BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

Estudio de las interacciones proteicas entre el activador de virulencia PerA y reguladores transcripcionales en *Escherichia coli* enteropatógena

Tesis presentada para obtener el grado de:

Licenciado en Biomedicina

Presenta:

Jesús Rodrigo Morales Baéz

Directora de tesis:

D.C. Cristina Lara Ochoa

Diciembre, 2024

Agradecimientos

A mis padres tan queridos: Norma Baéz Ruíz y Jorge Morales Ríos. Estaré siempre orgulloso de ser su hijo y haré que sientan lo mismo por mí. Por su admirable fortaleza, apoyo y amor. A mis hermanos Tadeo y Nataly por alegrar mis días y su gran cariño. A todos ellos gracias por todo el trabajo, tiempo que han invertido en nuestra familia.

A mi mejor amiga, compañera y novia Zara Ekatherina Elizalde Zagoya, que ha estado presente desde el inicio de nuestra amistad hasta los días presentes, por su gran cariño, atención y amor. Agradezco a la vida conocerte y que te hayas convertido en una persona muy importante para mí.

A mis tíos Mario y Guillermo por preocuparse por mí, enseñarme a trabajar, a mis tías Beatriz, Marlín por ofrecerme siempre algo que comer. A mis abuelos paternos y maternos, en especial a mi abuelita Lupita que ya no está presente en vida pero si en mi corazón.

A mi tutora: Gracias Dra. Cristina por aceptarme en el proyecto del que forme parte, por aprender una infinidad de cosas dentro y fuera del laboratorio. Gracias por confiar en mi trabajo y en las propuestas que llegue a hacer, a pesar de los largos retrasos y el apoyo. Un gran agradecimiento por sus consejos, enseñanzas, por las pláticas fuera del laboratorio y por las convivencias que organizó entre los compañeros. Admiró su fortaleza y la calidad de persona que es, enfrentando la adversidad.

Al D.C. Sergio Ramos Ramos por tomarse el tiempo para escuchar mi propuesta del proyecto y apoyarme con los análisis bioinformáticos del proyecto.

A la señora Rosi, por sus atenciones, amabilidad dentro del laboratorio. A Gaby, Sixta, Rebeca, Edvin, Nitza y otras personas que han pasado por el Centro de Detección Biomolecular que hicieron de mi estancia en el laboratorio una familia.

Y finalmente a mí, por continuar mi camino y enfrentar lo que me prepara la vida.

A mi comité revisor: la D.C. María del Roció Bustillos Cristales y la D.C. Liliana López Pliego por tomarse su tiempo en revisar mi trabajo y darme sus valiosas sugerencias y consejos.

ÍNDICE

Contenido

1. INTRODUCCIÓN 7

1.1 *E. coli* ENTEROPATÓGENA 9

1.1.2 MECANISMO DE PATOGENICIDAD DE EPEC 12

2.1 ANTECEDENTES GENERALES 15

2.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS 18

3. JUSTIFICACIÓN 26

4. HIPÓTESIS CIENTÍFICA 27

5. OBJETIVOS 27

OBJETIVO GENERAL 27

OBJETIVOS PARTICULARES 27

6. MATERIALES Y MÉTODOS 28

6.1 Cepas y condiciones de crecimiento 28

6.2 Análisis Bioinformáticos 29

6.2.1 Predicción de modelos complejos oligoméricos con Colabfold/Alphafold2 29

6.3 Manipulación de ADN 30

6.4 PCR 30

6.5 Electroforesis en gel de agarosa para la separación de ADN 31

6.6 Clonación del gen de interés en pBAD/Myc-HisA y caracterización de clonas 31

6.7 Extracción y purificación de ADN 34

6.7.1 Extracción de ADNg y plásmido por kit 34

6.7.2 Extracción de plásmido por lisis alcalina 35

6.7.3 Purificación de producto de PCR 35

6.7.4 Purificación de ADN a partir de gel de agarosa 35

6.8 Generación de células químicamente competentes 36

6.9 SDS-PAGE 36

7. RESULTADOS 37

7.1 Caracterización *in silico* de la interacción entre el regulador PerA y proteínas candidatas 37

7.2 Estimación de la afinidad de interacción de las proteínas candidatas con el regulador PerA 46

7.3 Búsqueda de los posibles sitios de interacción entre las proteínas con el activador PerA 51

7.5 Predicción de modelos complejos oligoméricos utilizando Colab fold/Alpha fold 2. 55

7.6 Clonación de *iclR* en pBAD/Myc-His A 61

7.7 Evaluación de la sobreexpresión de IclR-6XH 62

11. BIBLIOGRAFÍA 70

ABREVIATURAS

A/E: Adherencia y destrucción (Attaching and Effacing)
Bfp: Pilus formador de mechones (Bundle forming pilus)
Kpb: kilo pares de bases.
ADN: Ácido desoxirribonucleico.
ARN: Ácido ribonucleico.
DMEM: Medio Eagle modificado de Dulbecco (Dulbecco´s modified Eagle Medium)
WT: Silvestre (Wild Type).
TA: Temperatura Ambiente.
DO_{600}: Densidad Óptica a 600 nanómetros.
EAF: Factor de adherencia de EPEC (EPEC adherence factor)
***esc*:** Componente de secreción de *E. coli* (*E. coli* Secretion Component).
***sep*:** Secreción de proteínas de *E. coli* (Secretion of *E. coli* Proteins).
***esp*:** Proteína de secreción de *E. coli* (*E. coli* SecretionProteins).
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.
PerA: Plasmid Encoded Regulator A
***Per*:** (Plasmid-Encoded Regulator)
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio.
PVDF: Floruro de polivinilideno.
PBST: Buffer salino de fosfatos-Tween.
TA: Temperatura Ambiente
TRIS: Trisaminometano.
SST3: Sistema de Secreción Tipo 3.
ECP: Escherichia coli Common Pilus.
Nle-: (Non-LEE Encoded).
HTH: (Helix Turn Helix).
rpm: revoluciones por minuto ("revolutions per *m*inute").
Tir: Receptor de intimina translocado (Translocated intimin receptor)

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1. Patotipos diarreogénicos de *E. coli*. 8
Figura 2. Elementos genéticos que contribuyen a la virulencia de EPEC. 11
Figura 3. Esquema de las etapas de infección por EPEC 14
Figura 4. Regulación de los genes de virulencia codificados en la isla LEE y pEAF en EPEC 17
Figura 5. Esquema representativo de la estructura general de los miembros pertenecientes a la familia AraC/XylS. 19
Figura 6. Sitios probables de interacción de las proteínas analizadas con el regulador PerA. 54
Figura 7. Dos mecanismos de represión ejercida por IclR. 56
Figura 10. Distancias estimadas entre los residuos de aminoácidos de las proteínas IclR-PerA 60
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de iclR 61
Figura 18. Predicción de energía libre de enlace del complejo ClpX-PerA. 76
Figura 19. Mapa de error de alineación previsto 81
Figura 20. Predicción del modelo de la estructura PerA utilizando Colab fold/Alpha fold 2. 81

Tablas

Tabla 1. Proteínas candidatas a interactuar con el regulador PerA 21
Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo 28
Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo 30
Tabla 4. Condiciones de PCR usadas en este trabajo. 31
Tabla 5. Proteínas con función reguladora y que posiblemente interactúan con PerA 37
Tabla 6. Resultados de la evaluación de proteínas candidatas a interactuar con PerA mediante el servidor web “PSOPIA” 41
Tabla 7. Resultados de la evaluación de interacción proteína-proteína “PSOPIA” y “PPA-Pred2” 49
Tabla 8. Oligonucleótidos diseñados para ClpX 75

RESUMEN

Escherichia coli enteropatogena (EPEC) es una de las principales causas de diarrea en menores de 5 años que afecta especialmente a países en vías de desarrollo. La enfermedad que provoca EPEC se caracteriza por una diarrea aguda de severidad variada, en algunos casos prolongada, provocando pérdida de fluidos y desnutrición. EPEC coloniza el epitelio intestinal induciendo dos fenotipos característicos: la adherencia localizada (AL) y la lesión de adherencia y destrucción (A/E). Los elementos genéticos están codificados en el plásmido EAF (EPEC adherence factor) y en la isla de patogenicidad LEE (Locus of Enterocyte Effacement). La expresión de los genes de virulencia en EPEC es modulada por diversos factores ambientales mediante proteínas reguladoras, una de ellas es PerA (Plasmid Encoded Regulator A), una proteína que pertenece a la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS. PerA promueve su propia expresión, regula la AL y de forma indirecta la lesión A/E.

Lara-Ochoa y cols., en 2021; analizaron, mediante estudios de proteómica, las interacciones proteicas con PerA en EPEC crecida en condiciones de inducción y de represión de los genes de virulencia, los resultados obtenidos mostraron una serie de proteínas que podrían estar modulando directa o indirectamente la función del regulador transcripcional. Por lo anterior, para contribuir al estudio de la red de regulación de EPEC y determinar qué proteínas tienen más probabilidad de interactuar con PerA, en este trabajo se realizaron análisis bioinformáticos de los resultados generados por Lara-Ochoa y cols. Para esto, se seleccionaron reguladores transcripcionales para evaluar (mediante su secuencia primaria y la generación de modelos de predicción de complejos proteicos) la probabilidad, regiones probables de interacción así como la modelación del complejo de interacción con PerA. Los análisis *in silico* obtenidos mostraron una alta predicción para los reguladores IclR, KdgR, ClpX, PuR, ExuR, FnR y NarL en la interacción con PerA. Los sitios probables de interacción en PerA con los reguladores transcripcionales analizados, sugieren a los residuos de aminoácidos ubicados en las posiciones 80-200 que forman el sitio conector y parte del carboxilo terminal de este regulador. La interacción entre PerA con IclR mostró en general los valores de predicción más altos con respecto a los demás reguladores analizados. IclR es un regulador transcripcional de la vía del glioxilato y del que no se tiene evidencia hasta el momento de su participación en la regulación de virulencia en este patógeno. Los residuos de aa de PerA involucrados en la interacción con IclR se ubican entre las posiciones 100 a 200 y para IclR entre 180-220. El modelo de acoplamiento molecular PerA-IclR generado sugiere que los residuos de aminoácidos importantes en la interacción se incluyen en 2 regiones: en la primera región, los residuos His-207 y ASN-208 de IclR mantienen contacto con los residuos ASN-115, GLU-116, MET-117 y ASN-120 de PerA; en la segunda región, predice el contacto de los residuos de IclR LYS-57 y ARG-55 con los residuos de PerA SER-102, ASP-101 y SER-99. Por otra parte, se realizó la construcción del plásmido pBAD-IclR y se comprobó la sobreexpresión de esta proteína en el fondo genético de la cepa BL21. Se sugiere que IclR-6XH es un represor de virulencia porque la sobreexpresión disminuyó la secreción de proteínas de virulencia en EPEC. Dicha construcción servirá para evaluar a detalle el efecto sobre los genes de virulencia de EPEC y la relación con PerA. Por último, los resultados de este trabajo sugieren que la función de PerA como activador transcripcional podría ser modulada a través de la interacción con más de un regulador transcripcional, ya que en los análisis *in silico* se identificaron varías proteínas con valores favorables que podrían ser objeto de estudio, aunque se requiere de un estudio más profundo para comprobar la posible interacción de PerA con las proteínas analizadas, así como los efectos de la misma interacción. Finalmente, tales datos representan un avance para abordar, a partir de un enfoque bioinformático, el análisis dirigido acerca del papel de las proteínas que participan en la red de regulación de los genes de virulencia en patógenos de gran importancia a nivel mundial como es el caso de EPEC.

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones gastrointestinales son una de las causas más importantes de enfermedad y muerte en la población pediátrica mundial (Dupont *et al*., 2016). Se estima que la diarrea ha provocado la muerte de al menos medio millón de infantes al año; siendo la segunda causa de mortalidad y morbilidad en menores de 5 años especialmente de países en vía de desarrollo según datos reportados por WHO (World Health Organization) y IHME (Institute for Health Metrics and Evaluation) ((IHME), 2021; Chang *et al.*, 2021.; WHO, 2018).

La diarrea se define como la deposición de al menos tres veces, o con mayor frecuencia a la normal, de heces sueltas o líquidas en un periodo de 24 horas y es de etiología diversa (Lim *et al*., 2020). Usualmente es un síntoma de la alteración en el tracto intestinal provocada por patógenos como: bacterias, virus y parásitos que son adquiridos por el consumo de alimentos contaminados, agua o por contacto con personas infectadas (Lim *et al*., 2020; WHO, 2018).

Los virus y bacterias son los agentes más comunes causantes de la diarrea. Entre los principales agentes de tipo bacteriano se encuentran: *Escherichia coli, Salmonella, Campylobacter, Vibrio cholerae, Clostridium* que son comúnmente asociadas a las enfermedades diarreicas (Chang *et al*., 2021; Lim *et al*., 2020).

E. coli forma parte de la microbiota del intestino humano y mantiene una relación simbiótica con el hospedero (Donnenberg y Finlay, 2013; Hill y Drasar, 1975).

El grupo heterogéneo de *E. coli* es responsable de una gama de enfermedades que incluyen: diarrea, infecciones del tracto urinario, sepsis y meningitis (Kaper *et al*., 2004). Estas enfermedades se deben a factores de virulencia presentes en los patógenos, tales como: fimbrias, toxinas, sistemas de secreción, entre otros (Nataro y Kaper, 1998).

La categoría de *E. coli* diarreogénicas está integrada por los patotipos: ***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) (Figura 1) (Croxen y Finlay, 2010; Donnenberg y Finlay, 2013; Torres, 2017).

EPEC es una de las bacterias entéricas más comunes causantes de diarrea en lactantes menores de 11 meses que viven en países en vías de desarrollo (Chang *et al*., 2021; Croxen y Finlay, 2010; WHO, 2018).

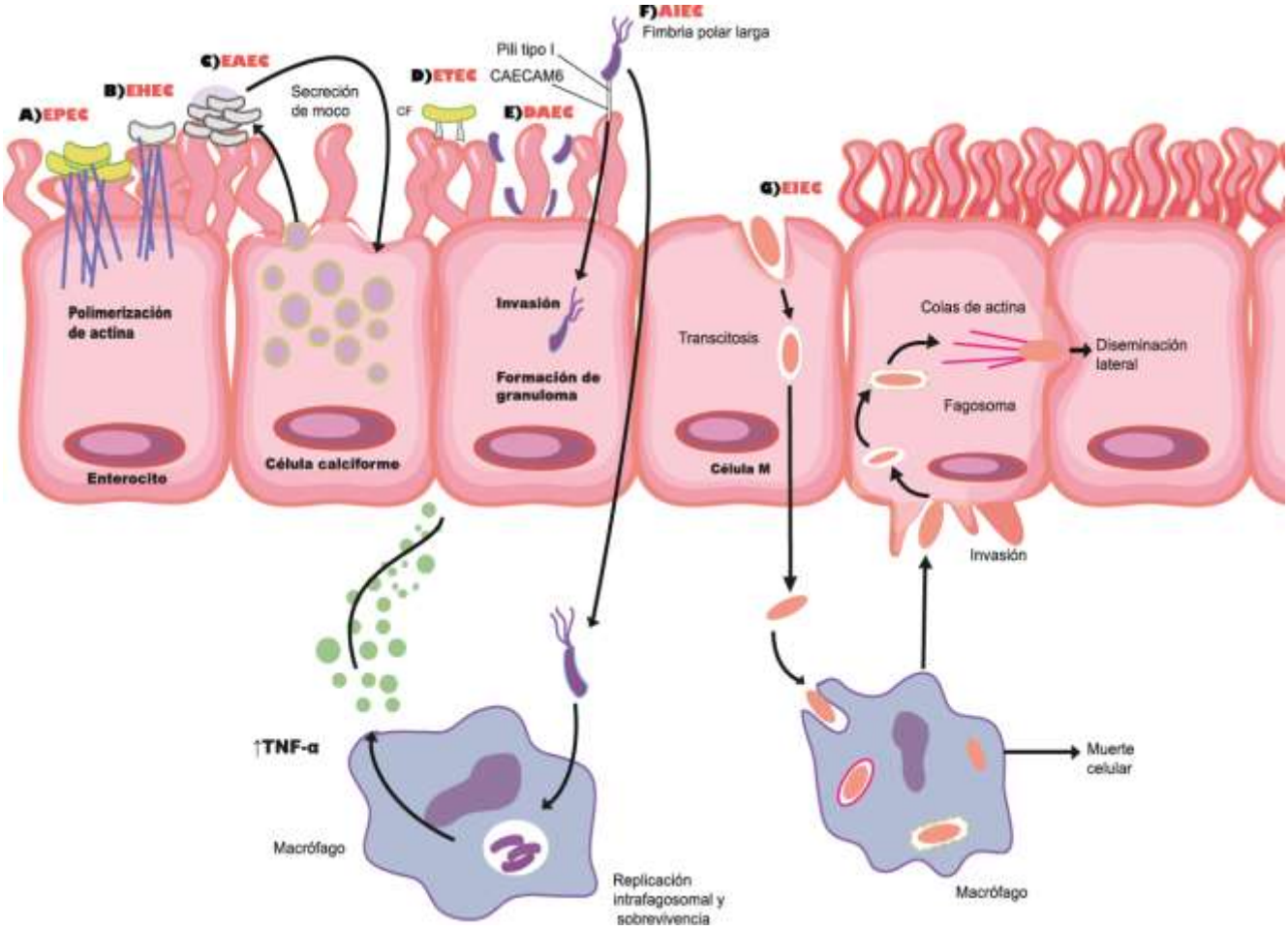


Figura 1. Patotipos diarreogénicos de *E. coli*.

