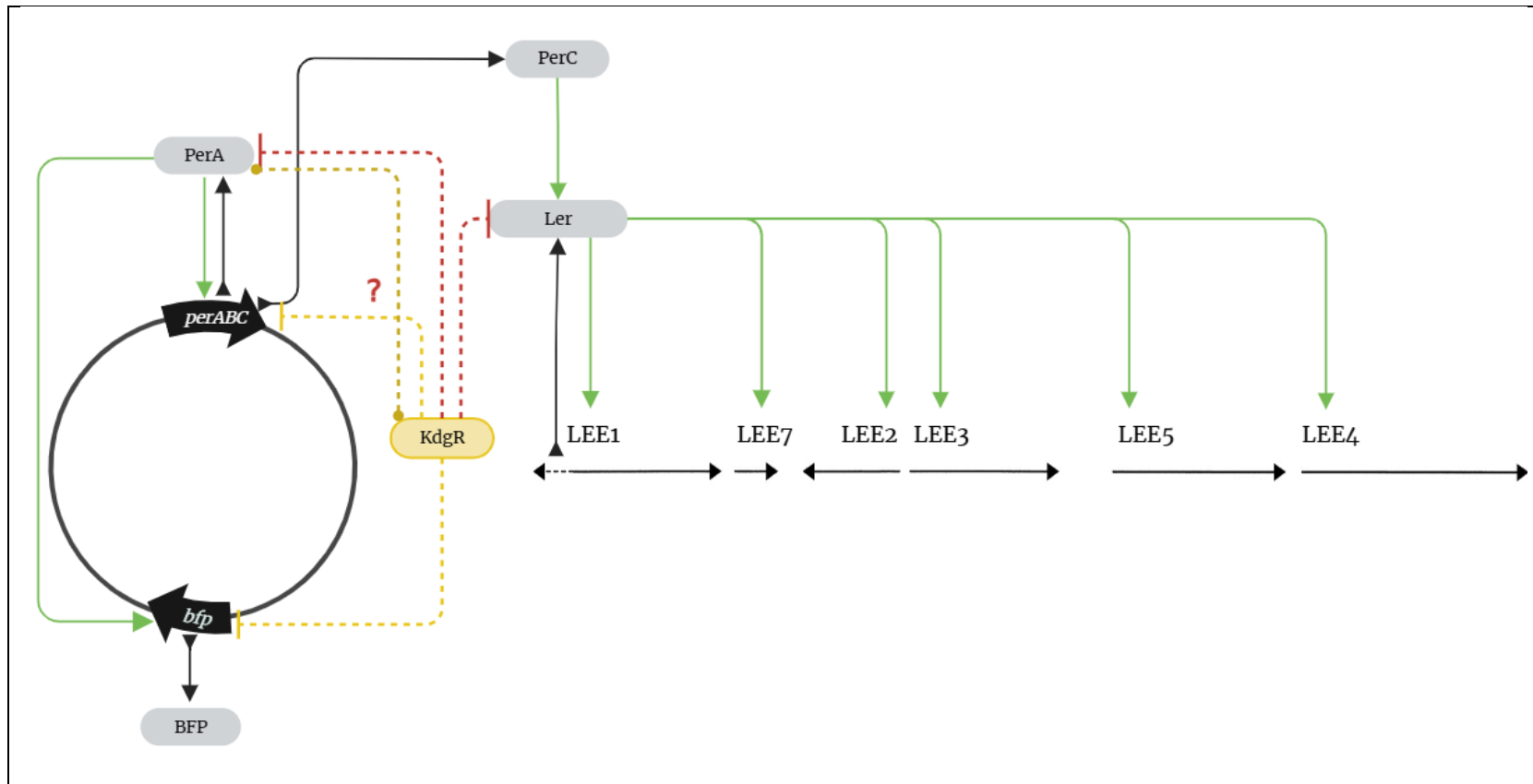
Finalmente, se hizo el modelado de las estructuras terciarias de ambas proteínas, y de la interacción proteína-proteína, usando AF2 y AFC2 respectivamente. Para la estructura 3D de PerA y KdgR (figura 6, 7 y 8), AF2 señala una confianza relativamente alta en el empaquetamiento, posición y ubicación de los dominios NTD y CTD de ambas proteínas, resultando en una confianza relativamente alta en el modelo, con discrepancias en los extremos finales de ambos dominios, lo que puede deberse principalmente por la flexibilidad de los dominios, la disponibilidad de la información en las bases de datos, o bien porque las proteínas carecen de una estructura definida cuando no están unidas, pero sufren un cambio conformacional al interactuar con otra proteína o ligando (Magana Gomez y Kovalevskiy, 2024).

En cuanto al modelo predictivo de interacción entre KdgR y PerA, AFC2, también predijo un modelo relativamente confiable. Revelando que los sitios de interacción se encuentran entre el CTD de PerA y el extremo NTD de KdgR (figura 9 y 10). Respalda lo dicho por Ibarra *et al.*, que indica que el dominio C-terminal de PerA (residuos 163-274), desempeña un papel importante en la unión al ADN y sus interacciones con la ARN polimerasa y por ende la activación transcripcional mediada por PerA de los promotores *per* y *bfpA* (Ibarra *et al.*, 2013). En dicho caso su interacción con el dominio de HTH de KdgR, cuya función ha sido descrita como la encargada de mediar la especificidad de la proteína por la secuencia de ADN, podría significar que la interacción entre ambas proteínas posiblemente sucede como un mecanismo de respuesta al estrés, que implica la represión de PerA por KdgR mediante su unión al dominio CTD de PerA (Molina-Henares *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2002). Pero también proponemos que KdgR pudiese estar uniéndose al ADN, río arriba del sitio del inicio de la transcripción *per* y *bfpA* bloqueando a sus promotores e impidiendo la unión de PerA y en consecuencia el inicio de su transcripción como se ha visto en otros modelos de investigación (Liu *et al.*, 1999).

Con la finalidad de respaldar nuestra hipótesis, se realizaron los siguientes procedimientos experimentales. Primero se clonó a *kdgR* en el plásmido pBAD-Myc/His-A, con el que se transformó a una *E. coli* DH5 $\alpha$  (figura 11 y 12), del que posteriormente se evaluó su expresión y sobreexpresión (figura 13 y 14), en donde se determinó que KdgR se sobreexpresa mejor cuando es inducido con 0.2% de arabinosa. Una vez comprobada su sobreexpresión, se transformó a una *E. coli* BL21 (figura 15) y se obtuvo su extracto total sobreexpresado, a la par del extracto total de PerA (figura 16), posteriormente, se llevó a cabo un ensayo de interacción tipo Pull-down (ver anexos), el cual mostró la posibilidad de interacción entre ambas proteínas, sin embargo, cabe señalar que también mostraba interacción con MBP, que junto con algunos análisis bioinformáticos (datos no mostrados) revelaron que MBP podría interactuar con KdgR estando fusionada con PerA, por lo que se descartó la confiabilidad de dicho ensayo y se recomendó buscar experimentos alternativos, que permitan la interacción directa de PerA con KdgR, o bien que no haya un factor externo a los reguladores en EPEC que influyan en los resultados. Finalmente, se evaluó el efecto de KdgR-6XH transformada en EPEC WT sobre las proteínas de virulencia controlados directa o indirectamente por PerA. Por lo que, basándonos en la posibilidad de su interacción con PerA, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de KdgR sobre el perfil de proteínas secretadas (figura 17), en el cual fue posible observar una disminución en la secreción de los efectores EspA, Esp B/D y en menor medida de EspC, cuando KdgR era sobreexpresada con 0.2% de arabinosa, lo que indica el posible efecto negativo que tiene KdgR sobre PerA o bien sobre Ler, ya que la expresión de dichos efectores es regulada por Ler e indirectamente por PerA. También, fue posible determinar que la sobreexpresión de KdgR con 0.2% de arabinosa disminuye la expresión de BfpA, indicando que KdgR regula negativamente a proteínas reguladoras de virulencia de EPEC (figura 18 y 19). En contraste, una menor o nula expresión de KdgR la expresión de PerA y de BfpA no se ve afectada (figura 19), confirmando la participación de KdgR como una proteína represora de las proteínas de virulencia de EPEC.