A) *E. coli* enteropatógena (**EPEC**) y **B**) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) eliminan las microvellosidades del epitelio intestinal, al adherirse forman lesiones características A/E. EPEC es capaz de formar microcolonias debido a la presencia de pili formador de mechones, generando un patrón de adherencia localizada (AL). **C**) *E. coli* enteroagregativa (EAEC) tiene la capacidad para formar biopelículas en la mucosa intestinal al adherirse entre sí y a la superficie celular, forman un patrón de adherencia agregativa (AA) denominado: "ladrillo apilado". **D**) *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) Se une a las células intestinales usando factores de colonización (CFs). **E***) E. coli* difuso adherente (DAEC) se disemina en la superficie de las células resultando en un patrón de adherencia difusa (AD). **F**) *E. coli* adherente invasiva (AIEC) invade los enterocitos en pacientes de la enfermedad de Crohn y se replica en los macrófagos. AIEC se adhiere a las células intestinales con el pilus tipo I y a las fimbrias polares largas que participan en la invasión. **G**) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) es un patógeno intracelular que ingresan en el epitelio intestinal a través de las células M. EIEC escapa de los macrófagos de la submucosa de la muerte celular, seguida de la invasión lateral y basolateral de los enterocitos. Imagen tomada y modificada de: (Croxen y Finlay, 2010).

1.1 *E. coli* ENTEROPATÓGENA

EPEC ha sido reconocida como una de las principales causas de diarrea infantil, provocando cerca de 121,455 defunciones en menores de cinco años en todo el mundo, especialmente en países en vías de desarrollo (Farfán-García *et al*., 2016; Hennessey *et al*., 2021; WHO, 2018).

La enfermedad provocada por EPEC se caracteriza por una diarrea aguda de severidad variada, en algunos casos prolongada, provocando pérdida de fluidos y desnutrición (Lanata *et al*., 2013; Ochoa y Contreras, 2011).

Este patógeno se propaga por la "ruta fecal-oral", por lo que ha desarrollado diferentes estrategias para resistir la travesía desde el medio externo hasta el ambiente ácido del estómago, abriéndose paso por la mucosa viscosa del epitelio intestinal hasta llegar al intestino delgado, su sitio de colonización (Paitan, 2018).

EPEC se subclasifica en cepas típicas (tEPEC) y atípicas (aEPEC), con base en la presencia o ausencia del plásmido EAF (EPEC adherence factor), respectivamente (Donnenberg *et al*., 1992; Trabulsi *et al*., 2002).

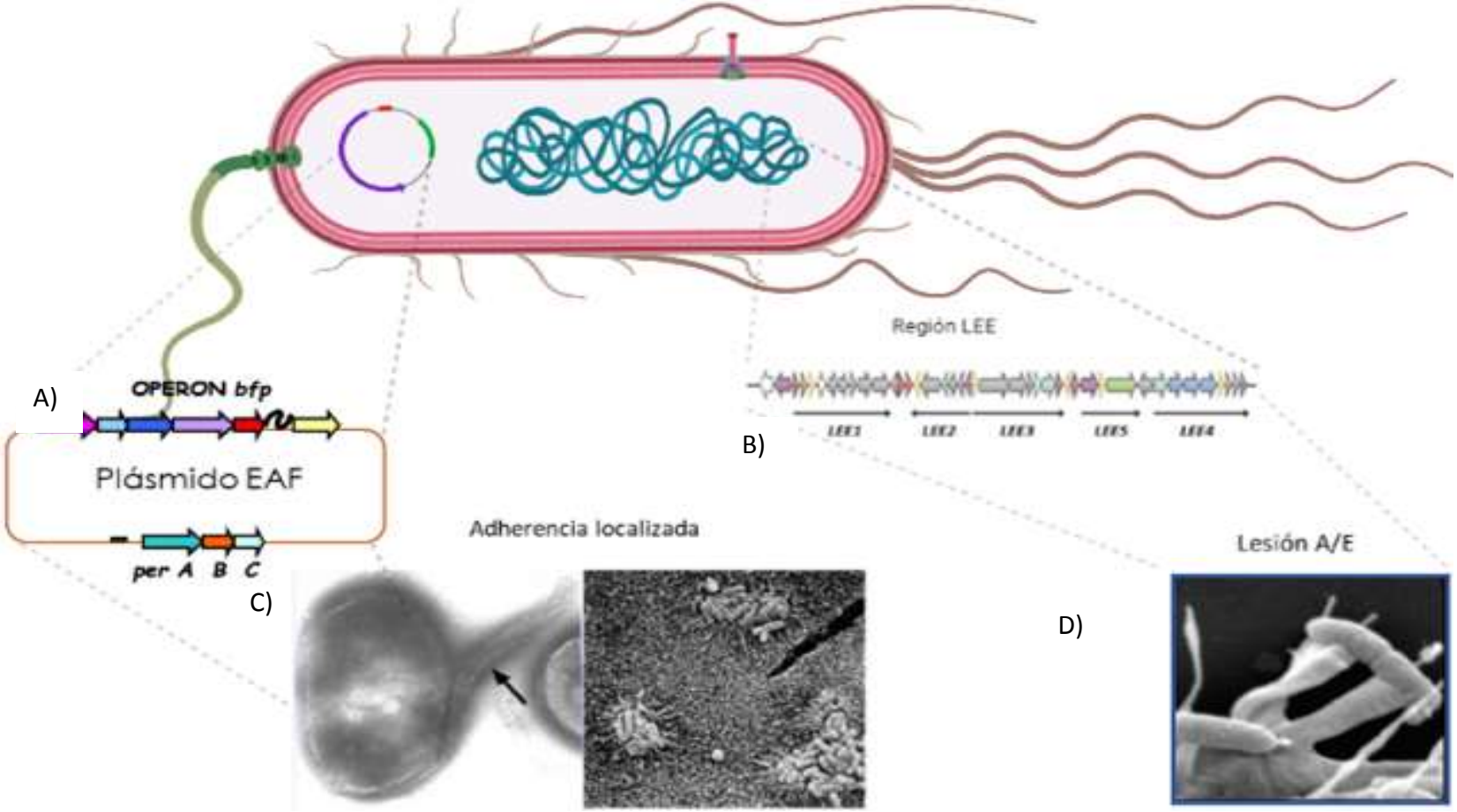
EPEC induce 2 fenotipos característicos sobre el enterocito que conducen al daño y el desarrollo de la enfermedad. El primer fenotipo es causado principalmente por la producción de una fimbria tipo IV llamada BFP (Bundle Forming Pilus), que media la agregación bacteriana y la adherencia con las células epiteliales, estableciendo un primer contacto con el hospedero (Donnenberg *et al*., 1992; Gomes *et al.*, 1989; Stone *et al.*, 1996). Los genes necesarios para la biogénesis de BFP están codificados en el plásmido EAF (*E. coli* adherence factor) (Figura 2-A) (Ibarra *et al*., 2003).

El otro fenotipo que induce se llama lesión A/E (Attaching and effacing), que se caracteriza por el "borrado" de las microvellosidades de las células intestinales inducida por diversas proteínas translocadas por EPEC mediante un SST3 (Type Three Secretion System), estas proteínas inducen la subversión del citoesqueleto generando la acumulación de actina polimerizada debajo del sitio donde EPEC se adhiere, formando una estructura en forma de copa o pedestal sobre la que EPEC establece una adherencia íntima con la célula hospedera (Figura 2-B)

(Donnenberg *et al*., 2013;Donnenberg *et al.*, 1992; Ochoa y Contreras, 2011; Sohel *et al*., 1996).

Los genes que codifican para componentes del SST3 se ubican en una isla de patogenicidad ubicada en el cromosoma denominada LEE (locus of enterocyte effacement), que posee cerca de 41 marcos de lectura abierto organizados por lo menos en 5 operones policistronicos que van de LEE1-5, dos operones bicistrónicos: *rof1-espG* y *grlR-A* y cuatro unidades transcripcionales: *rorf3, cesF, map y escD* (Figura 2-B) (Donnenberg *et al.,* 1992*;* Elliott *et al.,* 1998).

Los operones LEE 1-3 contienen los genes *esc* y *sep,* que codifican para los componentes clave del SST3. En LEE1 también se encuentra el gen *ler* (LEE encoded regulator), que codifica para un regulador que activa la expresión del resto de los operones de la isla, así como de genes ubicados fuera de ésta. El operón LEE4 alberga los genes que codifican para algunas de las proteínas secretadas por el SST3. Finalmente, en LEE5 se ubican los genes *eae* y *tir*, que codifican para la intimina de adhesión y su receptor Tir (Translocated Intimin Receptor) (Figura 2-B) (Franzin y Sircili, 2015).



.

Figura 2. Elementos genéticos que contribuyen a la virulencia de EPEC.

El plásmido EAF y la isla de patogenicidad cromosomal LEE determinan los fenotipos AL y A/E. **(A)** Esquema simplificado del plásmido EAF, principalmente se ilustran 2 operones: *bfp* y *per*; el primero codifica para el pilus BFP responsable del **C)** fenotipo AL y el segundo para el activador transcripcional PerA que regula la AL y de forma indirecta la lesión A/E (por la autoagregación y del efecto sobre *ler*). **B)** Isla de patogenicidad LEE. Porta los genes codificados para el SST3, reguladores de la virulencia *ler, grlA y grlR*. La regulación positiva de LEE acurré a través de PerA y/o GrlA (no ilustrada) resulta en la regulación de la **D)** lesión A/E que se caracteriza por la destrucción de las microvellosidades y la formación del pedestal. Imagen basada en: (Gaytán *et al*., 2016; Ugalde-Silva *et al*., 2016).

1.1.2 Mecanismo De Patogenicidad De EPEC

El proceso de patogenicidad de EPEC se ha descrito en tres etapas: adherencia inicial, transducción de señales y adherencia íntima (Figura 3) (Nataro y Kaper, 1998).

Durante la adherencia inicial, la bacteria se une a la célula hospedera de manera no íntima, formando el fenotipo AL (Figura 3-1) (Donnenberg *et al*., 1992; Dupont *et al*., 2016). En esta etapa la participación de la fimbria BFP es esencial, ya que permite la formación de redes o haces de BFP's que promueven la agregación bacteriana y la formación de microcolonias, permitiendo la adherencia al enterocito (Dupont *et al.*, 2016; Nataro y Kaper, 1998).

Además de la fimbria BFP, el pilus ECP (*E. coli* Common Pilus) participa en la colonización de las células epiteliales, tanto de cepas comensales como patógenas (Rendón *et al.*, 2007). Se ha descrito que en EPEC, ECP se co-expresa con BFP durante la formación de la AL en cultivos celulares como un factor de adherencia que promueve la unión a la célula y las interacciones bacteria-bacteria (Saldaña *et al*., 2009; Stone *et al*., 1996).

Una vez establecida la adherencia inicial se induce la expresión y el ensamblaje del SST3, proceso que lleva a la segunda etapa; la transducción de señales (Figura 3-II) (Nataro y Kaper, 1998). Durante esta etapa, las proteínas efectoras translocadas por esta maquinaria molecular como: Map, EspG, EspH, EspB, EspF, EspZ y Tir; promueven la alteración de la vía de transducción de señales de la célula hospedera, que en consecuencia generan un aumento en la concentración de calcio, redistribución de las acuaporinas, desorganización de las uniones estrechas, inhibición de la fagocitosis, alteración del citoesqueleto, disfunción mitocondrial, entre otras (Dean y Kenny, 2009).

Además de los efectores codificados en la isla LEE, existen otros efectores translocados por el SST3 y que están en otras regiones del cromosoma de EPEC, gran parte de estos efectores son denominados Nle (Non-LEE Encoded). Uno de estos; EspC, una enterotoxina que daña el citoesqueleto de actina debido a su actividad proteolítica (Kaper *et al*., 2004). Aunque la función de muchos de estos es aún desconocida, se han descrito algunos con funciones inflamatorias,

antifagocitocíticas e incluso como inductores de la respuesta inmune (Dean y Kenny, 2009; Dupont *et al*., 2016).

La tercera etapa se caracteriza por la adherencia íntima entre la proteína íntimina de la superficie de la bacteria y su receptor Tir en la célula hospedera. El SST3 se encarga de translocar a Tir en el citoplasma y su posterior inserción en la membrana celular, permitiendo que la intimina se adhiera a la célula hospedera, resultando en lesiones típicas del fenotipo A/E (Figura 3-III) (Dupont *et al*., 2016; Ibarra *et al*., 2003). La interacción de la intimina con su receptor conduce a la remodelación del citoesqueleto y a la subversión de las vías de transducción de señales, favoreciendo la formación de la copa o pedestal (Croxen y Finlay, 2010; Dupont *et al*., 2016; Torres, 2017).

Además de la formación del pedestal, EPEC causa la reorganización del citoesqueleto, alteración de las uniones estrechas, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, la modificación del tráfico vesicular, la inhibición de la transición de la fase G2/M del ciclo celular, alteración de la apoptosis y la modulación de la respuesta inmune del hospedero (Abe *et al.*, 2008; Jumper *et al*., 2021).