Los resultados obtenidos y la bibliografía consultada, permitieron la elaboración de las siguientes propuestas que explican el posible mecanismo de regulación de KdgR

de los genes de virulencia de EPEC, controlados directa o indirectamente por PerA, el cual se presenta en la figura 20, en donde se propone que en respuesta a las condiciones de represión, KdgR bloquea la transcripción de genes importantes para la virulencia de EPEC, ya sea mediante su interacción con PerA, u otro regulador (por ejemplo: Ler) bloqueando la activación transcripcional de *bfpA* y *per* y de manera indirecta de los genes de la isla LEE, pero también se plantea la posibilidad de que KdgR compita por la unión a los promotores *per* y *bfpA* con PerA, impidiendo la unión de PerA y reprimiendo la transcripción de los operones. Sin embargo, aún faltan análisis bioinformáticos y/o experimentales confirmatorios, que permitan dilucidar la cascada regulatoria de los genes de virulencia de EPEC que implique la participación de KdgR.



**Figura 20: Modelo hipotético del papel de KdgR sobre genes de virulencia de EPEC.**

Se propone que KdgR bloquea la transcripción de genes de virulencia mediante su interacción con PerA o Ler, bloqueando la activación transcripcional de *bfpA* y *per*, o bien compite con PerA por su unión a los promotores *per* y *bfpA*. Las flechas verdes representan las señales reguladoras positivas, mientras que las flechas rojas representan las señales negativas. Las flechas negras con inicio rombo indican la expresión de proteínas. Las proteínas reguladoras se muestran como óvalos y KdgR se encuentra identificado por un óvalo amarillo y el modelo hipotético de regulación se muestra con flechas amarillas y las flechas rojas. Ver texto para más detalle (Obtenido y editado de Platenkamp y Mellies, 2018; Mellies *et al.*, 2007; Kaper *et al.*, 2004; Clarke *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 1999/ Hecho en: Bioender.com).

## 9. Conclusiones

- El plásmido pBAD-KdgREP expresa a la proteína KdgR-6XH.
- En EPEC, *E. coli* BL21 y DH5 $\alpha$  transformadas con pBAD-KdgREP, la concentración de 0.2% de arabinosa es la que mejor induce la sobreexpresión de KdgR-6XH.
- La sobreexpresión de KdgR con 0.2% de arabinosa reprime la expresión de BfpA, así como la secreción y expresión de los efectores EspA, EspB/D y en menor medida de EspC en EPEC.
- KdgR reprime la expresión de las proteínas de virulencia controlados directa e indirectamente por PerA en EPEC por mecanismos aún desconocidos, posiblemente en respuesta a los cambios ambientales.
- *In silico* KdgR interacciona con el CTD de PerA mediante su dominio HTH.
- La interacción entre KdgR y PerA juegan un papel importante en la expresión de los genes de virulencia de EPEC.

## 10. Perspectivas

- Caracterizar y purificar a la proteína KdgR en EPEC.
- Analizar el efecto de la presencia de las sales de amonio sobre KdgR.
- Caracterizar el sitio de unión al ADN de KdgR en el genoma de EPEC.
- Realizar ensayos tipo EMSA con el complejo KdgR-PerA para verificar si KdgR, afecta la unión de PerA al ADN y viceversa.
- Definir el papel específico de KdgR sobre la regulación de los genes de virulencia de EPEC.
- Definir la relación de KdgR con PerA y su papel en la regulación de los genes de virulencia en EPEC.
- Actualizar los modelos tridimensionales de interacción entre KdgR y PerA, así como el modelo de unión al ADN.
- Hacer análisis comparativos de las secuencias aminoacídicas y nucleotídicas de KdgR en EPEC con homólogos de KdgR en proteobacterias, con la finalidad de determinar la similitud y homología de secuencias y su relación con la función de la proteína.
- Descartar la posibilidad de interacción entre MBP y KdgR, de ser requerido, determinar un nuevo método de purificación de PerA que permita a la proteína conservar su funcionalidad.

## 11. Bibliografía

- Abdul-Wahab, Mohd Firdaus, Takayuki Homma, Michael Wright, Dee Olerenshaw, Timothy R. Dafforn, Kazuhiro Nagata, y Andrew D. Miller (febrero de 2013). The pH Sensitivity of Murine Heat Shock Protein 47 (HSP47) Binding to Collagen Is Affected by Mutations in the Breach Histidine Cluster. *Journal of Biological Chemistry* 288 (6), 4452-61. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.409029>.
- Aldrich, S. (2025, agosto). *BL21(DE3) pLysS Competent Cells—Novagen | 69451* [Empresa]. BL21(DE3) pLysS Competent Cells - Novagen. [https://www.merckmillipore.com/MX/es/product/BL21DE3pLysS-Competent-Cells-Novagen,EMD\\_BIO-69451](https://www.merckmillipore.com/MX/es/product/BL21DE3pLysS-Competent-Cells-Novagen,EMD_BIO-69451)
- Allocati, N., Masulli, M., Alexeyev, M. F., y Di Ilio, C. (2013). *Escherichia coli* in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
- Arbeloa, Ana, James Garnett ... James Lillington (2010). EspM2 Is a RhoA Guanine Nucleotide Exchange Factor. *Cellular Microbiology* 12(5), 654-64. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01423.x>.
- Arbeloa, Ana, Miguel Blanco ... Fabiana C. Moreira (2009). Distribution of espM and espT among Enteropathogenic and Enterohaemorrhagic Escherichia Coli. *Journal of Medical Microbiology* 58(8), 988-95. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.010231-0>.
- Arbeloa, Ana, Richard R. Bulgin ... Georgina MacKenzie (2008). Subversion of Actin Dynamics by EspM Effectors of Attaching and Effacing Bacterial Pathogens. *Cellular Microbiology* 10(7), 1429-41. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01136.x>.
- Atlung, T., y Ingmer, H. (1997). H-NS: A modulator of environmentally regulated gene expression. *Molecular Microbiology*, 24(1), 7–17. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.3151679.x>
- Barba, J., Bustamante, V. H., Flores-Valdez, M. A., Deng, W., Finlay, B. B., y Puente, J. L. (2005). A Positive Regulatory Loop Controls Expression of the Locus of Enterocyte Effacement-Encoded Regulators Ler and GrlA. *Journal of Bacteriology*, 187(23), 7918–7930. <https://doi.org/10.1128/JB.187.23.7918-7930.2005>
- Barrow, Alexander David, y John Trowsdale (julio de 2006). You Say ITAM and I Say ITIM, Let's Call the Whole Thing off: The Ambiguity of Immunoreceptor Signalling. *European Journal of Immunology* 36(7), 1646-53. <https://doi.org/10.1002/eji.200636195>.

- Belousov, M. V., Kosolapova, A. O., Fayoud, H., Sulatsky, M. I., Sulatskaya, A. I., Romanenko, M. N., Bobylev, A. G., Antonets, K. S., y Nizhnikov, A. A. (2023). OmpC and OmpF Outer Membrane Proteins of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Form Bona Fide Amyloids. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(21), 15522. <https://doi.org/10.3390/ijms242115522>
- Berman, H. M. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28(1), 235–242. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.235>
- Berman, H., Henrick, K., y Nakamura, H. (2003). Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nature Structural & Molecular Biology*, 10(12), 980–980. <https://doi.org/10.1038/nsb1203-980>
- Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *eLife*, 4, e05826. <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>
- Bouyioukos, C., Reverchon, S., y Képès, F. (2016). From multiple pathogenicity islands to a unique organized pathogenicity archipelago. *Scientific Reports*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/srep27978>
- Brown, Matthew J., y Robert Schleif (2019). Helical Behavior of the Interdomain Linker of the *Escherichia Coli* AraC Protein. *Biochemistry* 58(26), 2867-74. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.9b00234>.
- Bulgin, Richard, Ana Arbeloa ... David Goulding (2009). The T3SS Effector EspT Defines a New Category of Invasive Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Which Form Intracellular Actin Pedestals. *PLoS Pathogens* 5(12), e1000683. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000683>.
- Burley, S. K., Bhatt, R., Bhikadiya, C., Bi, C., Biester, A., Biswas, P., Bittrich, S., Blaumann, S., Brown, R., Chao, H., Chithari, V. R., Craig, P. A., Crichlow, G. V., Duarte, J. M., Dutta, S., Feng, Z., Flatt, J. W., Ghosh, S., Goodsell, D. S., ... Zardecki, C. (2025). Updated resources for exploring experimentally determined PDB structures and Computed Structure Models at the RCSB Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 53(D1), D564–D574. <https://doi.org/10.1093/nar/gkae1091>
- Bustamante, V. H., Santana, F. J., Calva, E., y Puente, J. L. (2001). Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Molecular Microbiology*, 39(3), 664–678. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02209.x>
- Cabrera-Sosa, L., y Ochoa, T. J. (2020). 46—*Escherichia coli* Diarrhea. En E. T. Ryan, D. R. Hill, T. Solomon, N. E. Aronson, y T. P. Endy (Eds.), *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases (Tenth Edition)* (pp. 481–485). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55512-8.00046-6>