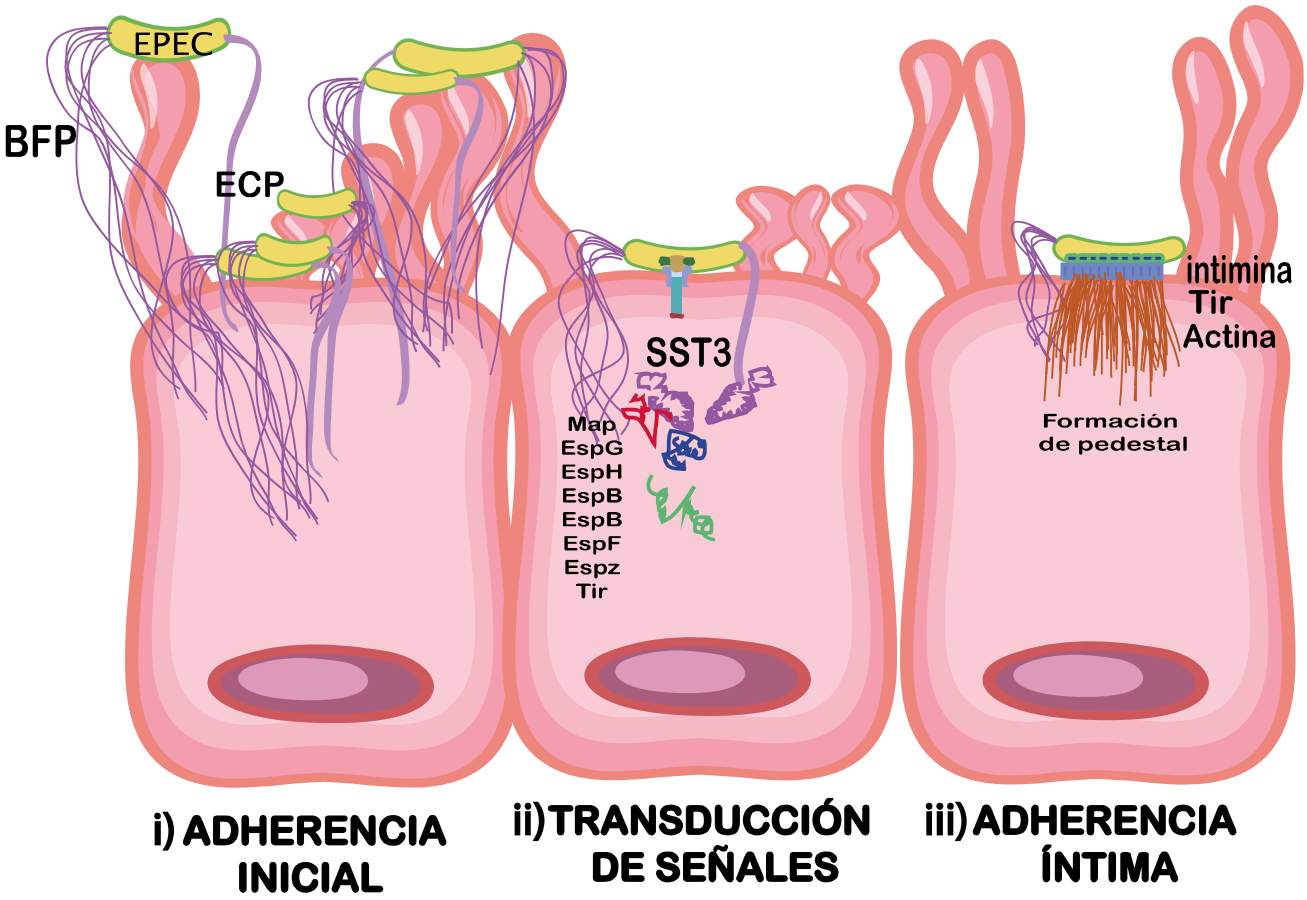


Figura 3. Esquema de las etapas de infección por EPEC

(I) Adherencia inicial: la bacteria se une a la célula hospedera de manera no íntima, formando la AL. La fimbria BFP permite la formación de redes o haces para promover la agregación y la formación de microcolonias (autoagregación). El pilus ECP se co-expresa con BFP en la colonización, promoviendo la unión a célula y las interacciones bacteria-bacteria. Establecida la adherencia inicial se induce la expresión y ensamblaje del SST3. **(ii)** Transducción de señales. Las proteínas del SST3 forman el Complejo Aguja molecular; que atraviesa la membrana interna, el espacio periplásmico y la membrana externa de la bacteria, permitiendo la secreción de proteínas. El SST3 transloca proteínas efectoras como: Map, EspG, EspH, EspB, EspF, EspZ y Tir, estas promueven la alteración de la vía de transducción de señales de la célula hospedera.
(iii) Adherencia íntima: la proteína intimina de la superficie de la bacteria interactúa con su receptor Tir. El SST3 transloca a Tir en el citoplasma y posteriormente la inserta en la membrana celular de la célula hospedera para interactuar con la proteína intimina de la superficie de la bacteria. Este fenotipo genera las lesiones típicas del fenotipo A/E. La interacción de la intimina con su receptor conduce a la remodelación del citoesqueleto y la subversión de las vías de transducción de señales, favoreciendo la formación de la estructura en forma de copa o pedestal. Los pedestales se componen principalmente de actina polimerizada y otras proteínas relacionadas como: actinina α, fimbrina, miosina, talina y ezrina. La reorganización del citoesqueleto por la formación del pedestal altera la morfología y fisiología de las células. Imagen basada y modificada de (Vidal *et al*., 2007).

2. ANTECEDENTES

2.1 ANTECEDENTES GENERALES

EPEC coordina la regulación de su virulencia para asegurar una colonización óptima con el menor gasto energético y sin alertar el sistema inmune del huésped antes de establecerse exitosamente en su nicho bacteriano.

Esta virulencia está orquestada por una red de reguladores globales que controlan su expresión, así como de reguladores locales ubicados principalmente en el pEAF y en la isla LEE (Figura 2) (Bustamante *et al*., 2001; Martínez-Laguna *et al*., 1999).

Uno de los principales reguladores globales es el componente del nucleoide bacteriano H-NS (histone-like nucleoid-structuring), que reprime la transcripción del operón LEE1 y del resto de operones cuando la temperatura es de 27° C, además organiza y compacta el ADN contribuyendo a la accesibilidad de los genes y modulando la expresión de estos (Bustamante *et al*., 2001; Williamson y Free, 2005). Sin embargo, cuando la bacteria se encuentra a temperaturas más altas, alcanzando las del rango fisiológico (30-37°C), la estructura de H-NS cambia y disminuye la afinidad por las regiones del operón LEE1 (Abe *et al*., 2008; Bustamante *et al*., 2001). Esto contribuye a que Ler, un regulador positivo de la expresión de LEE codificado en el primer gen de LEE1, contrarreste la represión de H-NS, promoviendo la expresión de los genes necesarios para la virulencia cuando la bacteria se encuentra en su nicho bacteriano (Figura 4) (Dean y Kenny, 2009; Martínez-Laguna *et al*., 1999).

GrlA y GrlR son reguladores codificados en LEE y controlan la expresión de *ler.* GrlA activa la expresión del operón LEE1 y a su vez impide que GrlR reprima al mismo operón uniéndose directamente a la proteína. A su vez, GrlR actúa como un regulador negativo de la expresión del resto de los operones de la isla (Figura 4) (Barba *et al*., 2005; Lara-Ochoa *et al.*, 2023).

Por otro lado, en el plásmido EAF se ubica el operón *per* (Plasmid-Encoded Regulator), que contiene los genes: *perA, perB y perC*, que codifican para reguladores de virulencia. PerA (Plasmid Encoded Regulator A), es un regulador que pertenece a la familia de activadores transcripcionales AraC/XylS, que controla su propia expresión y activa positivamente la expresión del pilus BFP (Figura 4) (Gómez-Duarte y Kaper, 1995).

perA es regulado de forma negativa por GadX, un represor transcripcional perteneciente a la familia AraC/XylS, cuando EPEC es sometido a un pH ácido (Figura 4) (Puente *et al*., 1996; Shin *et al*., 2001).

Otro regulador que participa en esta red es PerC, codificado en el tercer gen del operón *per*, funciona como un modulador positivo para la expresión del gen *ler* ubicado en el operón LEE1 (Porter *et al*., 2004).

La virulencia de EPEC es modulada *in vitro* por el ambiente en el que se encuentra, por ejemplo: si es sembrada en un medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), a una temperatura de 37°C, se verá favorecida la expresión de PerA y el pilus BFP (Figura 4). De manera opuesta, se reprime la expresión cuando son sembradas en un medio de cultivo LB (Luria Bertani), a temperaturas mayores o inferiores a 37°C y en presencia de sales de amonio (Martínez-Laguna *et al*., 1999; Puente *et al.*, 1996).

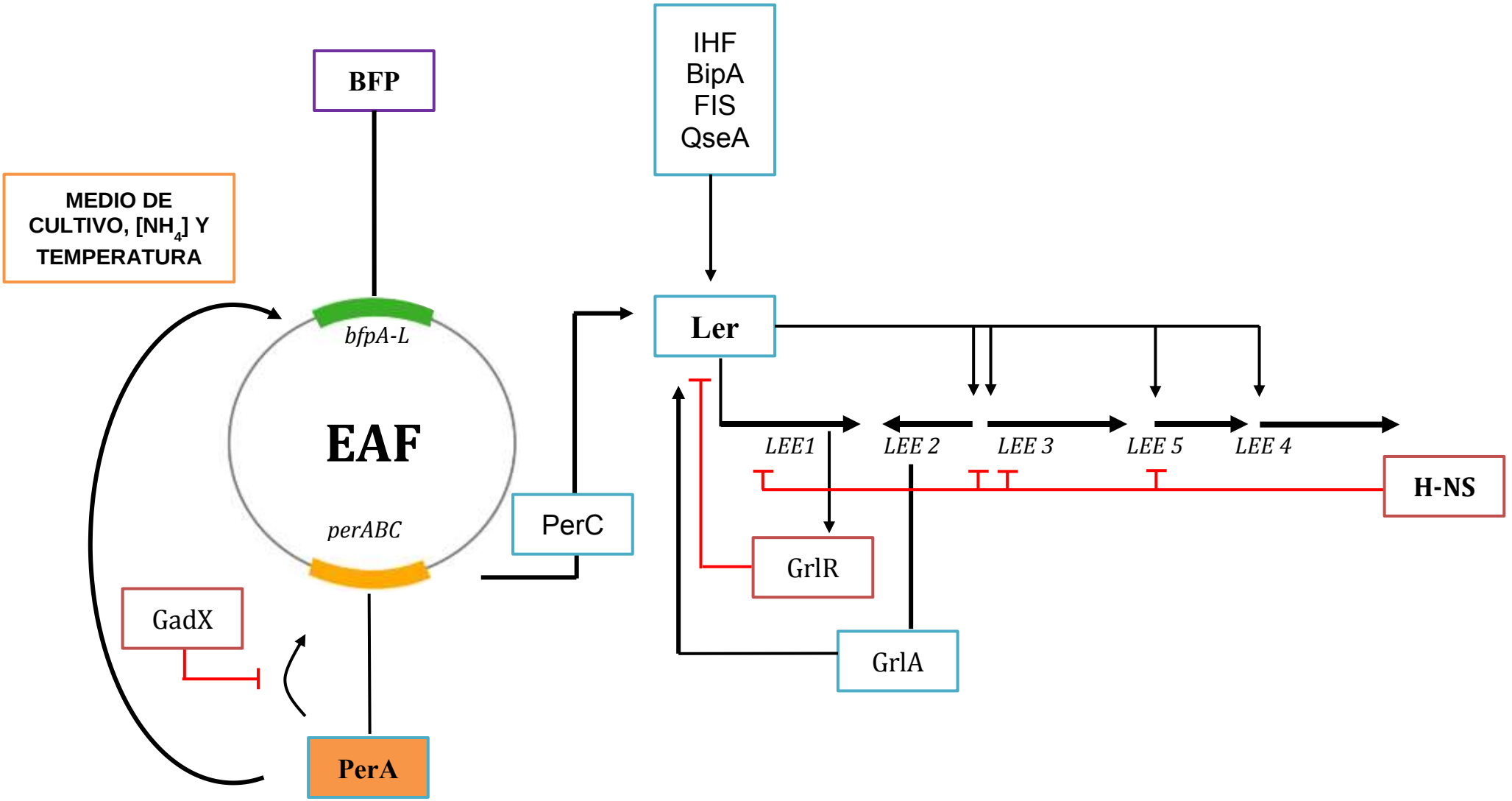


Figura 4. Regulación de los genes de virulencia codificados en la isla LEE y pEAF en EPEC

LEE1 codifica a Ler, que promueve la transcripción de todos los operones y auto-reprime su propio promotor. LEE1 es regulado por una serie de proteínas (Ler, H-NS, Fis, BipA, QseA e IHF), PerC está codificado en pEAF, GrlA/GrlR en LEE. PerA promueve la transcripción de *bfp* y su autotranscripción a través de su operón y GadX un regulador negativo de PerA en condiciones ácidas (pH 5.5). Las flechas en negro señalan los blancos regulados por las proteínas activadoras mostradas en recuadros azules y las flechas interrumpidas en rojo indican la represión ejercida por los reguladores en recuadros naranjas. En recuadros verdes se muestran las condiciones ambientales que están involucradas en la expresión de los genes de los operones *bfp* y *per.* Imagen basada: (Bokal, 1997; Martínez-Laguna *et al*., 1999; Platenkamp y Mellies, 2018; Umanski *et al*., 2002; Bustamante *et al*., 2011; Weinstein Fischer *et al*., 2002).

2.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

La familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS comprende una extensa familia de proteínas que se caracterizan por poseer 2 dominios (Figura 5): una región poco conservada ubicada hacia el extremo N-terminal cuya función principal es censar señales químicas, unión a moléculas pequeñas y la dimerización; por otro lado una región altamente conservada de aproximadamente 99 aminoácidos en el extremo C-terminal, que comprende 2 sitios HTH (Helix Turn Helix) responsables de la unión con el ADN y también presentan un dominio de unión a las subunidades de la RNAP (Gallegos *et al*., 1997; Gómez-Duarte y Kaper, 1995; Molina *et al*., 2022).

Las proteínas que pertenecen a esta familia se clasifican en 3 grupos según las funciones de los genes que regulan: respuesta a estrés que incluyen a Ada, SoxS, Rob, MarA, AarP, AdaA, PqrA, entre otros; metabolismo de carbono como AraC, CelD, MelR, RhaR, XylS, HpaA, TchR y de regulación de **virulencia** como PerA, AfrR, AggR, CfaD, CsvR, FapR y Rns, entre otros (Gallegos *et al*., 1997).

PerA pertenece al grupo de reguladores de virulencia de esta familia, se compone de 274 aminoácidos con un peso molecular de 31.8 kDa, está conformada por 2 regiones estructurales; una región poco conservada en el extremo amino terminal (NTD) y una región conservada en el carboxilo terminal (CTD) que contiene dos motivos de unión hélice-giro-hélice (HTH) responsables de la unión al ADN (Stone *et al*., 1996). Esta región interactúa con las subunidades α y σ de la ARNP, permitiendo el anclaje de la maquinaria transcripcional sobre los promotores blanco, favoreciendo la transcripción de los mismos (González *et al*., 2019; Lara-Ochoa *et al*., 2021).

AraC, XylS, SoxS, MarA, Rob y ToxT, proteínas de la misma familia, han reportado interacción con la maquinaria transcripcional de forma similar a la que presenta PerA (Gallegos *et al*., 1997; Porter *et al*., 2004).

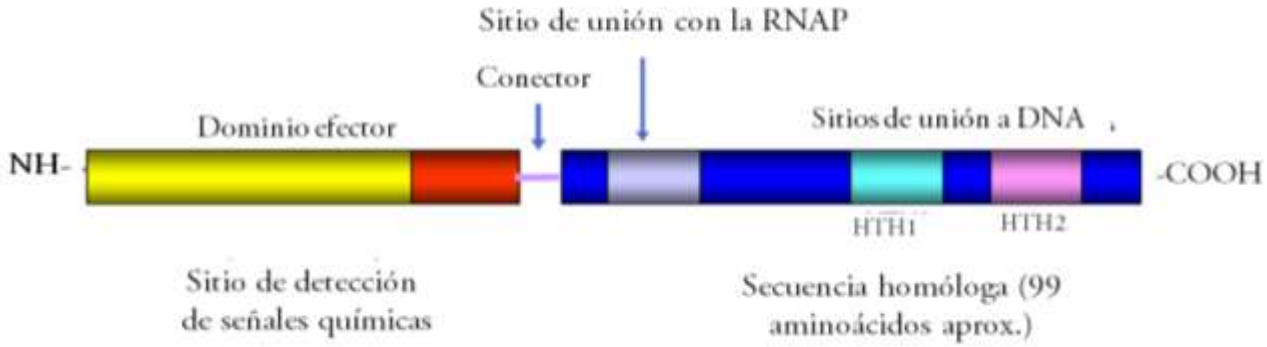


Figura 5. Esquema representativo de la estructura general de los miembros pertenecientes a la familia AraC/XylS.

Los miembros de esta familia poseen dos dominios, el primero ubicado en el amino terminal conocido como dominio efector, asociado con la detección de señales químicas y homodimerización. El segundo, ubicado en el carboxilo terminal, consiste en dos motivos HTH, región que permite la unión al ADN de genes blanco. Ambos dominios se encuentran unidos por un conector. Adicionalmente, en algunos miembros se encuentra en el C-terminal, un sitio de unión a la ARNP que favorece el anclaje de la maquinaria transcripcional en los promotores de los genes diana.

En el caso de PerA, se ha identificado que para activar la expresión de *bfpA* o *perA*, se necesita de la interacción tanto del C-terminal de la subunidad *α* de la RNA polimerasa y del extremo amino para activar la transcripción (González *et al*., 2019). Este regulador se une como monómero a una secuencia consenso de 29 pb rica en AT en las regiones reguladoras de *bfpA* y *perA,* que van del -75 a -47 en *bfpA* y en la región -83 a -55 en *perA* (Ibarra *et al*., 2003; Martínez-Laguna *et al*., *1999)*.

La regulación en la que participa PerA continúa con muchas incógnitas, ya que factores ambientales como las sales de amonio, reprimen o interfieren con su propia transcripción y de la fimbria BFP.

Siguiendo esta premisa, Martínez-Laguna y colaboradores en 1999 realizaron fusiones transcripcionales de la región reguladora de *bfpA* y *perA* con el gen reportero *cat* (cloranfenicol acetil transferasa) para analizar la expresión en diferentes condiciones ambientales (Martínez-Laguna *et al*., 1999; Puente *et al*., 1996). Los resultados mostraron que la expresión de *bfpA* y *perA* disminuyó en presencia de sales de amonio, al igual que para los genes de la isla LEE (Martínez-Laguna *et al*., 1999; Puente *et al*., 1996). Los datos mostraron que dicha represión se presenta en EPEC ejercida a través de PerA, debido a que al transformar una cepa de *E.coli* MC4100 con un vector portador de las fusiones *bfpA-cat* (pCAT232) o *perA-cat* (pUST166) y un plásmido con PerA en multicopia (pCS-T), la expresión de *perA* o

bfpA no es reprimida cuando se añade amonio al medio, sugiriendo que la represión por amonio de *perA, bfpA* y posiblemente de LEE ocurre por un elemento exclusivo presente en EPEC que compite con PerA por ocupar las regiones reguladoras de *perA* o *bfpA*, o por presentar una interacción proteína-proteína, bloqueando o impidiendo la función de PerA como activador transcripcional.

Siguiendo la hipótesis planteada, el equipo de Lara-Ochoa y cols., en 2021, analizaron, mediante estudios de proteómica, las interacciones proteicas de PerA crecida en condiciones de inducción y de represión por amonio con la finalidad de encontrar aquellas proteínas que podrían modular la función del regulador transcripcional (González *et al*., 2019). Como resultado de ese estudio se identificaron una serie de proteínas candidatas involucradas en diversas funciones: regulación, metabolismo y virulencia, como se muestra en la Tabla 1 (González *et al*., 2019; Lara-Ochoa *et al*., 2021). Es posible que dichas proteínas modulen la función de PerA mediante interacción proteína-proteína, por tanto, en el presente trabajo se busca predecir, utilizando herramientas *in silico,* la probabilidad de dichas interacciones.

Tabla 1. Proteínas candidatas a interactuar con el regulador PerA

N° de banda([a])	Peso molecular estimado (kDa) ([b])	Experimento ([c])	Identidad proteíca ([d])	N° de acceso (GenBank)	Cobertura (%)([e])
1	290	Co-purification	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	WP_000653936.1	75
			DNA-directed RNA polymerase subunit beta	WP_000263098.1	56
2	140	Pull-down	Intimin adhesin involved in induction of attaching and effacing lesions	WP-000627890.1	81
			DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	WP_000653936.1	75
			DNA-directed RNA polymerase subunit beta	WP_000263098.1	71
			DNA-directed RNA polymerase sigma factor RpoD	WP_000437371.1	44
			ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA	WP_000934041.1	36
			Secretion protein EspD	WP_000935757.1	34
3	110	Pull-down	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	WP_000653936.1	41
			Intimin adhesin involved in induction of	WP-000627890.1	41

			attaching and effacing lesions		
			DNA-directed RNA polymerase sigma factor RpoD	WP_000437371.1	26
			DNA-directed RNA polymerase subunit beta	WP_000263098.1	20
4	52	Pull-down	EscC/YscC/HrcC family type III secretion system outer membrane ring protein	WP_000723931.1	65
			Intimin adhesin involved in induction of attaching and effacing lesions	WP-000627890.1	48
			Translocated intimin receptor Tir	WP_001339882.1	45
			Secretion protein EspD	WP_000935757.1	36
5	38	Co-purification	LysR family transcriptional regulator CysB	WP_000776253.1	96
			PurR family transcriptional regulator	WP_000190985.1	61
			Protease modulator HflC	WP_001232412.1	59
			ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpX	WP_000130305.1	21

6	32	Pull-down	DNA-binding transcriptional regulator KdgR	WP_001262188.1	58
			DeoR/GlpR family transcriptional regulator	WP_001296480.1	54
			IclR family transcriptional regulator	WP_000514241.1	44
			Transcriptional regulator ExuR	WP_000406486.1	44
			Secretion protein EspD	WP_000935757.1	31
			DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	WP_001162094.1	20
7	30	Pull-down	DeoR/GlpR family transcriptional regulator	WP_001296480.1	84
			Secretion protein EspD	WP_000935757.1	51
			Hypothetical protein	WP_000032717.1	31
			Hypothetical protein	WP_000091467.1	34
			Transcriptional regulator FNR	WP_000611911.1	28
			DNA-binding protein H-NS	WP_001287378.1	25
			Ethanolamine utilization protein EutQ	WP_000733877.1	22

			DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	WP_001162094.1	21
8	23	Co-purification	Two-component system response regulator UvrY	WP_000611328.1	72
			Fatty acid metabolism transcriptional regulator FadR	WP_000234823.1	48
			XRE family transcriptional regulator	WP_000836620.1	46
			Two-component response regulator DpiA	WP_000126500.1	45
			Glutamine ABC transporter ATP-binding protein	WP_000569080.1	40
			DUF484 family protein	WP_000812801.1	30
			Type III secretion system effector cysteine methyltransferase NleE	WP_000609744.1	26
			Two-component system response regulator NarL	WP_000070494.1	20
9	13	Co-purification	LcrR family type III secretion system chaperone CesD2	WP_000228584.1	76

			AsnC family transcriptional regulator	WP_000432970.1	70
			Zn (2+) responsive transcriptional regulator	WP_000285619.1	46
			SlyA family transcriptional regulator	WP_000445640.1	36
			Hypothetical protein	WP_000272188.1	34
			DNA-binding protein H-NS	WP_001287378.1	30
			DNA-binding protein	WP_000988707.1	29
			Hypothetical protein	WP_000013660.1	22
			Toxin-antitoxin system HicB family antitoxin	WP_001030482.1	22

Tabla 1. Proteínas candidatas a interactuar con PerA involucradas en diversas funciones: regulación, metabolismo y virulencia obtenidas en de González *et al*., 2019 y Lara-Ochoa *et al*., 2021.

3. JUSTIFICACIÓN

EPEC es uno de los principales agentes etiológicos causantes de diarrea predominantemente en lactantes menores de 11 meses. Representa la segunda causa de mortalidad y morbilidad en menores de 5 años especialmente de países en vía de desarrollo. Además, se ha encontrado que la infección neonatal por EPEC puede interrumpir el eje microbiota-intestino-cerebro, causando déficit cognitivo, neuroinflamación, fisiopatología y disbiosis intestinales en la edad adulta.

La patogenicidad de EPEC es el resultado de una regulación estricta de la virulencia para asegurar una colonización exitosa. La proteína PerA es clave durante la primera etapa de la infección debido a que promueve la expresión de la fimbria BFP y a su vez promueve indirectamente la expresión de los genes codificados en la isla LEE.

En nuestro grupo de trabajo, en el Centro de Detección Biomolecular, estamos interesados en el estudio de PerA y las interacciones proteicas con diversos reguladores transcripcionales que pudieran estar modulando su función como activador de la virulencia bajo diferentes condiciones ambientales.

4. HIPÓTESIS CIENTÍFICA

PerA interactúa con diversos reguladores transcripcionales que modulan su función como regulador de la expresión de la fimbria BFP en EPEC.

5. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar las interacciones proteicas entre el activador PerA y proteínas reguladoras transcripcionales en *Escherichia coli* enteropatógena.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar mediante análisis *in silico* las interacciones proteína-proteína entre PerA y reguladores transcripcionales de EPEC obtenidos del trabajo de Lara-Ochoa *et al*., 2021.
- Diseñar oligos, amplificar y clonar en el vector pBAD/Myc-His, uno de los genes que codifican para el regulador con el mayor valor predictivo de interacción con PerA.
- Estudiar el efecto de la sobreexpresión del regulador transcripcional sobre las proteínas de virulencia de EPEC.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas se cultivaron de forma rutinaria en medio LB (Luria-Bertani) (peptona de caseína 1%, extracto de levadura 0.5% y cloruro de sodio 1%) a 37°C en baño de agitación a 220 rpm. A los medios se les agregó ampicilina (100 mg/ml) o estreptomicina (200 mg/ml) según fue requerido. Las cepas y plásmidos utilizados para este trabajo se indican en la tabla 2 y los oligonucleótidos en la tabla 3.

Tabla 2. Cepas utilizadas en este trabajo

Cepas	**Descripción**	**Referencia**
	E. coli	
E2348/69	Cepa silvestre de EPEC O127:H6. St^R	J.B. Kaper
BL21 (DE3) pLysS	Cepa no patógena de *E. coli* con el genotipo *ΔompT (lon) hsdSB (*rB- mB-*) gal dcm (ΔDE3) pLysS* deficiente en proteasas. Usada para producir proteínas recombinantes de forma eficiente.	New England Biolabs
E. coli DH5α	Cepa no patógena de *E. coli* con el genotipo F- 80 lacZ M15 (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1hsdR17*(*rk-*, *mk+*) *phoA supE*44 -thi-1 gyrA96 *relA*1, alta eficiencia de transformación confiere estabilidad del inserto y mejora la calidad del ADN plasmídico preparado a partir de minipreps.	(Woodcock *et al*., 1989
Plásmidos	**Descripción**	**Referencia**
pBAD/Myc-His A	Plásmido optimizado para su expresión en *E. coli* regulado por el promotor araBAD. Contiene un sitio de multiclonación con diversos sitios de restricción para las principales enzimas del mercado. Además, contiene fusionados el epítope Myc y una etiqueta de 6 histidinas en el C-terminal Ap*R*	Thermo Fisher Scientific
pBAD-IclR	Plásmido que porta el gen estructural que codifica IclR; proteína de interés seleccionada en el estudio para analizar la interacción con PerA.	Este trabajo

6.2 Análisis Bioinformáticos

A partir de los resultados de Lara-Ochoa *et al*., 2021 se seleccionaron las proteínas con la función de reguladores transcripcionales siguiendo la siguiente estrategia.

Se comenzó por obtener las secuencias primarias del NCBI (National Center for Biotechnology Information) https://www.ncbi.nlm.nih.gov/. Con las secuencias primarias se calculó la interacción entre los reguladores seleccionados y PerA en el servidor “PSOPIA” (https://mizuguchilab.org/PSOPIA/). Posteriormente, se determinó la afinidad de unión con las secuencias de proteínas seleccionadas con el programa “PPA-Pred2” (https://www.iitm.ac.in/bioinfo/PPA_Pred/index.html). Se analizaron los sitios de interacción utilizando el servidor web “iFrag" (http://sbi.imim.es/iFrag/).

6.2.1 Predicción de modelos complejos oligoméricos con Colabfold/Alphafold2

De acuerdo con los resultados generados en los análisis bioinformáticos iniciales, se seleccionaron las proteínas con mayor probabilidad de interacción con PerA para ser modeladas. Se comenzó con el modelado de las proteínas de interés, utilizando el programa AlphaFold2 (https://alphafold.ebi.ac.uk/), un sistema de inteligencia artificial, que predice la estructura de una proteína a partir de su secuencia de aminoácidos. Posteriormente, para modelar la interacción proteína-proteína se utilizó AlphaFold2 (https://alphafold.ebi.ac.uk/) adaptado en su versión Colabfold (https://github.com/sokrypton/ColabFold) usando la versión que incluye el estado oligomérico. Además, se usó el servidor web Hawk Dock (http://cadd.zju.edu.cn/hawkdock/) para predecir la estructura formada en un complejo proteína-proteína y la estimación de su estabilidad.

Los modelos se analizaron a detalle con el visualizador molecular PyMOL (https://pymol.org/2/) versión 2.0.

6.3 Manipulación de ADN

La manipulación del ADN se realizó siguiendo los protocolos estándar de biología molecular (Sambrook, 2001). Las enzimas fueron adquiridas de Thermo Fisher Scientific y utilizadas de acuerdo con el manual del fabricante.

Los oligonucleótidos utilizados en los ensayos de PCR, se muestran en la Tabla 3 y fueron sintetizados en la empresa T4 Oligo.

6.4 PCR

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo

Nombre	Secuencia 5'a 3'	Descripción	Referencia
pBADFw	atgccatagcatttttatcc	Amplifica la región de multiclonación del vector pBAD para caracterizar a las clonas.	Thermo Fisher Scientific
pBADRv	gatttaatctgtatcagg		
IclRRV	tccaagcttgtaatcgcgccctgg	Amplifica la región estructural de *iclR,* usados para clonar en pBAD, se agregan los sitios de restricción *Nco*I en el Fw y *Hind*III en Rv.	Este trabajo
IclRFW	taaccatggggaaagaagtgatg		

Las mezclas para la reacción de PCR fueron preparadas usando el reactivo "DreamTaq Green PCR Master Mix" (2X) (Thermo Fisher Scientific), que se utilizó en la reacción al 1X, los oligonucleótidos se utilizaron a una concentración de 0.4 µM y ~1 µg de ADN cromosomal y ~100 ng de ADN plasmídico. Las PCR se realizaron en un termociclador "TECHNE" con el protocolo usado de rutina en el laboratorio y se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de PCR usadas en este trabajo.			
Etapa	**Temperatura (C°)**	**Tiempo**	**Ciclos**
Desnaturalización inicial	95	3/10 min	1
Desnaturalización	95	30 sec	35 ciclos
Alineamiento	T° m del oligonucleótido	1 min (por cada 1,000 pb)	
Extensión	72	1 min	
Extensión final	72	10 min	1

6.5 Electroforesis en gel de agarosa para la separación de ADN

Las muestras de ADN se mezclaron con el buffer de carga (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 60% glicerol, 0.03% de azul de bromofenol, 60 mM EDTA) y se cargaron en un gel al 1% en buffer TAE 1X (40 mM Tris, 19 mM ácido acético, 1 mM EDTA). Se corrieron las muestras para separarse a 100 volts por 1 hora 10 min, se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en un fotodocumentador de luz ultravioleta ChemicDoc XRS, Bio-rad).