- Callaway, Ewen (1 de noviembre de 2022). AlphaFold's New Rival? Meta AI Predicts Shape of 600 million Proteins. *News. Nature*, <https://nature.bibliotecabuap.elogim.com/articles/d41586-022-03539-1>.
- Cardoso, Jéssica L. S., Alessandra A. Souza, y Maria Lucia C. Vieira (2022). Molecular Basis for Host Responses to Xanthomonas Infection. *Planta* 256 (4), 84. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03994-0>.
- Cepeda-Molero, M., Berger, C. N., Walsham, A. D. S., Ellis, S. J., Wemyss-Holden, S., Schüller, S., Frankel, G., y Fernández, L. Á. (2017). Attaching and effacing (A/E) lesion formation by enteropathogenic *E. coli* on human intestinal mucosa is dependent on non-LEE effectors. *PLOS Pathogens*, 13(10), e1006706. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006706>
- Clarke, S. C., Haigh, R. D., Freestone, P. P. E., y Williams, P. H. (2003). Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a Global Pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 365–378. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.365-378.2003>
- Cortés-Avalos, D., Martínez-Pérez, N., Ortiz-Moncada, M. A., Juárez-González, A., Baños-Vargas, A. A., Estrada-de los Santos, P., Pérez-Rueda, E., y Ibarra, J. A. (2021). An update of the unceasingly growing and diverse AraC/XylS family of transcriptional activators. *FEMS Microbiology Reviews*, 45(5), fuab020. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuab020>
- Coscia, Alessandra, Flaminia Bardanzellu, Elisa Caboni, Vassilios Fanos, y Diego Giampietro Peroni (2021). When a Neonate Is Born, So Is a Microbiota. *Life. Basel, Switzerland* 11(2), 148. <https://doi.org/10.3390/life11020148>.
- Croxen, M. A., y Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 26–38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>
- Dame, R. T., Wyman, C., y Goosen, N. (2000). H-NS mediated compaction of DNA visualised by atomic force microscopy. *Nucleic Acids Research*, 28(18), 3504–3510. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC110753/>
- Dean, Paul, Marc Maresca, Stephanie Schüller, Alan D. Phillips, y Brendan Kenny (2006) . Potent Diarrheagenic Mechanism Mediated by the Cooperative Action of Three Enteropathogenic *Escherichia Coli*-Injected Effector Proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(6), 1876-81. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509451103>.
- Deborah Chen, H., y Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: Unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(1), 83–98. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.07.002>
- Deng, W., Vallance, B. A., Li, Y., Puente, J. L., y Finlay, B. B. (2003). *Citrobacter rodentium* translocated intimin receptor (Tir) is an essential virulence factor

needed for actin condensation, intestinal colonization and colonic hyperplasia in mice. *Molecular Microbiology*, 48(1), 95–115. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03429.x>

Donnenberg, M. S. (Ed.). (2013). *Escherichia coli: Pathotypes and principles of pathogenesis* (2nd edition). Academic Press.

Elfmann, C., y Stülke, J. (2023). PAE viewer: A webserver for the interactive visualization of the predicted aligned error for multimer structure predictions and crosslinks. *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W404–W410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad350>

Elías-López, C., Muñoz-Rosa, M., Guzmán-Puche, J., Pérez-Nadales, E., Chicano-Galvez, E., y Martínez-Martínez, L. (2024). Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: A comparison of SDS-PAGE and MALDI-TOF/MS and limitations of whole genome sequencing analysis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 23(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s12941-024-00761-9>

Evans, R., O'Neill, M., Pritzel, A., Antropova, N., Senior, A., Green, T., Žídek, A., Bates, R., Blackwell, S., Yim, J., Ronneberger, O., Bodenstein, S., Zielinski, M., Bridgland, A., Potapenko, A., Cowie, A., Tunyasuvunakool, K., Jain, R., Clancy, E., ... Hassabis, D. (2021). *Protein complex prediction with AlphaFold-Multimer* (p. 2021.10.04.463034). bioRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.10.04.463034>

Foster-Nyarko, E., y Pallen, M. J. (2022). The microbial ecology of *Escherichia coli* in the vertebrate gut. *FEMS Microbiology Reviews*, 46(3), fuac008. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuac008>

Fraaije, Marco W., Nanne M. Kamerbeek, Annelies J. Heidekamp, Riccardo Fortin, y Dick B. Janssen (2004). The Prodrug Activator EtaA from *Mycobacterium Tuberculosis* Is a Baeyer-Villiger Monooxygenase. *The Journal of Biological Chemistry* 279(5), 3354-60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307770200>.

Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., y Ramos, J. L. (1997). Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4), 393–410. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC232617/>

Gambetta, G. A., y J. C. Lagarias (2001). Genetic Engineering of Phytochrome Biosynthesis in Bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(19), 10566-71. <https://doi.org/10.1073/pnas.191375198>.

Gao, X., Feng, Q., Zhang, Q., Zhang, Y., Hu, C., Zhang, L., Zhang, H., Wang, G., Hu, K., Ma, M., Wang, Z., Liu, Y., An, D., Yi, H., Peng, Y., Wu, X., Chen, G., Jia, X., Cai, H., y Shi, J. (2025). Targeting enolase 1 reverses bortezomib resistance in multiple myeloma through YWHAZ/Parkin axis. *Journal of Biomedical Science*, 32(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12929-024-01101-x>

- García-García, J., Guney, E., Aragues, R., Planas-Iglesias, J., y Oliva, B. (2010). Biana: A software framework for compiling biological interactions and analyzing networks. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 56. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-11-56>
- George, A. S., Salas González, I., Lorca, G. L., y Teplitski, M. (2016). Contribution of the *Salmonella enterica* KdgR Regulon to Persistence of the Pathogen in Vegetable Soft Rots. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(4), 1353–1360. <https://doi.org/10.1128/AEM.03355-15>
- Golanowska, M., Potrykus, M., Motyka-Pomagruk, A., Kabza, M., Bacci, G., Galardini, M., Bazzicalupo, M., Makalowska, I., Smalla, K., Mengoni, A., Hugouvieux-Cotte-Pattat, N., y Lojkowska, E. (2018). Comparison of Highly and Weakly Virulent *Dickeya solani* Strains, With a View on the Pangenome and Panregulon of This Species. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01940>
- Goldberg, M. D., M. Johnson, J. C. D. Hinton, y P. H. Williams (2001). Role of the Nucleoid-associated Protein Fis in the Regulation of Virulence Properties of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 41(3), 549-59. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02526.x>.
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. S., y Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- González-Lara. (2019). *Búsqueda de proteína(s) que interactúan con el activador transcripcional PerA de Escherichia coli enteropatógena*. [tesis de licenciatura, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla]. Repositorio institucional UN.
- Govindarajan, D. K., Eskeziyaw, B. M., Kandaswamy, K., y Mengistu, D. Y. (2024). Diagnosis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* pathogenesis in urinary tract infection. *Current Research in Microbial Sciences*, 7, 100296. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2024.100296>
- Han, N., Peng, X., Zhang, T., Qiang, Y., Li, X., y Zhang, W. (2023). Rapid turnover and short-term blooms of *Escherichia coli* in the human gut. *Journal of Bacteriology*, 206(1), e00239-23. <https://doi.org/10.1128/jb.00239-23>
- Hartland, Elizabeth L., Sarah J. Daniell ... Robin M. Delahay (2000). The Type III Protein Translocation System of Enteropathogenic *Escherichia Coli* Involves EspA–EspB Protein Interactions. *Molecular Microbiology* 35(6), 1483-92. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01814.x>.
- Huang, Tingting, Yuhang Zhou, Jinglin Zhang, Chi Chun Wong, Weilin Li, Johnny S. H. Kwan ... Rui Yang (2018). SRGAP1, a Crucial Target of miR-340 and miR-124,

- Functions as a Potential Oncogene in Gastric Tumorigenesis. *Oncogene* 37(9), 1159-74. <https://doi.org/10.1038/s41388-017-0029-7>.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (2004). The RhaS activator controls the *Erwinia chrysanthemi* 3937 genes *rhiN*, *rhiT* and *rhiE* involved in rhamnogalacturonan catabolism. *Molecular Microbiology*, 51(5), 1361–1374. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03908.x>
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, Nicole, Guy Condemine, y Vladimir E. Shevchik (2014). Bacterial Pectate Lyases, Structural and Functional Diversity. *Environmental Microbiology Reports* 6(5), 427-40. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12166>.
- Hugouvieux-Cotte-Pattat, Nicole, Nicolas Blot, y Sylvie Reverchon (2001). Identification of TogMNAB, an ABC Transporter Which Mediates the Uptake of Pectic Oligomers in *Erwinia Chrysanthemi* 3937. *Molecular Microbiology* 41(5), 1113-23. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02564.x>.
- Hunke, S., Keller, R., y Müller, V. S. (2012). Signal integration by the Cpx-envelope stress system. *FEMS Microbiology Letters*, 326(1), 12–22. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02436.x>
- Ibarra, J. A., García-Zacarias, C. M., Lara-Ochoa, C., Carabarin-Lima, A., Tecpanecatl-Xihuitl, J. S., Perez-Rueda, E., Martínez-Laguna, Y., y Puente, J. L. (2013). Further Characterization of Functional Domains of PerA, Role of Amino and Carboxy Terminal Domains in DNA Binding. *PLoS ONE*, 8(2), e56977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056977>
- Ibarra, J. A., Villalba, M. I., y Puente, J. L. (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), 2835–2847. <https://doi.org/10.1128/JB.185.9.2835-2847.2003>
- iFrag. (2011). *Protein-protein binding site prediction server based on common minimal sequence fragments with known interacting protein pairs*. iFrag Server. <http://sbi.imim.es/web/index.php/research/servers/iFrag>
- Jimenez, R., Cruz-Migoni, S. B., Huerta-Saquero, A., Bustamante, V. H., and Puente, J. L. (2010). Molecular characterization of GrlA, a specific positive regulator of *ler* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 192, 4627–4642. <https://doi.org/10.1128/JB.00307-10>
- Johnson, J. R., Gajewski, A., Lesse, A. J., y Russo, T. A. (2003). Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* as a Cause of Invasive Nonurinary Infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(12), 5798–5802. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.12.5798-5802.2003>
- Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer,

- C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), Article 7873. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., y Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), Article 2. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Kaur, P., y Dudeja, P. K. (2023). Pathophysiology of Enteropathogenic *Escherichia coli*-induced Diarrhea. *Newborn (Clarksville, Md.)*, 2(1), 102–113. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-11002-0056>
- Keegan, M., Siegelmann, H. T., Rietman, E. A., Klement, G. L., y Tuszynski, J. A. (2021). Gibbs Free Energy, a Thermodynamic Measure of Protein–Protein Interactions, Correlates with Neurologic Disability. *BioMedInformatics*, 1(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/biomedinformatics1030013>
- Kenny, Brendan, Li-Ching Lai, B. Brett Finlay, y Michael S. Donnenberg (1996). EspA, a Protein Secreted by Enteropathogenic *Escherichia coli*, Is Required to Induce Signals in Epithelial Cells. *Molecular Microbiology* 20(2), 313-23. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02619.x>.
- Knappstein, Sabine, Tina Ide, M. Alexander Schmidt, y Gerhard Heusipp (2004).  $\alpha_1$ -Antitrypsin Binds to and Interferes with Functionality of EspB from Atypical and Typical Enteropathogenic *Escherichia Coli* Strains. *Infection and Immunity* 72(8), 4344-50. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.8.4344-4350.2004>.
- Krell, T., Molina-Henares, A. J., y Ramos, J. L. (2006). The IclR family of transcriptional activators and repressors can be defined by a single profile. *Protein Science*, 15(5), 1207–1213. <https://doi.org/10.1110/ps.051857206>
- Kuijpers, T (2014). Fc-Dependent Mechanisms of Action: Roles of Fc $\gamma$ R and FcRn: Fc-Dependent Mechanisms of Action. *Clinical & Experimental Immunology* 178 (89-91), <https://doi.org/10.1111/cei.12524>.
- Lara-Ochoa, C. (2023). “*Caracterización de GrlR, un regulador negativo de la expresión de los genes LEE en Escherichia coli enteropatógena*” [Tesis para obtener Doctorado, UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO] Repositorio institucional.
- Lara-Ochoa, C., González-Lara, F., Romero-González, L. E., Jaramillo-Rodríguez, J. B., Vázquez-Arellano, S. I., Medrano-López, A., Cedillo-Ramírez, L., Martínez-Laguna, Y., Girón, J. A., Pérez-Rueda, E., Puente, J. L., y Ibarra, J. A. (2021). The transcriptional activator of the bfp operon in EPEC (PerA) interacts with the RNA polymerase alpha subunit. *Scientific Reports*, 11(1), 8541. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-87586-0>

- Lara-Ochoa, C., Huerta-Saquero, A., Medrano-López, A., Deng, W., Finlay, B. B., Martínez-Laguna, Y., y Puente, J. L. (2023). GrlR, a negative regulator in enteropathogenic *E. coli*, also represses the expression of LEE virulence genes independently of its interaction with its cognate partner GrlA. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1063368>
- Lee, J. B., Kim, S. K., y Yoon, J. W. (2022). Pathophysiology of enteropathogenic *Escherichia coli* during a host infection. *Journal of Veterinary Science*, 23(2), e28. <https://doi.org/10.4142/jvs.21160>
- Lee, Dong Hwan, Jeong-A Lim... Juneok Lee (2013). Characterization of Genes Required for the Pathogenicity of *Pectobacterium Carotovorum* Subsp. *Carotovorum* Pcc21 in Chinese Cabbage. *Microbiology* 159(Pt\_7), 1487-96. <https://doi.org/10.1099/mic.0.067280-0>.
- Levine, M. M., Bergquist, E. J., Nalin, D. R., Waterman, D. H., Hornick, R. B., Young, C. R., & Sotman, S. (1978). *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* (London, England), 1(8074), 1119–1122. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(78\)90299-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(78)90299-4)
- Lin, David Yin-wei, Jianbo Diao, Daoguo Zhou, y Jue Chen (2011). Biochemical and Structural Studies of a HECT-like Ubiquitin Ligase from *Escherichia Coli* O157:H7. *Journal of Biological Chemistry* 286(1), 441-49. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.167643>.
- Lindgren, P. B. (1997). The role of hrp genes during plant-bacterial interactions. *Annual Review of Phytopathology*, 35, 129–152. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.35.1.129>
- Lineweaver, H., y Burk, D. (1934). The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, 56(3), 658–666. <https://scientiablog.com/wp-content/uploads/2011/06/jacs125.pdf>
- Liu, Y., Jiang, G., Cui, Y., Mukherjee, A., Ma, W. L., y Chatterjee, A. K. (1999). kdgREcc Negatively Regulates Genes for Pectinases, Cellulase, Protease, HarpinEcc, and a Global RNA Regulator in *Erwinia carotovora subsp. Carotovora*. *Journal of Bacteriology*, 181(8), 2411–2421. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC93665/>
- Lu, Y., Rashidul, I. M., Hirata, H., y Tsuyumu, S. (2011). KdgR, an ICIR Family Transcriptional Regulator, Inhibits Virulence Mainly by Repression of *hrp* Genes in *Xanthomonas oryzae pv. Oryzae* | *Journal of Bacteriology*. 193(23). <https://doi.org/doi/10.1128/jb.05714-11>
- Machava, Norgia Elsa, Elsa Maria Salvador, y Fhumulani Mulaudzi (2022). Assessment of diagnosis and treatment practices of diarrhoea in children under