6.6 Clonación del gen de interés en pBAD/Myc-HisA y caracterización de clonas

Para construir el plásmido pBAD-IclR, la secuencia de ADN estructural de *iclR* fue amplificada por PCR con los nucleótidos IclRFw y IclRRv, usando como molde ADNg de EPEC WT extraído con el "Universal Quick-DNA Miniprep kit" (ZYMO RESEARCH). El fragmento amplificado fue purificado con el kit "QIAquick PCR purification Kit" (QUIAGEN), a la par fue purificado el vector pBAD/Myc-HisA con el "Zyppy Plasmid Miniprep kit" (ZYMO RESEARCH). Una vez que se purificaron los productos de PCR y el vector, se prepararon reacciones para ser digeridos con la enzima de restricción de digestión rápida *Hind*III (Thermo Fisher Scientific) utilizando las siguientes proporciones:

	PCR	Plásmido
Reactivo	**Cantidad (µl)**	**Cantidad (µl)**
HindIII	1.0	1.0
Buffer (10X)	2.0	2.5
DNA	17.0	20.0
H20	0	1.5
Total	20.0	25.0

Las reacciones se incubaron a 37°C/2 hrs

El ADN de las reacciones se corrió en un gel de agarosa y las bandas se escindieron y se purificaron con el "QIAquick gel extraction Kit" (QIAGEN), se procedió según las instrucciones, para después realizar la segunda reacción con la enzima *Nco*I (Thermo Fisher Scientific) con las siguientes cantidades:

	PCR	Plásmido
Reactivo	**Cantidad (µl)**	**Cantidad (µl)**
*Nco*I	1.0	1.0
Buffer (10X)	2.5	3.0
DNA	20.0	25.0
H20	1.5	1.0
Total	25.0	30.0

Las reacciones se incubaron a 37°C/18 hrs

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

Reactivo	Cantidad (µl)
T4 ligasa	1.0
Buffer (10X)	1.0
PCR	3.0
Vector	1.0
H2O	4.0
Total	10.0

Las reacciones se incubaron a 23°C/2 horas

La reacción de ligación se introdujo por transformación química en *E. coli* DH5α. Las clonas obtenidas se caracterizaron por PCR de colonia, para esto se prepararon reacciones de 15 µl con la proporción de componentes que se indica a continuación:

Reactivo	Cantidad (µl)
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	7.5
Oligonucleótido delantero (pBADFw)	0.45
Oligonucleótido reverso (pBADRv)	0.45
H_2O	6.6
Total	15

Después, las colonias se picaron al azar y se replicaron en una placa preparada con agar LB y estreptomicina, el resto se inoculó en un tubo con la reacción de PCR. Las condiciones de la PCR se describen en la Tabla 4. Los productos obtenidos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa y visualizados con bromuro de etidio, las clonas que amplificaron el fragmento del tamaño esperado fueron almacenadas a -80°C en gliceroles.

6.7 Extracción y purificación de ADN

6.7.1 Extracción de ADNg y plásmido por kit

Para la extracción del ADNg se utilizó el “Universal Quick-DNA MiniPrep kit” (ZYMO RESEARCH). Se realizó un cultivo de EPEC WT toda la noche en 5 ml de LB con ampicilina, las células fueron concentradas por centrifugación a 13,000 rpm/1 min, se retiró el sobrenadante y a la pastilla celular se le agregaron 400 µl de buffer de lisis, se vortexeó por 6-10 segundos y se incubó 10 min a T°A. Posteriormente, se transfirió a una columna con un tubo recolector y se centrifugó a 13,000 rpm/1 min, se desechó el contenido del tubo recolector, posteriormente se agregaron 200 µl de buffer de pre-lavado a la columna, nuevamente se centrifugó en las mismas condiciones y se pasó la columna a un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Finalmente se agregaron 100 µl de buffer de elución a la columna, se incubó por 5 min a 37°C y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. El ANDg fue almacenado a -20°C hasta su uso.

La extracción del ADN plasmídico fue realizada con el “Zyppy Plasmid MiniPrep kit” (ZYMO RESEARCH). Se realizó con un cultivo de toda la noche de la cepa *E. coli* DH5α con el pBAD en 5 ml de LB adicionado con ampicilina. Las células se concentraron en un tubo Eppendorf a 13,000 rpm/1 min hasta formar la pastilla, se le adicionaron 100 µl de buffer de lisis 7X, se resuspendió la pastilla invirtiendo el tubo 6-8 veces y se dejó incubar a T°A por 2 min.

Una vez lisadas las células, se adicionaron 350 µl de buffer de neutralización y se mezcló por inversión hasta que viró a color amarillo y se formó un precipitado. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm/2 min, se transfirió el sobrenadante a una columna con su tubo recolector y se centrifugó a 13,000 rpm/1 min, se desechó el contenido del tubo recolector y se añadieron 200 µl del buffer de lavado (Endo), se centrifugó nuevamente y se desechó el contenido del tubo recolector. A la columna se le agregaron 400 µl de buffer de lavado (Zyppy) y se centrifugó en las condiciones anteriores. La columna se transfirió a un tubo Eppendorf y se agregaron 50 µl de buffer de elución en la matriz de la columna dejando incubar por 2 min a T°A. Finalmente se centrifugó a 13,000 rpm/1 min para obtener el ADN plasmídico y se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.7.2 Extracción de plásmido por lisis alcalina

Un cultivo bacteriano de toda la noche en 5 ml medio LB fue concentrado por centrifugación a 12,000 rpm/1 min. La pastilla celular fue resuspendida en 200 µl de solución BirnieI (10 mM EDTA, 25 mM Tris pH 8.0, 20% sacarosa), más 2 µl de ARNasa y se dejó incubar 5 min a TA, se agregaron 400 µl de solución Birnie II (0.2N NaOH, 1% SDS), se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 5 min. Posteriormente, se agregaron 300 µl de acetato de potasio 5 M, se mezcló por inversión y se incubó en hielo por 10 min. El tubo se centrifugó a 13,300 rpm/30 min, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, se agregaron 500 µl de isopropanol y se centrifugó a 13,300 rpm/30 min. Se desechó el sobrenadante, la pastilla se lavó 3 veces con 1 ml de etanol al 70% y se centrifugó a 13,000 rpm/5 min. Finalmente se dejó secar la pastilla y se resuspendió con 70 µl de agua grado biología molecular. El plásmido se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.7.3 Purificación de producto de PCR

La purificación del producto de PCR se realizó usando el “QIAquick PCR purification Kit” (QIAGEN). A la reacción de PCR se le agregaron 5 volúmenes de buffer PB, la mezcla se vortexeó y se transfirió a una columna insertada en su tubo colector para separar por centrifugación a 13,000 rpm/1 min. Se desechó el líquido del tubo colector, a la columna se agregaron 750 µl de buffer PE y se centrifugó nuevamente en las condiciones anteriores. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo de 1.5 ml, se agregaron 50 µl de agua grado biología molecular y se dejó incubar por 1 min a TA, se centrifugó a 13,000 rpm/1 min. El producto de PCR purificado se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.7.4 Purificación de ADN a partir de gel de agarosa

A partir de muestras de ADN separadas en gel de agarosa, se escindió la banda, se recuperó en un tubo de 1.5 ml y se purificó usando el “QIAquick gel extraction Kit” (QIAGEN). A la banda se le agregó buffer QG hasta que quedó cubierta completamente y se incubó a 50°C para disolver la agarosa, vortexeando constantemente. Una vez disuelto el gel, se agregaron 100 µl de isopropanol y se mezcló. Posteriormente se transfirió a una columna en su tubo colector y se centrifugó a 13,000 rpm/1 min desechando el contenido del tubo colector, después se

agregaron otros 500 µl de buffer QG y se centrifugó nuevamente desechando el buffer residual. Posteriormente se agregaron 750 µl de buffer PE, se dejó 5 min a TA, se centrifugó a 13,000 rpm/1 min, se desechó el buffer y se centrifugó nuevamente. Finalmente se pasó la columna a un tubo de 1.5 ml, se agregaron 50 µl de agua grado biología molecular dejando reposar 1 min a 50°C y se centrifugó a 13,000 rpm/1 min. El ADN purificado se almacenó a -20°C.

6.8 Generación de células químicamente competentes

Se creció la cepa de *E. coli* requerida en medio LB a 37°C/220 rpm hasta llegar a una $D.O._{600}$ de entre 0.4-0.6. Posteriormente se concentraron las células a 6,000 rpm/10 min a 4°C, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular en 40 ml de buffer de transformación (100 mM $CaCl_2$, 5 mM $MgCl_2$, 5 mM Tris-HCl pH 7.0), se centrifugó nuevamente, se desechó el sobrenadante, se volvieron a resuspender en otros 50 ml de buffer y se incubaron en hielo por 30 min. Pasado el tiempo se volvieron a centrifugar, se desechó el sobrenadante y se les agregaron 2 ml de buffer más 500 µl de glicerol para preparar alícuotas de 70 µl. Finalmente, se almacenaron a -80°C hasta su uso.

6.8.1 Transformación por choque térmico

Se incorporaron 5 µl de plásmido (~0.5 µg) o la reacción de ligación a 50 µg de las células competentes y se incubaron en hielo por 30 min. Posteriormente se procedió a realizar el "choque térmico" incubando a 42°C por 2 min y se incubó en hielo 5 min. Se agregaron 200 µl de medio SOC (0.5% extracto de levadura, 2% de triptona, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM $MgSO_4$, 0.4% glucosa) y se incubaron a 37°C/220 rpm 1 hora. 100 µl de las células se sembraron en una placa de LB adicionada con ampicilina y se dejó incubando a 37°C toda la noche.

6.9 SDS-PAGE

Las muestras (extractos totales generados por sonicación o del ensayo de proteínas secretadas) se prepararon con el buffer Laemmli y se hirvieron 10 min. Posteriormente se cargaron en un gel de bis acrilamida preparado al 12% embebido en buffer Tris-Glicina-SDS (0.025 M Tris, 0.192 M glicina, 0.1% SDS). La electroforesis se realizó a 15 mA por 4 hrs.

7. RESULTADOS

7.1 Caracterización *in silico* de la interacción entre el regulador PerA y proteínas candidatas

En 2019, Gonzalez Lara obtuvo mediante, ensayos tipo “pull down” y co-purificación, una serie de proteínas que posiblemente interactúan con el activador de virulencia PerA bajo diferentes condiciones ambientales (Tabla 1).

Para caracterizar esta posible interacción se filtraron tales datos para analizar solamente a reguladores transcripcionales o proteínas implicadas en la regulación de virulencia que se indican en la Tabla 5 y posteriormente se descargaron las secuencias primarias de la base de datos del NCBI para los siguientes análisis.

Tabla 5. Proteínas con función reguladora y que posiblemente interactúan con PerA

Identidad proteica	Número de acceso (GenBank)	Función asignada (descrita) en NCBI
Subunidad β´RNA polimerasa	WP_000653936.	Subunidad del complejo de la RNAP
Subunidad β RNA polimerasa	WP_000263098. 1	Subunidad del complejo de la RNAP
Subunidad σ RNA polimerasa	WP_000437371. 1	Factor de iniciación de la transcripción, promueve unión de RNA polimerasa
Proteasa de Clp dependiente de ATP Subunidad de unión a ATP ClpA	WP_000934041.1	Actividad de ATP hidrolasa
Regulador transcripcional de la familia LysR CysB	WP_000776253.1	Activa genes implicados en metabolismo de sulfonato-azufre
Regulador transcripcional de la familia PurR	WP_000190985.1	Proteína represora de purina

Proteasa de Clp dependiente de ATP Subunidad de unión a ATP ClpX	WP_000130305.1	Hidrólisis de proteínas en polipéptidos y/o aminoácidos
Regulador transcripcional de unión al ADN KdgR	WP_001262188.1	Regula negativamente genes implicados en degradación y metabolismo de ácido péctico
Regulador transcripcional de la familia DeoR / GlpR	WP_001296480.1	Represor de genes relacionados al metabolismo de azúcares
Regulador transcripcional de la familia IclR	WP_000514241.1	Implicado en el metabolismo de carbono, resistencia a multidrogas, virulencia y señales de *quorum sensing*
Regulador transcripcional ExuR	WP_000406486.1	Regulación del metabolismo en genes implicados en la utilización de hexuronato
Regulador transcripcional FNR	WP_000611911.1	Regulador transcripcional de reducción de fumarato/nitrato Fnr
Proteína de unión al ADN H-NS	WP_001287378.1	Regulador transcripcional de unión al ADN H-NS de tipo histona
Proteína de utilización de etanolamina EutQ	WP_000733877.1	Interviene en el metabolismo de etanolamina acetato quinasa
Regulador de respuesta del sistema de dos componentes UvrY	WP_000611328.1	Regulador de respuesta afín para el sensor quinasa BarA
Regulador Transcripcional del metabolismo de los ácidos grasos FadR	WP_000234823.1	Optimiza el metabolismo de los ácidos grasos
Regulador transcripcional de la familia XRE	WP_000836620.1	Elemento de respuesta xenobiótica

Regulador de respuesta de dos componentes DpiA	WP_000126500.1	Modula la replicación y desestabiliza la herencia de plásmidos
Regulador de respuesta del sistema de dos componentes NarL	WP_000070494.1	Activa la transcripción de los genes de nitrato, nitrito reductasa y reprime la transcripción del fumarato reductasa
Regulador transcripcional de la familia AsnC	WP_000432970.1	Involucrado en síntesis de asparagina
Regulador transcripcional sensible a Zn (2+)	WP_000285619.1	Media la expresión de la proteína exportadora de zinc ZntA en respuesta a altos niveles de zinc
Regulador transcripcional de la familia SlyA	WP_000445640.1	Regulador de genes de virulencia
Antitoxina de la familia HicB del sistema toxina-antitoxina	WP_001030482.1	Implicada en el crecimiento, la fisiología y la patogenicidad bacteriana
Regulador transcripcional familia GntR	WP_000434049. 1	Regulación de ácidos grasos, catabolismo de aminoácidos y carbohidratos, producción de ácidos orgánicos y degradación de complejos orgánicos
Proteína hipotética	WP_000032717. 1	Sin asignar
Subunidad α RNA polimerasa	WP_001162094	Reconocimiento de promotor y unión a algunos activadores

Las secuencias se cargaron en el servidor web “PSOPIA” (Prediction Server of Protein-Protein Interactions). Este servidor, calcula las probabilidades de interacción otorgando un valor que va del 0 al 1, siendo 1 el valor más alto. Los valores del

servidor PSOPIA son el resultado de 4 parámetros calculados (Murakami *et al*., 2003).

1) S_{seq} es una puntuación predicha utilizando la información de las similitudes en secuencias con información de proteínas que se ha demostrado experimentalmente que sí tienen interacción.

2) S_{dom} es una puntuación que se calcula utilizando sólo información de las predisposiciones estadísticas de las interacciones dominio-dominio.

3) Snet es un valor que pronostica la interacción proteína-proteína utilizando sus pesos y la distancia de interacción molecular más corta entre éstas, comparándolas con posibles homólogos.

4) ALL (total) es el puntaje promedio de los 3 parámetros anteriores 1~3.

Los resultados de la interacción en PSOPIA se muestran en la Tabla 6.

PSOPIA calculó los valores más altos para los pares de proteínas con el puntaje de **0.3537** para: PurR-PerA, DeoR/GlpR-PerA, IclR-PerA, ExuR-PerA, FNR-PerA, EutQ-PerA; **0.3613** para: NarL-PerA, KdgR-PerA y **0.4187** para ClpX-PerA.

Para comparar estos resultados, también se introdujeron las secuencias de proteínas homólogas presentes en EAEC: Aar y AggR al igual que AggR y Aap, de los que se tiene evidencia experimental que interactúan (Rodriguez-Valverde *et al*., 2023; Santiago *et al*., 2014; Santiago *et al*., 2017). Los resultados de dichas interacciones arrojaron valores de 0.3537, valores similares a los mencionados anteriormente (Tabla 6). Lo que indicaría presuntivamente una posible unión e interacción entre estas proteínas.