- five in Maputo-Mozambique. *International Journal of Africa Nursing Sciences*, 17, <https://doi.org/10.1016/j.ijans.2022.100507>.
- Magana Gomez, P. G., y Kovalevskiy, O. (2024, marzo 6). AlphaFold: A practical guide. *EMBL-EBI*. <https://doi.org/10.6019/TOL.AlphaFold-w.2024.00001.1>
- Marks, C. (2015, agosto 19). *Bucles de proteínas: ¿por qué nos importa?* | Grupo de Informática de Proteínas de Oxford. <https://www.blopiq.com/blog/2015/08/protein-loops-why-do-we-care/>
- Martínez-Laguna, Y., Calva, E., y Puente, J. L. (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), 153–166. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01460.x>
- Mellies, J. L., Barron, A. M. S., y Carmona, A. M. (2007). Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Virulence Gene Regulation. *Infection and Immunity*, 75(9), 4199–4210. <https://doi.org/10.1128/IAI.01927-06>
- Mellies, J. L., Platenkamp, A., Osborn, J., y Ben-Avi, L. (2017). PerC Manipulates Metabolism and Surface Antigens in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00032>
- Miller, S.A., D.D. Dykes, y H.F. Polesky (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3): 1215. <https://doi.org/10.1093/nar/16.3.1215>.
- Mirdita, M., Schütze, K., Moriwaki, Y., Heo, L., Ovchinnikov, S., y Steinegger, M. (2022). ColabFold: Making protein folding accessible to all. *Nature Methods*, 19(6), 679–682. <https://doi.org/10.1038/s41592-022-01488-1>
- Mohan, Supraja, Prasanna Kumar Selvam, y Karthick Vasudevan (2025). Transcriptomic Insights into slyA-Mediated Regulation of Motility and Secretion in *Escherichia Coli*. *Antonie van Leeuwenhoek* 118(8), 109. <https://doi.org/10.1007/s10482-025-02119-3>.
- Mole, B., Habibi, S., Dangl, J. L., y Grant, S. R. (2010). Gluconate Metabolism Is Required for Virulence of the Soft-Rot Pathogen *Pectobacterium carotovorum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 23(10), 1335–1344. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-10-0067>
- Molina-Henares, A. J., Krell, T., Eugenia Guazzaroni, M., Segura, A., y Ramos, J. L. (2006). Members of the IclR family of bacterial transcriptional regulators function as activators and/or repressors. *FEMS Microbiology Reviews*, 30(2), 157–186. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2005.00008.x>

- Monk, Jonathan M., Anna Koza, Miguel A. Campodonico, Daniel Machado, Jose Miguel Seoane, Bernhard O. Palsson, Markus J. Herrgård, y Adam M. Feist (2016). Multi-Omics Quantification of Species Variation of *Escherichia Coli* Links Molecular Features with Strain Phenotypes. *Cell Systems* 3(3), 238-251.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.08.013>.
- Morales-Rodriguez, R. (Ed.). (2012). *Thermodynamics: Fundamentals and Its Application in Science*. IntechOpen.
- Mueller, M., y Tainter, C. R. (2023). *Escherichia coli* Infection. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>
- Murakmai, Y., y Mizuguchi, K. (2013, enero 3). *PSOPIA - Prediction Server of Protein-Protein Interactions* [PSOPIA]. PSOPIA. <https://psopia.mizuguchilab.org/PSOPIA/theory.html>
- Murray, E. L., y Conway, T. (2005). Multiple Regulators Control Expression of the Entner-Doudoroff Aldolase (Eda) of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 187(3), 991–1000. <https://doi.org/10.1128/jb.187.3.991-1000.2005>
- Neves, Bianca C., Rosanna Mundy, Liljana Petrovska, Gordon Dougan, Stuart Knutton, y Gad Frankel. «CesD2 of Enteropathogenic *Escherichia Coli* Is a Second Chaperone for the Type III Secretion Translocator Protein EspD». *Infection and Immunity* 71, n.º 4 (2003): 2130-41. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.4.2130-2141.2003>.
- New England. (2025). *BL21(DE3) Competent E. coli* | NEB [Product Information]. BL21(DE3) Competent *E. coli*. <https://www.neb.com/en/products/c2527-bl21de3-competent-e-coli>
- Ochoa, T. J., y Contreras, C. A. (2011). Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children: *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24(5), 478–483. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834a8b8b>
- Okeke, I. N., Borneman, J. A., Shin, S., Mellies, J. L., Quinn, L. E., y Kaper, J. B. (2001). Comparative Sequence Analysis of the Plasmid-Encoded Regulator of Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains. *Infection and Immunity*, 69(9), 5553–5564. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5553-5564.2001>
- Oliva, B. (2023). *iFrag* [iFrag submission]. Structural Bioinformatics Lab. <https://sbi.imim.es/web/index.php/members/boliva>
- OMS. (2023, diciembre 9). *Las 10 principales causas de defunción*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>
- Otsu, Wataru, Takao Kurooka, Yayoi Otsuka, Kota Sato, y Mutsumi Inaba (2013). A New Class of Endoplasmic Reticulum Export Signal  $\Phi X \Phi X \Phi$  for Transmembrane

- Proteins and Its Selective Interaction with Sec24C. *Journal of Biological Chemistry*, 288(25), 18521-32. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.443325>.
- Pakbin, B., Brück, W. M., y Rossen, J. W. A. (2021). Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(18), 9922. <https://doi.org/10.3390/ijms22189922>
- Pearson, J. S., Giogha, C., Wong Fok Lung, T., y Hartland, E. L. (2016). The Genetics of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence. *Annual Review of Genetics*, 50(1), 493–513. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-120215-035138>
- Peekhaus, N, y Conway, T. (1998). What's for Dinner? Entner-Doudoroff Metabolism in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 180(14), 3495–3502. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC107313/>
- Pereira, Mateus Sudario, Diego Lucas Neres Rodrigues ... Juan Carlos Ariute (2024). Beyond the Basics: Taxonomic Classification and Pathogenomics in Recently Discovered *Dickeya Dadantii* Isolates. *Taxonomy*, 4(4), 696-712. <https://doi.org/10.3390/taxonomy4040036>.
- Platenkamp, A., y Mellies, J. L. (2018). Environment Controls LEE Regulation in Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1694. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01694>
- Porter, M. E., Mitchell, P., Free, A., Smith, D. G. E., y Gally, D. L. (2005). The LEE1 Promoters from both Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Can Be Activated by PerC-Like Proteins from Either Organism. *Journal of Bacteriology*, 187(2), 458–472. <https://doi.org/10.1128/jb.187.2.458-472.2005>
- Porter, M. E., Mitchell, P., Roe, A. J., Free, A., Smith, D. G. E., y Gally, D. L. (2004). Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, PerA from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 54(4), 1117–1133. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04333.x>
- Rensing, C., B. Fan, R. Sharma, B. Mitra, y B. P. Rosen (2000). CopA: An *Escherichia coli* Cu(I)-Translocating P-Type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(2), 652-56. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.652>.
- Reverchon, S., Expert, D., Robert-Baudouy, J., y Nasser, W. (1997). The cyclic AMP receptor protein is the main activator of pectinolysis genes in *Erwinia chrysanthemi*. *Journal of Bacteriology*, 179(11), 3500–3508. <https://doi.org/10.1128/jb.179.11.3500-3508.1997>
- Reverchon, S., Nasser, W., y Robert-Baudouy, J. (1991). Characterization of *kdgR*, a gene of *Erwinia chrysanthemi* that regulates pectin degradation. *Molecular Microbiology*, 5(9), 2203–2216. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb02150.x>

- Rodionov, D. A., Gelfand, M. S., y Hugouvieux-Cotte-Pattat, N. (2004). Comparative genomics of the KdgR regulon in *Erwinia chrysanthemi* 3937 and other gamma-proteobacteria. *Microbiology*, 150(11), 3571–3590. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27041-0>
- Saldaña, Z., Erdem, A. L., Schüller, S., Okeke, I. N., Lucas, M., Sivananthan, A., Phillips, A. D., Kaper, J. B., Puente, J. L., y Girón, J. A. (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), 3451–3461. <https://doi.org/10.1128/jb.01539-08>
- Santiago, A. E., Yan, M. B., Tran, M., Wright, N., Luzader, D. H., Kendall, M. M., Ruiz-Perez, F., y Nataro, J. P. (2016). A large family of anti-activators accompanying XylS/AraC family regulatory proteins. *Molecular Microbiology*, 101(2), 314–332. <https://doi.org/10.1111/mmi.13392>
- Scaletsky, I. C. A. (2019). Enteropathogenic *Escherichia coli*. En *The Universe of Escherichia coli*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.82861>
- Serapio-Palacios, A., y Finlay, B. B. (2020). Dynamics of expression, secretion and translocation of type III effectors during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Current Opinion in Microbiology*, 54, 67–76. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.12.001>
- Sircili, M. P., Walters, M., Trabulsi, L. R., y Sperandio, V. (2004). Modulation of Enteropathogenic *Escherichia coli* Virulence by Quorum Sensing. *Infection and Immunity*, 72(4), 2329–2337. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.4.2329-2337.2004>
- Stolt, P., Q. Zhang, y S. Ehlers (1999). Identification of Promoter Elements in Mycobacteria: Mutational Analysis of a Highly Symmetric Dual Promoter Directing the Expression of Replication Genes of the Mycobacterium Plasmid pAL5000>. *Nucleic Acids Research*, 27(2), 396-402. <https://doi.org/10.1093/nar/27.2.396>.
- Sutherland, C., y Murakami, K. S. (2018). An Introduction to the Structure and Function of the Catalytic Core Enzyme of *Escherichia coli* RNA Polymerase. *EcoSal Plus*, 8(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0004–2018. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0004-2018>
- Taylor-Parker, Julian (2015). Plasmids 101: *E. coli* Strains for Protein. <https://blog.addgene.org/plasmids-101-e-coli-strains-for-protein-expression>.
- Tejeda-Dominguez, Farid, Jazmin Huerta-Cantillo, Lucia Chavez-Dueñas, y Fernando Navarro-Garcia (2017). A Novel Mechanism for Protein Delivery by the Type 3 Secretion System for Extracellularly Secreted Proteins. *mBio*, 8(2) e00184-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00184-17>.
- Tesfai, Adiam T., Sarah K. Beamer, Kristen E. Matak, y Jacek Jaczynski (2011). Radioresistance Development of DNA Repair Deficient *Escherichia Coli* DH5α in

- Ground Beef Subjected to Electron Beam at Sub-Lethal Doses. *International Journal of Radiation Biology*, 87(6), 571-78. <https://doi.org/10.3109/09553002.2011.565400>.
- ThermoFisher, T. (2025). *Life Technologies—MX*. pBAD-Myc-His. <https://www.thermofisher.com/mx/es/home.html>
- Timilsina, Sujana, Neha Potnis ... Eric A. Newberry (2020). Xanthomonas Diversity, Virulence and Plant-Pathogen Interactions». *Nature Reviews Microbiology*, 18(8), 415-27. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0361-8>.
- Tobe, T., Hayashi, T., Han, C.-G., Schoolnik, G. K., Ohtsubo, E., y Sasakawa, C. (1999). Complete DNA Sequence and Structural Analysis of the Enteropathogenic Escherichia coli Adherence Factor Plasmid. *Infection and Immunity*, 67(10), 5455-5462. <https://doi.org/10.1128/iai.67.10.5455-5462.1999>
- Tormay, Peter, Anthony R. M. Coates, y Brian Henderson (2005). The Intercellular Signaling Activity of the Mycobacterium Tuberculosis Chaperonin 60.1 Protein Resides in the Equatorial Domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(14), 14272-77. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414158200>.
- Tramonti, Angela, Paolo Visca, Michele De Canio, Maurizio Falconi, y Daniela (2002). De Biase. Functional Characterization and Regulation of *gadX*, a Gene Encoding an AraC/XylS-Like Transcriptional Activator of the *Escherichia Coli* Glutamic Acid Decarboxylase System. *Journal of Bacteriology* 184(10), 2603-13. <https://doi.org/10.1128/JB.184.10.2603-2613.2002>.
- Troeger, C., Blacker, B. F., Khalil, I. A., Rao, P. C., Cao, S., Zimsen, S. R., Albertson, S. B., Stanaway, J. D., Deshpande, A., Abebe, Z., Alvis-Guzman, N., Amare, A. T., Asgedom, S. W., Anteneh, Z. A., Antonio, C. A. T., Aremu, O., Asfaw, E. T., Atey, T. M., Atique, S., ... Reiner, R. C. (2018). Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Infectious Diseases*, 18(11), 1211-1228. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30362-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30362-1)
- UNICEF. (01/24). *Diarrhoea*. - UNICEF DATA. <https://data.unicef.org/topic/child-health/diarrhoeal-disease/>
- Vallance, B. A., y Finlay, B. B. (2000). Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8799-8806. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.16.8799>
- Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G., Yuan, D., Stroe, O., Wood, G., Laydon, A., Žídek, A., Green, T., Tunyasuvunakool, K., Petersen, S., Jumper, J., Clancy, E., Green, R., Vora, A., Lutfi, M., ... Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: Massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy

- models. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D439–D444. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>
- Vidal, J. E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., y Navarro-García, F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Pública de México*, 49(5), 376–386. [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_abstractypid=S0036-36342007000500008yInq=esynrm=isoytInq=es](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstractypid=S0036-36342007000500008yInq=esynrm=isoytInq=es)
- Vidal-Graniel, J. E. (2003). *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil. 9(1).
- Wang, H., Wang, Y., Humphris, S., Nie, W., Zhang, P., Wright, F., Campbell, E., Hu, B., Fan, J., y Toth, I. (2020). *Pectobacterium atrosepticum* KDPG aldolase, *Eda*, participates in the Entner–Doudoroff pathway and independently inhibits expression of virulence determinants—Wang—2021—Molecular Plant Pathology—Wiley Online Library. Vol. 22(2), p.271-283. <https://doi.org/10.1111/mpp.13025>
- WHO. (2024, marzo 7). *Diarrhoeal disease*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>
- Woodcock, D. M., Crowther, P. J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S. S., Michael, M. Z., y Graham, M. W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Research*, 17(9), 3469–3478. <https://doi.org/10.1093/nar/17.9.3469>
- Wu, Bin, Tatiana Skarina ... Adelinda Yee (2010). NleG Type 3 Effectors from Enterohaemorrhagic *Escherichia Coli* Are U-Box E3 Ubiquitin Ligases». *PLoS Pathogens*, 6(6), e1000960. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000960>.
- Yamani, L. Z., y Elhadi, N. (2022). Virulence Characteristics, Antibiotic Resistance Patterns and Molecular Typing of Enteropathogenic Producing *Escherichia coli* (EPEC) Isolates in Eastern Province of Saudi Arabia: 2013yndash;2014. *Infection and Drug Resistance*, 15, 6763–6772. <https://doi.org/10.2147/IDR.S388956>
- Yang, H.-C., Cheng, J., Finan, T. M., Rosen, B. P., y Bhattacharjee, H. (2005). Novel pathway for arsenic detoxification in the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 187(20), 6991–6997. <https://doi.org/10.1128/JB.187.20.6991-6997.2005>
- Yang, Hung-Chi, JiuJun Cheng, Turlough M. Finan, Barry P. Rosen, y Hiranmoy Bhattacharjee (2005). Novel Pathway for Arsenic Detoxification in the Legume Symbiont *Sinorhizobium Meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 187(20), 6991-97. <https://doi.org/10.1128/JB.187.20.6991-6997.2005>.

- Ye, Meiping, Chunjie Liao, Mengya (2022). Reduced Virulence and Enhanced Host Adaption during Antibiotics Therapy: A Story of a Within-Host Carbapenem-Resistant *Klebsiella Pneumoniae* Sequence Type 11 Evolution in a Patient with a Serious Scrotal Abscess». *mSystems*, 7(2), e01342-21. <https://doi.org/10.1128/msystems.01342-21>.
- Yugandhar, K., y Gromiha, M. M. (2014). Protein–protein binding affinity prediction from amino acid sequence. *Bioinformatics*, 30(24), 3583–3589. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu580>
- Yugandhar, K., y Gromiha, M. M. (2015). Response to the comment on ‘protein-protein binding affinity prediction from amino acid sequence’. *Bioinformatics*, 31(6), 978. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu821>
- Zhang, R., Kim, Y., Skarina, T., Beasley, S., Laskowski, R., Arrowsmith, C., Edwards, A., Joachimiak, A., y Savchenko, A. (2002). Crystal Structure of *Thermotoga maritima* 0065, a Member of the IclR Transcriptional Factor Family \*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(21), 19183–19190. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112171200>