Finalmente, como control negativo se utilizaron las secuencias de las proteínas EspJ-EntC. La proteína EspJ funciona como una ADP-ribosa, que inhibe la fagocitosis por la vía Src mediada por macrófagos, al evitar la activación del receptor EcyRIIa (Young *et al*., 2014). Por otro lado, EntC es una enzima isomerasa que cataliza el primer paso en la biosíntesis la vitamina menaquinona (Sridharan *et al*., 2010). El valor calculado fue de 0 lo que sugiere una improbable o nula interacción (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados de la evaluación de proteínas candidatas a interactuar con PerA mediante el servidor web "PSOPIA"

Proteína	Características	# PSOPIA Predicción de resultados de interacción con PerA			
		Sseq	**Sdom**	**Snet**	**Sall**
ClpA	Actividad de ATP hidrolasa (WP_000934041.1)	0.3537	0.0000	0.0000	0.3537
CysB	Activa genes implicados en metabolismo de sulfonato-azufre (WP_000776253.1)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
PurR	Proteína represora de purina **(**WP_000190985.1)	0.3537	0.0000	0.0000	0.3537

ClpX	Hidrólisis de proteínas en polipéptidos y/o aminoácidos **(**WP_000130305.1**)**	0.4187	0.0000	0.0000	0.4187
KdgR	Regula negativamente genes implicados en degradación y metabolismo de ácido péctico **(**WP_001262188.1)	0.3613	0.0000	0.0000	0.3613
DeoR / GlpR	Represor de genes relacionados al metabolismo de azúcares **(**WP_001296480.1)	0. 3537	0.0000	0.0000	0. 3537
IclR	Implicado en el metabolismo de carbono, resistencia a multidrogas, virulencia y señales de *quorum sensing* (WP_000514241.1)	0. 3537	0.0000	0.0000	0. 3537
ExuR	Regulación del metabolismo en genes implicados en la utilización de hexuronato **(**WP_000406486.1)	0. 3537	0.0000	0.0000	0. 3537

FNR	Regulador transcripcional de reducción de fumarato/nitrato (WP_000611911.1)	0.3537	0.0000	0.0000	0.3537
H-NS	Regulador transcripcional de unión al ADN H-NS de tipo histona (WP_001287378.1)	0.3613	0.0000	0.0000	0.3613
EutQ	Interviene en el metabolismo de etanolamina acetato quinasa **(**WP_000733877.1)	0.3537	0.0000	0.0000	0.3537
UvrY	Regulador de respuesta afín para el sensor quinasa BarA (WP_000611328.1)	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
FadR	Optimiza el metabolismo de los ácidos grasos (WP_000234823.1)	0.3613	0.0000	0.0000	0.3613

XRE	Elemento de respuesta xenobiótica (WP_000836620.1)	0.3537	0.0000	0.0000	0.3537
DpiA	Modula la replicación y desestabiliza la herencia de plásmidos (WP_000126500.1)	0.3537	0.0000	0.0000	0.3537
NarL	Activa la transcripción de los genes de nitrato, nitrito reductasa y reprime la transcripción del fumarato reductasa (WP_000070494.1)	0.3613	0.0000	0.0000	0.3613
AsnC	Involucrado en síntesis de asparagina (WP_000432970.1)	0.3537	0.0000	0.0000	0.3537
Regulador transcripcional sensible a Zn (2+)	Media la expresión de la proteína exportadora de zinc ZntA en respuesta a altos niveles de zinc (WP_000285619.1)	0.3537	0.0000	0.0000	0.3537
SlyA	Regulador de genes de virulencia (WP_000445640.1)	0.3537	0.0000	0.0000	0.3537

HicB	Implicada en el crecimiento, la fisiología y la patogenicidad bacteriana (WP_001030482.1)	0.3537	0.0000	0.0000	0.3537
Control positivo	**Proteínas**	**Sseq**	**Sdom**	**Snet**	**Sall**
Aar-AggR	Regulador activado por AggR- Regulador maestro de la virulencia en EAEC.	0.3537	0.0000	0.0000	0.3537
AggR y Aap	Regulador maestro de la virulencia en EAEC- Dispersina, participa en la formación de una capa superficial que dispersa las bacterias.	0.3537	0.0000	0.0000	0.3537
Control negativo	**Proteínas**	**Sseq**	**Sdom**	**Snet**	**Sall**
EspJ-EntC.	Es una ADP-ribosa, inhibe la fagocitosis por la vía Src- Enzima isomerasa que cataliza la biosíntesis de la menaquinona	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000

7.2 Estimación de la afinidad de interacción de las proteínas candidatas con el regulador PerA

De acuerdo con los datos obtenidos con el servidor “PSOPIA”, se introdujeron las secuencias primarias de las proteínas con funciones de reguladores transcripcionales que presentaron alto valor predictivo de interacción y se incluyeron controles para el estudio.

Para este análisis, se utilizó el servidor web “PPA-Pred2”, que predice la energía libre de unión representada por la energía libre de Gibbs (ΔG), el resultado es un valor que indica la suma de las interacciones intermoleculares que podrían ocurrir entre las secuencias. Además, el servidor estima la constante de disociación (kD) que representa la afinidad entre las secuencias analizadas. Los valores de ΔG entre más alejados del 0 indican una interacción favorecida energéticamente. Por otro lado, los valores de kD entre más negativos, indican una mayor estabilidad del complejo (Yugandhar y Gromiha, 2014).

Para predecir la afinidad de unión, el servidor considera los siguientes aspectos: la función de las proteínas, peso molecular y el porcentaje de los residuos de los probables sitios de unión. Tomando en cuenta lo anterior, el programa genera una correlación y así calcula una puntuación de la ΔG y la kD (Yugandhar y Gromiha, 2014).

El análisis de la interacción entre el activador PerA y las proteínas evaluadas predijeron los siguientes valores:

Proteína-Proteína	ΔG (energía libre de enlace)	kD (constante de disociación)
PurR-PerA	-1.07 kcal/mol	7.57e-09 M
IclR-PerA	-5.17 kcal/mol	7.54e-12 M
ExuR-PerA	-11.87 kcal/mol	1.97e-09 M
FNR-PerA	-8.34 kcal/mol	7.65e-07 M
EutQ-PerA	-7.14 kcal/mol	5.77e-06 M
NarL-PerA	-8.43 kcal/mol	6.62e-07 M
KdgR-PerA	-2.70 kcal/mol	4.83e-10 M
ClpX-PerA	-3.60 kcal/mol	1.06e-10 M
Control positivo	**ΔG**	**ΔG**
Aar-AggR	-9.10 kcal/mol	2.10 x 10-8 M
Aap-AggR	-9.12 kcal/mol	2.02 x 10-7 M
RpoA-RpoB	-12.03 kcal/mol	1.5 x 10-11 M
Control negativo		
EspJ-EntC	-4.13 kcal/mol	2.80 x 10-6 M

El análisis mostró para los controles positivos Aar-AggR una ΔG= -9.10 kcal/mol y la kD de 2.10 x 10-8 M mientras que para Aap-AggR: ΔG= -9.12 kcal/mol y la kD de 2.02 x 10-7 M, lo cual estima una interacción relativamente estable y energéticamente favorable como ya fue demostrado experimentalmente.

El complejo que presentó los valores más altos fue el complejo IclR-PerA ya que presentó una ΔG de -5.17 kcal/mol con una kD 7.54e-12 M; ambos valores representan una mayor probabilidad de interacción entre los aminoácidos presentes

en las proteínas así como una mayor probabilidad de estabilidad del complejo. De forma descendente le sigue el complejo KdgR-PerA que presentó una ΔG -2.70 kcal/mol con una kD de 4.83e-10 M; valores muy similares a los presentados por el complejo ClpX-PerA con una ΔG -3.60 kcal/mol y una kD de 1.06e-10 M.

El siguiente complejo PurR-PerA presentó una ΔG -1.07 kcal/mol con una kD de 7.57e-09 M con valores cercanos al del complejo ExuR-PerA que mostró una ΔG -11.87 kcal/mol y una kD de 1.97e-09 M; seguido del complejo FNR-PerA que mostró valores de ΔG -8.34 kcal/mol y una kD de 7.65e-07 M a este complejo le sigue el de NarL-PerA que mostró una ΔG -8.43 kcal/mol y una kD de 6.62e-07 M y finalmente el complejo EutQ-PerA que presentó los valores más bajos con una ΔG -7.14 kcal/mol y una kD de 5.77e-06 M, representando una baja estabilidad y una baja probabilidad de interacción en comparación con los valores antes mencionados.

En contraste, las subunidades de la ARN polimerasa α-β, usadas como control positivo se obtuvieron valores de ΔG = -12.03 kcal/mol y una kD= 1.5 x 10-11 M.

Por último, nuestro control negativo del complejo EspJ-EntC, obtuvieron valores de una ΔG = -4.13 kcal/mol y una kD = 2.80 x 10-6 M. Resultados que sugieren una baja probabilidad de interacción y baja estabilidad entre estas proteínas.

Los resultados del análisis se concentraron y compararon en la Tabla 7 con los valores obtenidos previamente en “PSOPIA” para seleccionar los mejores resultados y así continuar con los ensayos bioinformáticos.

Tabla 7. Resultados de la evaluación de interacción proteína-proteína “PSOPIA” y “PPA-Pred2”					
Proteína	**N° de acceso (GenBank)**	**# PSOPIA Predicción de resultados de interacción con PerA**		**Valor previsto de Delta G (energía libre de enlace)**	**Kd (constante de disociación)**
		Sseq	**Sall**	**ΔG**	**kD**
Regulador transcripcional de la familia **PurR**	WP_000190985.1	0.3537	0.3537	-1.07 kcal/mol	7.57e-09 M
Subunidad de unión a ATP **ClpX**	WP_000130305.1	0.4187	0.4187	-3.60 kcal/mol	1.06e-10 M
Regulador transcripcional de unión al ADN **KdgR**	WP_001262188.1	0.3613	0.3613	-2.70 kcal/mol	4.83e-10 M
Regulador transcripcional de la familia **DeoR /Glrp**	WP_001296480.1	0. 3537	0. 3537	No mostró valor	No mostró valor

Regulador transcripcional de la familia **IclR**	WP_000514241.1	0. 3537	0. 3537	-5.17 kcal/mol	7.54e-12 M
Regulador transcripcional **ExuR**	WP_000406486.1	0. 3537	0. 3537	-11.87 kcal/mol	1.97e-09 M
Regulador transcripcional **FNR**	WP_000611911.1	0.3537	0.3537	-8.34 kcal/mol	7.65e-07 M
Proteína de unión al ADN **H-NS**	WP_001287378.1	0.3613	0.3613	N/A	N/A
Proteína de utilización de etanolamina **EutQ**	WP_000733877.1	0.3537	0.3537	-7.14 kcal/mol	5.77e-06 M
Regulador de respuesta del sistema de dos componentes **NarL**	WP_000070494.1	0.3613	0.3613	-8.43 kcal/mol	6.62e-07 M

7.3 Búsqueda de los posibles sitios de interacción entre las proteínas con el activador PerA

Para determinar los sitios de probable interacción entre las proteínas seleccionadas y PerA, se introdujeron las secuencias primarias al servidor web “iFrag”. Este servidor se utiliza para buscar la similitud de la secuencia primaria mínima entre un par de proteínas para predecir alguna(s) región(es) de interacción entre las secuencias evaluadas, considerando solo la secuencia primaria.

Este servidor establece una calificación a cada residuo utilizando una base de datos de proteínas que ya se ha demostrado experimentalmente que tienen interacción. Como resultado del análisis se genera un mapa de colores con las puntuaciones de los pares de residuos (regiones cortas) que potencialmente interactúan entre las dos proteínas (Garcia-Garcia *et al*., 2017).

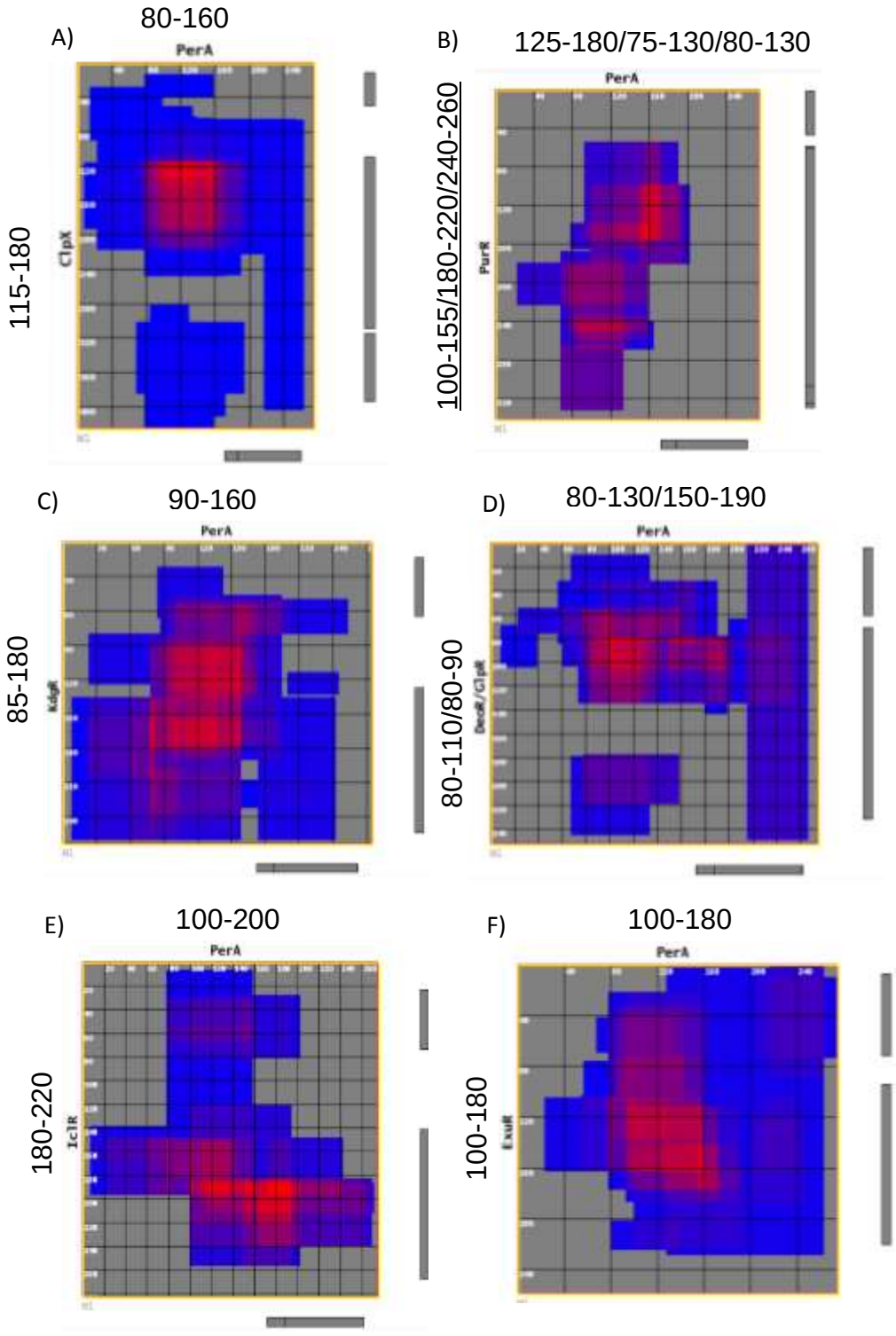
Además, los resultados pueden mostrar anotaciones de otras bases de datos como Uniprot y los dominios PFAM (Garcia-Garcia *et al*., 2017).