## 12. Anexos

### Formato FASTA de *kdgR*

>FM180568.1:2008282-2009073 Escherichia coli 0127:H6 E2348/69 complete genome, strain E2348/69

```
TCAGAACGGATAGTCGTGATAACCCATTTGGGCAGAAATTTTGC GCGCCGCGGTATGCAACAT
TGCGACATATTCCTGTAAACGCTCTTCAGAGAAACGTAACGTCGGGAAGGAGATGCTCAAACC
GGCAATGACCACGCCAAAGCGATCAAATACCGGAACCGCAATGCATCGCAGCCCTTCTTCCTG
CTCTTCATTATCTTCGCCATACCCCTGCTCGCGCACCTGGTCCAGAACGGGTAATAACGCTTCT
GTACTGGTGATGGTCCGCTCGGTACTGCGTTTATACTCCACGCCCTCAAGAATTTGCATCACTT
CATCGCGATCGCGCCATGCCAGCAGTACCTTACCAATCGCGGTGCTGTACAGCGGATTACGA
CGCCCAATCCGTGAATACATGCGCAAATTGTACATTGAGTCAATTTTGTGGATGTAAACAATAC
TGTCTTCGTCCAGTGCGCCGAGGTGGATAGTTTCTTTGGTCAGGCGGGAGATCTCACGCATCT
GGATATCTGCGCTACGAATTAATCGACGTTTTGCAACGCGCGAGCGCCCAGTTCAAACAATT
TCAGGGTCAGCGAATATTTCTCCGACTCCCCTTCTGCGCCACATAACCTAAGGTTTTCATGGT
CTGTAAAAAGCGATAAACGGTGCTTTTTGACATCATGACGCGCTGCGACAACCTCGGTTATCCCT
ATTTGCGGCTCTTCACCCAGCGCCTGCAAATGCCAAAAACTTTTAGCACGGAAGATACAGAAT
CAGGCTGTTTATCCAGATCTGCGTTAGCCAT
```

### Antiparalela

```
ATGGCTAACGCAGATCTGGATAAACAGCCTGATTCTGTATCTTCCGTGCTAAAAGTTTTTGGCA
TTTTGCAGGCGCTGGGTGAAGAGCGCGAAATAGGGATAACCGAGTTGTTCGCAGCGCGTCATG
ATGTCAAAAAGCACCGTTTATCGCTTTTTACAGACCATGAAAACCTTAGGTTATGTGGCGCAGG
AAGGGGAGTCGGAGAAATATTCGCTGACCCTGAAATTGTTTGAACCTGGGCGCTCGCGCGTTG
CAAACGTCGATTTAATTCGTAGCGCAGATATCCAGATGCGTGAGATCTCCCGCCTGACCAAA
GAACTATCCACCTCGGCGCACTGGACGAAGACAGTATTGTTTACATCCACAAAATTGACTCAA
TGTACAATTTGCGCATGTATTCACGGATTGGGCGTCGTAATCCGCTGTACAGCACCGCGATTG
GTAAGGTAAGTACTGCTGGCATGGCGCGATCGCGATGAAGTGATGCAAATTTGAGGGCGTGGAG
TATAACGCAGTACCGAGCGGACCATCACAGTACAGAAGCGTTATTACCCGTTCTGGACCAG
GTGCGCGAGCAGGGGTATGGCGAAGATAATGAAGAGCAGGAAGAAGGGCTGCGATGCATTG
CGGTTCCGGTATTTGATCGCTTTGGCGTGGTCATTGCCGTTTGGAGCATCTCCTTCCCGACGT
TACGTTTCTCTGAAGAGCGTTTACAGGAATATGTGCGAATGTTGCATACCGCGGCGCGCAAAA
TTTTGCCCCAAATGGGTTATCACGACTATCCGTTCTGA
```

## Secuencia proteica de KdgR

>CAS09500.1 predicted DNA-binding transcriptional regulator [*Escherichia coli* O127:H6 str. E2348/69]

MANADLDKQPDSVSSVLKVFILQALGEEREIGITELSQRVMMSKSTVYRFLQTMKTLGYVAQEGE  
SEKYSLLTKLFELGARALQNVDLIRSADIQMREISRLTKETIHLGALDEDSIVYIHKIDSMYNLRMYSRI  
GRRNPLYSTAIGKVLLAWRDRDEVMQILEGVEYKRSTERTITSTEALLPVLDQVREQGYGEDNEEQ  
EEGLRCIAVPVDFRFGVVIAGLSISFPTLRFSEERLQEYVAMLHTAARKISAQMGYHDYPF

## Secuencia proteica de PerA

>CAS07456.1 transcriptional activator of the bfp operon (plasmid) [*Escherichia coli* O127:H6 str. E2348/69]

MLTSKEMQSSSENKQEENLALLLTNYISYQNIVIFTGGNQFKIRNKKEFTEYTIENSLFFLAKNTHW  
DMEIVGIDNSNPYRKIIIDDALIKLLHSISSDDSCYVKKKIFTANLNEMQLNIVSNIITDIKYSGNKKIFKI  
LYLLSFFNDYNDIVNVILSASSKSIVDRVIKVIELDISKNWKLGDVSSSMFMSDCLRKQLNKENLTFK  
KIMLDIKMKHASLFLRTTDKNIDEISCLVGFNSTSYFIKVFKEYYNTTPKKYNGVYSITQGTLP

**Tabla 1 anexo: SDS-Page**

Reactivo	Gel separador	Gel concentrador
	Cantidad	Cantidad
H2O	5 mL	4.1 mL
30% MIX ACRILAMIDA	5 mL	2 mL
Tris pH 6.8	3.8 mL	150 µL
APS	150 µL	60 µL
TEMED	16 µL	6 µL
Total (1 gel)	15 mL	6 mL