Los resultados del servidor mostraron sitios de interacción variados según la interacción de cada secuencia (Figura 6, A-J). De forma interesante, los análisis muestran que las posiciones identificadas de interacción en la secuencia de PerA, con las proteínas candidatas, están situadas principalmente en la parte media y final del dominio N-terminal, zona de conector (161-163) y parte inicial del dominio C-terminal (164-274), como se observa en FnR en las regiones 100-155/180-220/240-260 con la región 125-180/75-130/80-130 en PerA; ExuR en la región 100-180 con PerA en 100-180; ClpX en la región 115-180 con PerA en 80-160; KdgR en la región 85-180 con PerA en 90-160 e IclR en la región 180-220 con PerA en 100-200. Lo anterior sugiere que la interacción con estos reguladores analizados ocurre entre la región que flanquea al sitio conector como lo que se ha descrito en otro estudio (Ibarra *et al*., 2013). En el caso de la interacción del control positivo Aar y AggR (H), los resultados sugieren una interacción en las posiciones 27 a 41 de Aar con una región en AggR que comprende desde 115 al 158, regiones adicionales incluyen del 19 al 55 en Aar, 27 a 63 en AggR, 26 a 41 (Aar), 170 a 209 (AggR).

Lo anteriormente mencionado es consistente con los resultados obtenidos experimentalmente por Santiago *et al*., (2016), quienes identificaron la unión de Aar con la región central de AggR (68-182). Esta unión se atribuye a residuos localizados en la segunda y tercera héñice de Aar, específicamente en los conjuntos 26-27 y 32-34 en la segunda hélice, así como 44-45, 48-49, 50-51 y 52-53 en la tercera hélice.

Lo anteriormente mencionado es consistente con los resultados obtenidos experimentalmente por Santiago *et al.* (2016), quienes identificaron la unión de Aar con la región central de AggR (68-182). Esta unión se atribuye a residuos localizados en la segunda y tercera hélice de Aar, específicamente en los conjuntos 26-27 y 32-34 en la segunda hélice, así como 44-45, 48-49, 50-51 y 52-53 en la tercera hélice.

Adicionalmente, el control positivo de las subunidades de α y β de la ARN polimerasa (Figura 6-I), mostró una región bien definida de probable interacción, mientras que para el control negativo EspJ-EntC (Figura 6-J), no se obtuvo resultados de probable interacción dentro de las secuencias.


A)
80-160
PerA
ClpX
115-180
B)
125-180/75-130/80-130
PerA
PurR
100-155/180-220/240-260
C)
90-160
PerA
KdgR
85-180
D)
80-130/150-190
PerA
DeoR/ClpR
80-110/80-90
E)
100-200
PerA
IclR
180-220
F)
100-180
PerA
ExuR
100-180

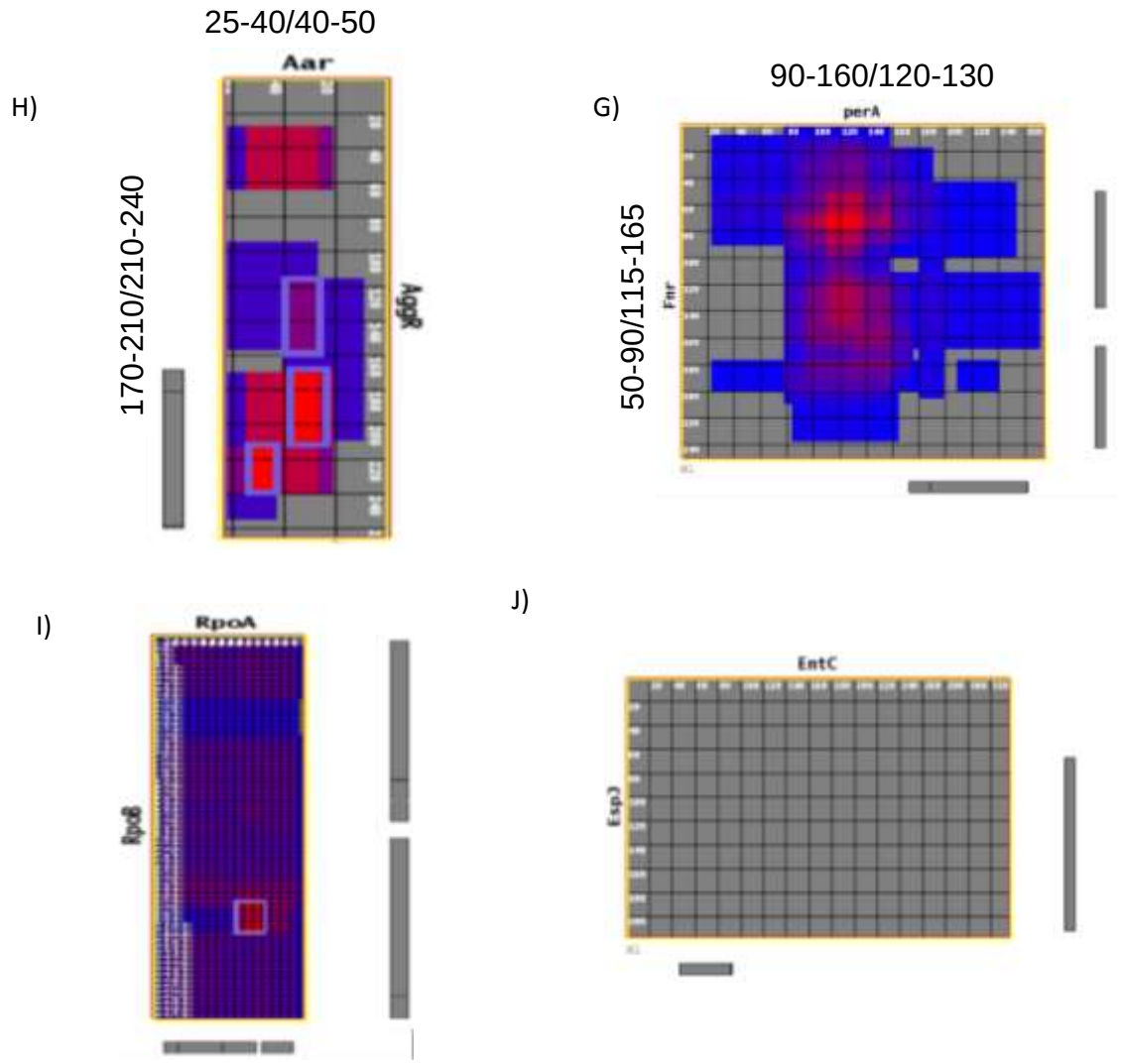


Figura 6. Sitios probables de interacción de las proteínas analizadas con el regulador PerA.

Mapas de contacto que representan los sitios probables de interacción entre las secuencias de las proteínas analizadas. Las regiones en color rojo muestran una puntuación mayor de interacción. En color azul muestran una puntuación baja de interacción y los de color gris una nula interacción.
A-G muestran las proteínas que posiblemente interactúan con el regulador PerA, H e I muestra los grupos control con sitios definidos de contacto, finalmente J muestra el control negativo. Adicionalmente, se muestran los dominios proteicos generados automáticamente por PFAM. Imagen generada en: “iFrag” (http://sbi.imim.es/iFrag/).

7.4 Predicción del modelo de la estructura PerA utilizando Colab fold/Alpha fold 2.

En trabajos realizados anteriormente para la predicción de modelos de estructura de PerA, dada la complejidad para obtener un modelo cristalizado, solo se habían podido generar modelos por homología basados en proteínas de la familia AraC/XylS como Rob (PDB entrada 1D5Y cadena A) de *E. coli*. Sin embargo, el modelo resultante sólo incluía 112 de los 274 residuos ubicados en el extremo carboxilo terminal de PerA y no toda la proteína (Ibarra *et al*., 2013; Lara-Ochoa *et al*., 2021).

En este trabajo, se generó un modelo de la proteína PerA (Figura 20) para realizar el análisis predictivo. Para ello, se utilizó AlphaFold2, una plataforma basada en inteligencia artificial que predice la estructura tridimensional de una proteína a partir de la información de su secuencia de aminoácidos (Varadi *et al*., 2022).

En este trabajo, se generó un modelo de la proteína PerA (Figura 20) para realizar el análisis predictivo. Para ello, se utilizó AlphaFold2, una plataforma basada en inteligencia artificial que predice la estructura tridimensional de una proteína a partir de la información de su secuencia de aminoácidos (Varadi *et al*., 2022).

Posteriormente, se generó el modelo de interacción PerA con IclR con la plataforma AlphaFold2 adaptado en su versión ColabFold para generar modelos complejos en su estado oligomérico que a su vez se analizaron para determinar su calidad, evaluando dos métricas: la primera pLDDT (predicted local-distance difference test) que predice diferencias en las distancias y evalúa la corrección del modelo estimado y la segunda PAE (Predicted Aligned error) que compara el error en la predicción de pares de residuos entre la estructura y los residuos predichos (Figura 8) (Jumper *et al*., 2021).

7.5 Predicción de modelos complejos oligoméricos utilizando Colab fold/Alpha fold 2.

Considerando los resultados de los análisis bioinformáticos anteriores se seleccionó a IclR para generar un modelo de interacción molecular con PerA. Esto se debe a que, en conjunto, presentó los valores más altos en la constante de disociación, la energía libre de enlace, predicción de interacción en el mapa de

contacto entre las secuencias; lo que sugieren una probabilidad más alta de interacción con el regulador PerA.

La proteína IclR (Isocitrate lyase regulator), es un regulador que pertenece a la familia que lleva el mismo nombre y que incluye tanto a activadores, represores y proteínas con actividad dual (Figura 7) (Yamamoto y Ishihama, 2003).

Esta familia regula eventos fisiológicos y funciones como: derivación en la ruta del glioxilato, metabolismo de los aminoácidos, producción de antibióticos, percepción del quórum, formación de biopelícula y regulación de bombas para la salida de fármacos (Yamamoto y Ishihama, 2003; zhou *et al*., 2012).

Esta familia se caracteriza por contener un motivo HTH en su extremo N-terminal y generalmente tienen un tamaño que va de 240 a 280 residuos (Molina *et al*., 2024).

IclR es fundamental para crecer en acetato o ácidos grasos, para la inducción de la derivación de glioxilato. El operón *iclr* codifica tanto las enzimas metabólicas como las reguladoras del bypass de glioxilato. Esta ruta consta de isocitrato liasa (*aceA*) y malato sintasa (*aceB*), y es esencial para el crecimiento en estas fuentes de carbono (Chung *et al*., 1988; Nègre *et al*., 1992; Yamamoto y Ishihama, 2003).

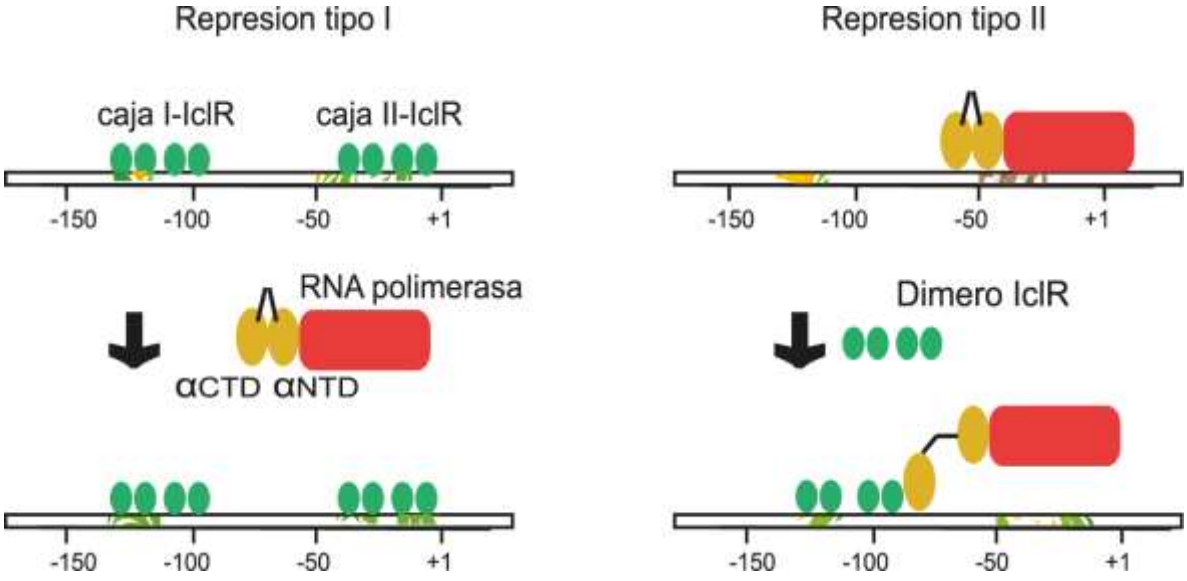


Figura 7. Dos mecanismos de represión ejercida por IclR.
La represión de IclR ocurre a través de dos mecanismos: 1) Inhibición competitiva por IclR de la unión de la ARN polimerasa al promotor *aceB* y 2) disociación por IclR del complejo abierto formado en el promotor *aceB* (Yamamoto y Ishihama, 2003).

AlphaFold2 incorpora métricas de confianza para la predicción del modelo. La métrica principal es el test pLDDT, un predictor confiable de diferencias en las distancias Cα (IDDT-Cα) y principalmente evalúa la corrección del modelo a nivel local estimando el error en las distancias en un rango de 15 Å. El segundo filtro es PAE que compara el error en la predicción de pares de residuos; es decir, el error sobre el residuo y cuando las estructuras real y predicha son alineadas sobre el residuo analizado. Esta métrica permite la identificación de unidades de plegamiento y predice si los dominios tienen relación espacial definida o si tienen una diferencia (Jumper *et al*., 2021).

Adicionalmente se utilizó el servidor HawkDock (http://cadd.zju.edu.cn/hawkdock) que funciona reordenando las posiciones de acoplamiento proteína-proteína, para identificar los residuos clave, calculando la energía libre de unión del complejo y con el que nuestro complejo evaluado obtuvo una puntuación -27.47 (kcal/mol) indicando en su conjunto un modelo estable y con alta probabilidad de interactuar en residuos clave (Figura 8) (Weng *et al*., 2019).

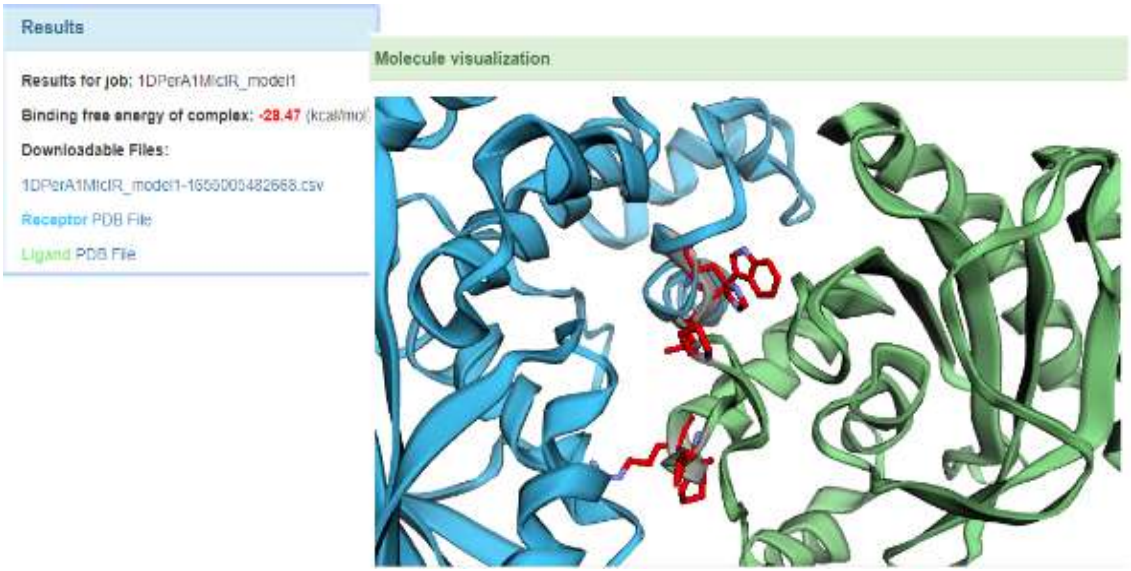


Figura 8. Posiciones de acoplamiento del complejo IclR-PerA con servidor HawkDock
Identificación de los residuos clave calculando la energía libre de unión del complejo establecido entre las proteínas IclR (azul) con PerA (verde), obteniendo un valor favorable para su estabilidad (Weng *et al*., 2019).