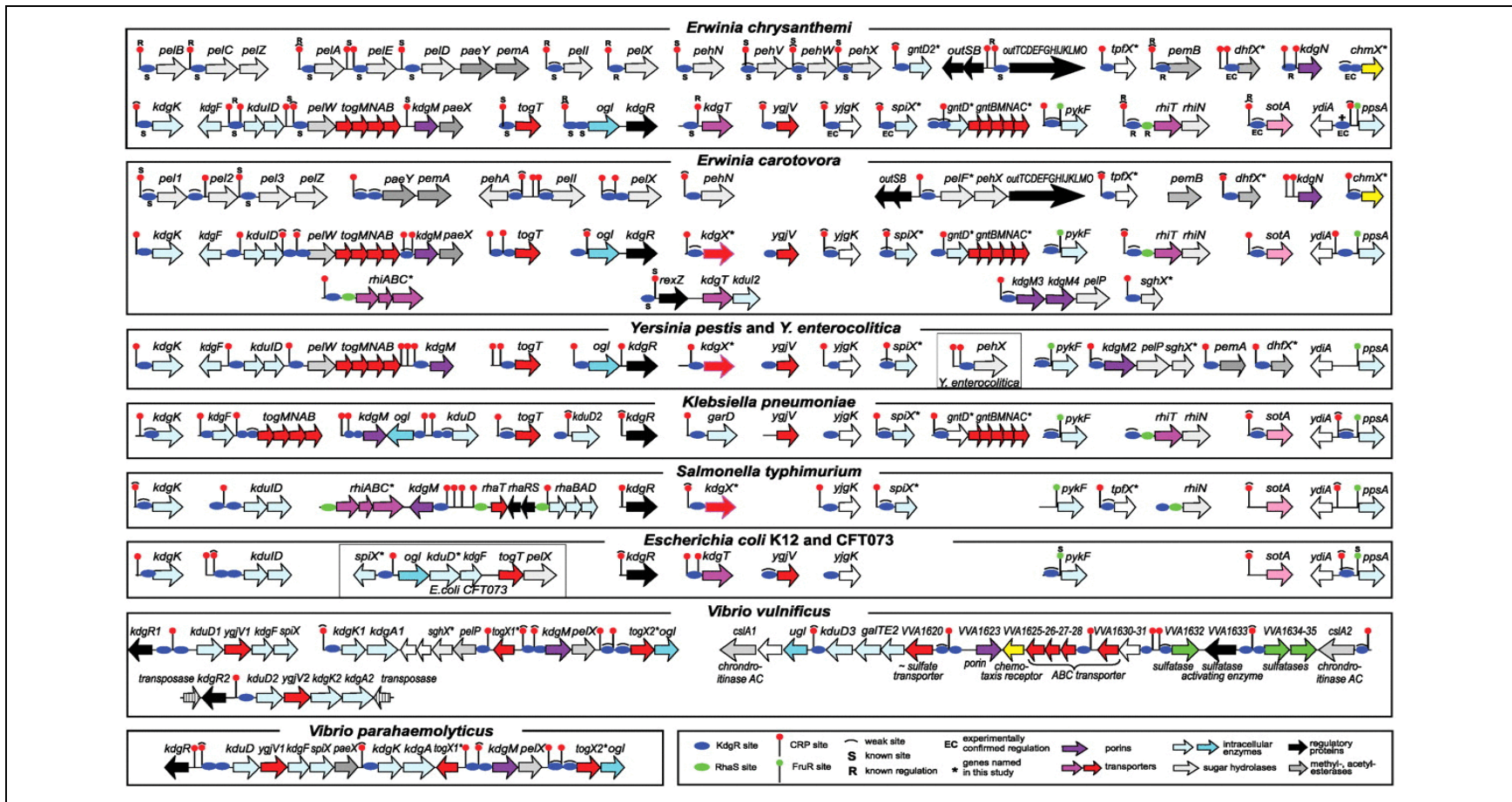
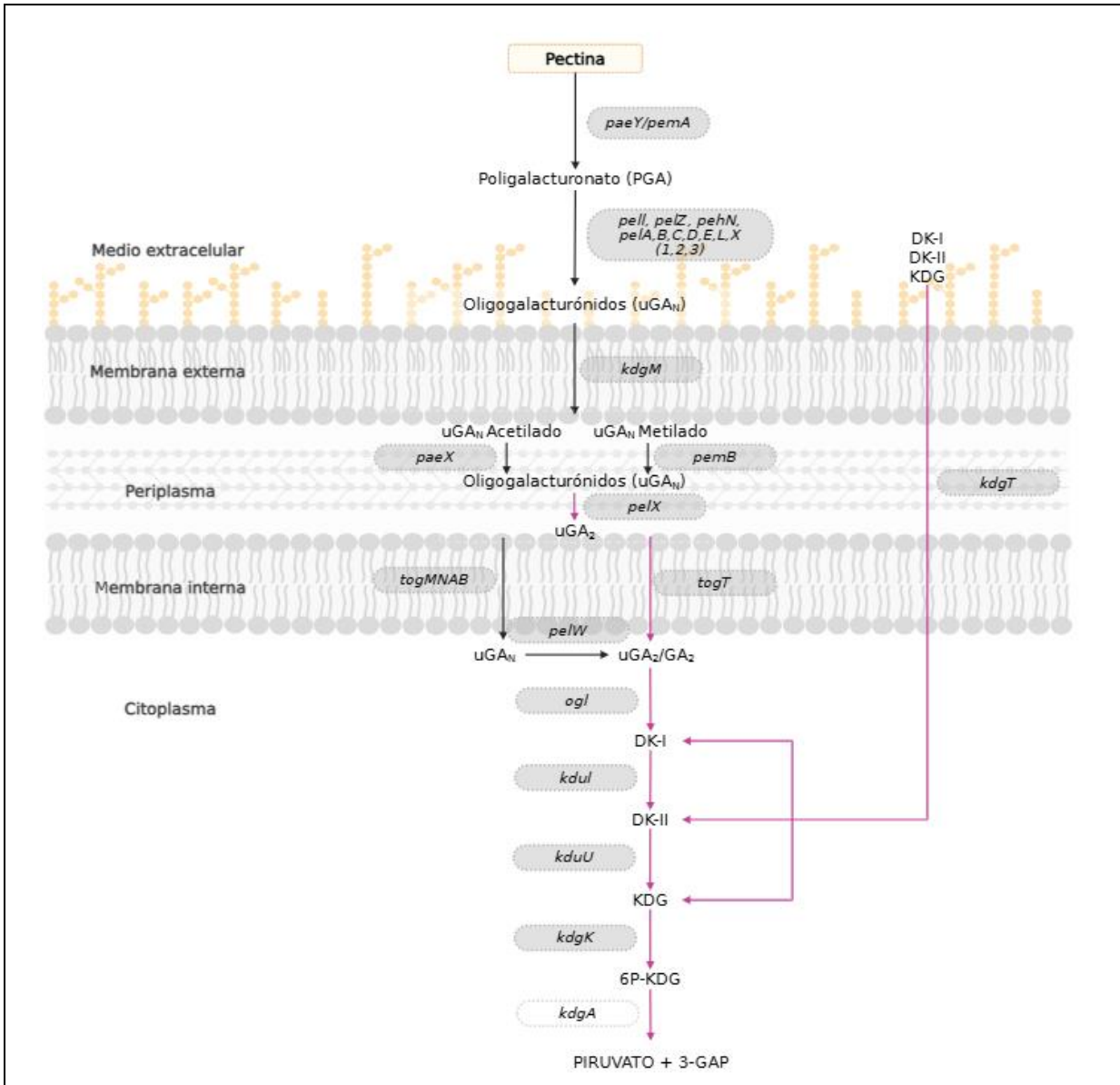


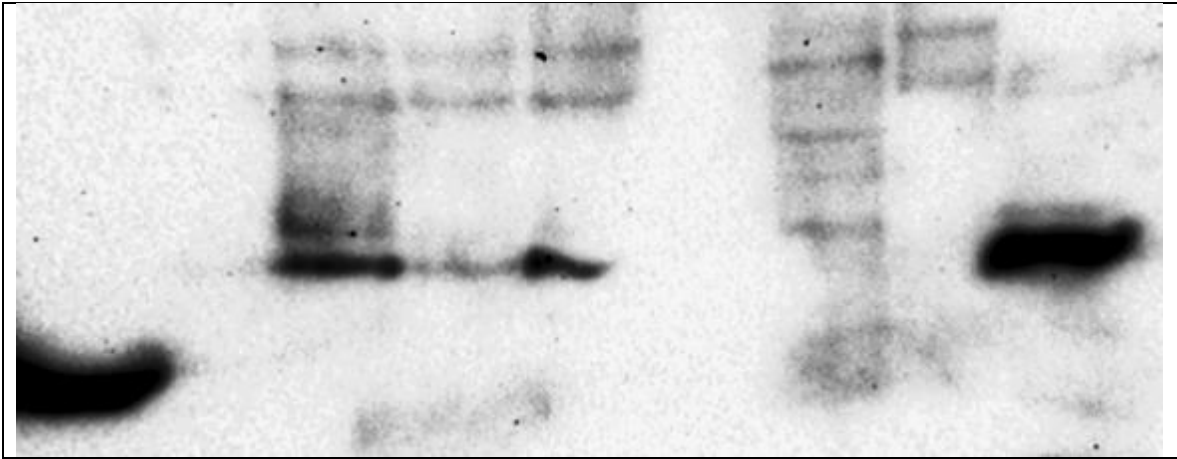
Figura 1 Anexo: predicción de estructuras de operones y sitios de reguladores para los regulones de KdgR en enterobacterias y especies de Vibrio.

KdgR se caracteriza por ser responsable de la regulación coordinada de varios genes en presencia de pectina. En análisis *in vitro* se ha encontrado que KdgR interactúa directamente con las regiones promotoras de una amplia gama de genes objetivo, siendo así no solo responsable de la regulación de la pectolisis. Los genes presentados en el presente esquema fueron obtenidos por genómica comparativa del regulón KdgR en una variedad de bacterias (Rodionov *et al.*, 2004). Lectura recomendada: Comparative genomics of the KdgR regulon in *Erwinia chrysanthemi* 3937 and other gamma-proteobacteria. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.27041-0>.



**Figura 2 Anexo: Regulación por KdgR en las principales vías catabólicas de la pectina en *Escherichia coli*.**

La figura representa el resultado de estudios realizados por Rodionov *et al.*, con enfoques bioinformáticos y experimentales para reconstruir y comparar las vías de degradación de pectina y los regulones de KdgR en *Escherichia coli*. Los genes regulados por KdgR están resaltados en gris. Las fechas moradas simbolizan la presencia de enzima/transportador en *Escherichia coli*. Ver texto para más detalle (Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, a.2014; Rodionov *et al.*, 2004; Hugouvieux-Cotte-Pattat *et al.*, 2001). Para conocer más sobre las operones y sitios de regulación de KdgR ver anexos.



**Figura 3 Anexo: Interacción entre KdgR-6XH y MBP-PerA.**

Western Blot de la interacción entre KdgR-6XH y MBP-PerA. Se identificó a KdgR-6XH mediante anticuerpos  $\alpha$ -histidina, a MBP y MBP-PerA mediante  $\alpha$ -conejo. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular (MPM), el carril 2 corresponde a las perlas recubiertas de resina + el extracto total de KdgR, el carril 3 corresponde a las perlas de resina incubadas con MBP y KdgR. El carril 4 corresponde a las perlas de resina incubadas con PerA y KdgR. El carril 5 corresponde al extracto total de la inducción de MBP, el carril 6 corresponde al extracto total de la inducción de MBP-PerA y el carril 7 corresponde al extracto total de KdgR.