El modelo generado con AlphaFold2 se analizó a detalle con el visualizador molecular PyMOL (https://pymol.org/2/).

La Figura 9 muestra el modelo IclR-PerA resaltando los residuos con potencial interacción en las regiones de cada proteína. En color azul se presenta la proteína IclR (i) con los residuos His-207 y ASN-208 ubicados en la octava alfa hélice que mantienen contacto con los residuos de PerA (ii) en ASN-115, GLU-116, MET-117 Y ASN-120 ubicados en la segunda alfa hélice (a y b); en otra región se muestra el contacto de los residuos de IclR LYS-57 Y ARG-55 de la tercera alfa hélice con los residuos SER-102, ASP-101 Y SER-99 del final de la primeria alfa hélice de PerA (c y d).

La Figura 10 muestra la distancia entre los contactos producidos entre los residuos inferiores a los 3 Å lo que implicaría un contacto proteína-proteína del complejo modelado.

Los resultados coinciden en mostrar contacto en región cercana que flanquea al sitio conector y que en otros análisis de PerA las energías libres de enlace de los residuos predichos sugieren una alta posibilidad de interacción proteína-proteína (González *et al*., 2019; Ibarra *et al*., 2013; Lara-Ochoa *et al*., 2021).

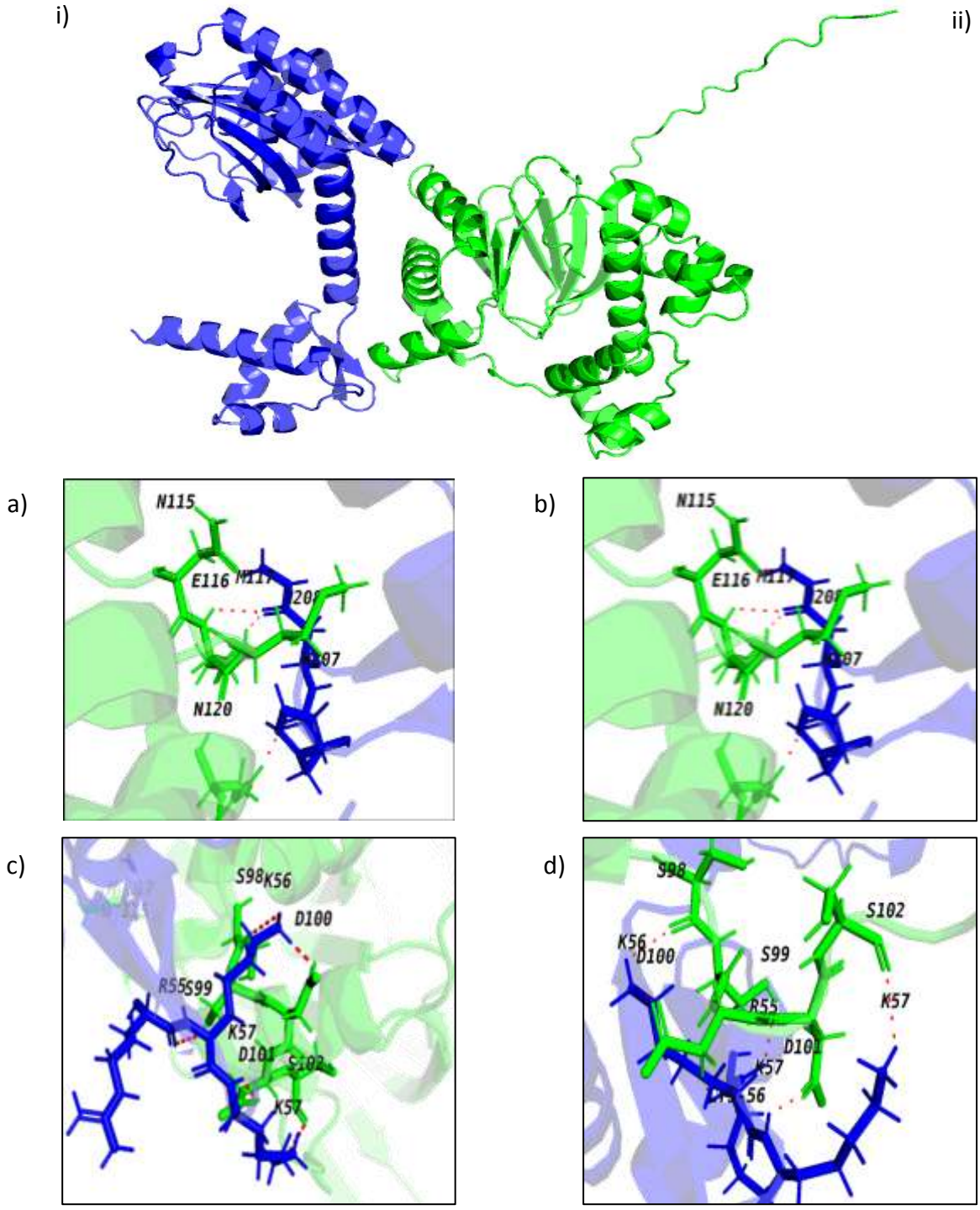


Figura 9. Modelo de acoplamiento molecular de PerA-IclR.
IclR-PerA modelado en ALPHAFOLD2 en su forma oligomérica, visualizado y modificado en PyMOL. Se muestran residuos con potencial interacción entre las proteínas modeladas, los residuos de IclR se muestran en color azul y PerA en color verde, las líneas verdes punteadas remarcan sitios de potencial interacción a una distancia inferior a los 3 Å. Residuos de PerA (ii) en ASN-115, GLU-116, MET-117 y ASN-120 ubicados en la segunda alfa hélice (a y b); contacto de los residuos de IclR LYS-57 Y ARG-55 de la tercera alfa hélice con los residuos SER-102, ASP-101 Y SER-99 del final de la primeria alfa hélice de PerA (c y d). (Varadi *et al*., 2022) La figura se generó utilizando Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, versión 2.0 Schrödinger, LLC).

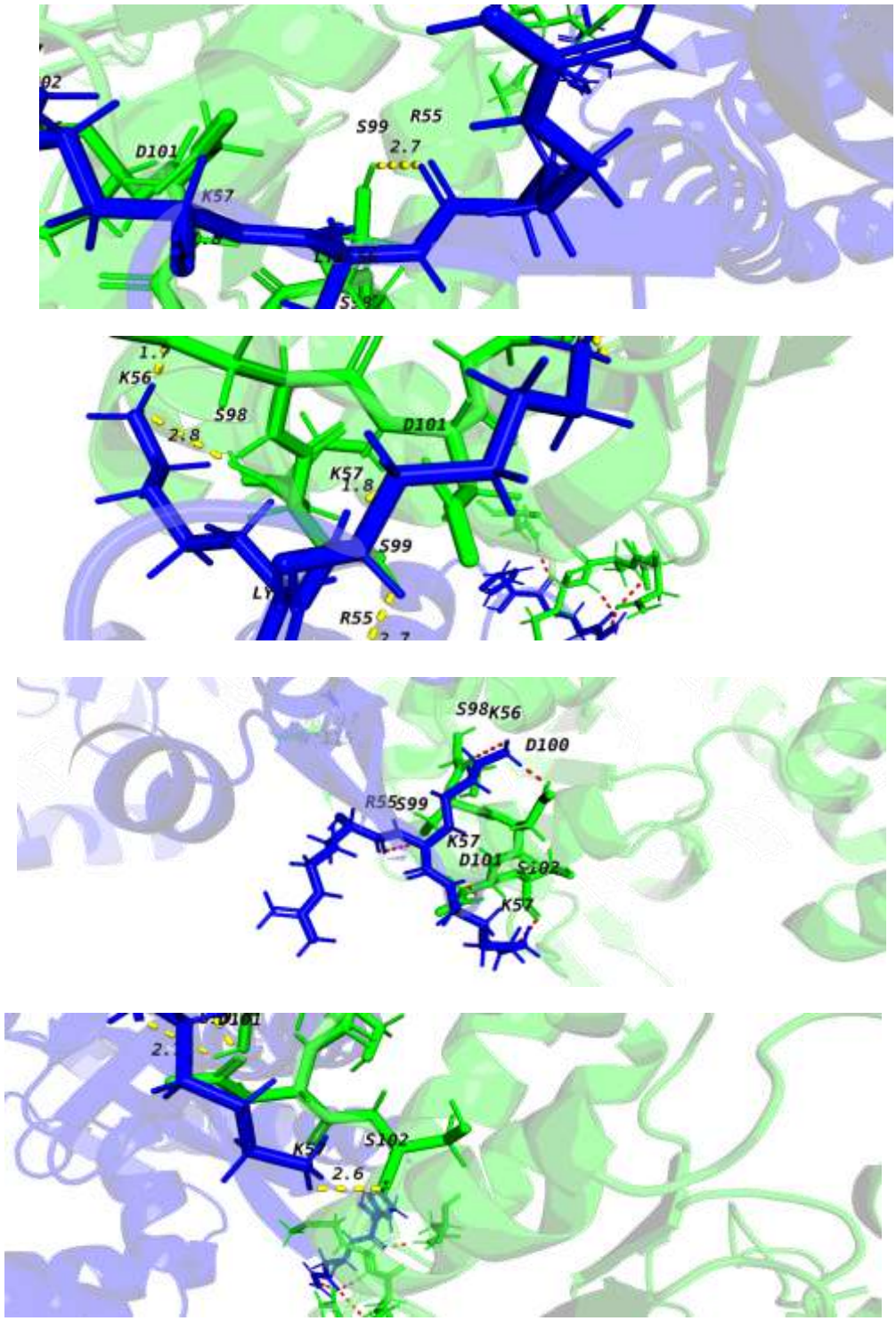


Figura 8. Distancias estimadas entre los residuos de aminoácidos de las proteínas IclR-PerA

Distancias estimadas de los residuos de aminoácidos inferiores a los 3 Å, que ilustran los contactos proteína-proteína más importante del complejo IclR (azul)-PerA (verde).

7.6 Clonación de *iclR* en pBAD/Myc-His A

Para realizar la clonación del gen *iclR* se diseñaron oligos que amplifican la región estructural de *iclR* (849 pb) y que insertan los sitios de corte para las enzimas *Nco*I y *Hind*III. Los productos amplificados se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, al mismo tiempo se analizó el vector pBAD-Myc-His A (Figura 11).

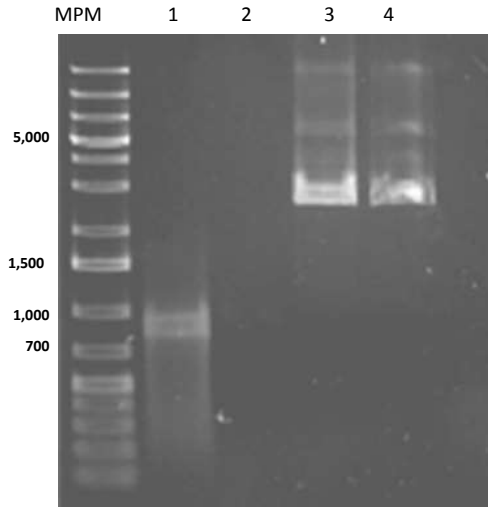


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa del producto de PCR de iclR
Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. MPM: Marcador de peso molecular, 1) PCR de *iclR*, 2) vacío, 3 y 4) pBAD. En negritas se resaltan las bandas de MPM cercanas al peso de los productos obtenidos.

El producto de la PCR y el DNA del vector fueron digeridos con las enzimas *Nco*I y *Hind*III y ligadas con la DNA ligasa**.** La reacción de ligación se introdujo por transformación química en la cepa de *E. coli* DH5α. Para caracterizar y seleccionar la construcción, las colonias candidatas se picaron al azar y se replicaron en una placa preparada con agar LB y ampicilina, el resto se inoculó en un tubo para analizar mediante PCR utilizando los oligos que hibridan en el vector. Los productos de la PCR obtenidos fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1 % y visualizados con bromuro de etidio (Figura 12) las clonas que amplificaron el fragmento esperado compuesto aproximadamente por: 257 pb pBAP (vector) + 827 pb IclR (inserto)= ~1084 pb.

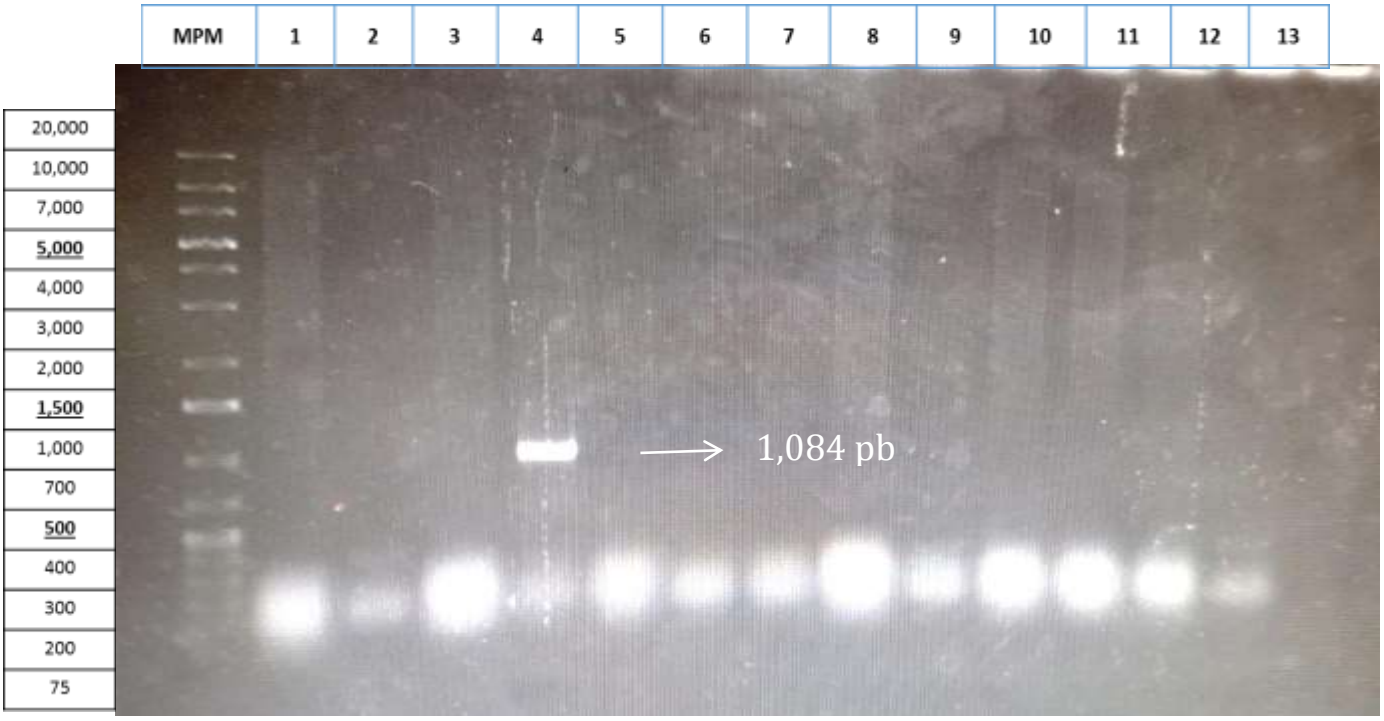


Figura 12. PCR de colonia de la construcción pBAD/Myc-HisA+IclR en *E. coli* DH5α.

Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. MPM) Marcador de Peso Molecular. 1-13) Carriles según la colonia de la PCR. Con la flecha blanca se resalta el fragmento amplificado con la construcción deseada y en blanco el tamaño aproximado resultado de la suma: 257 pb *pBAP* (fragmento del vector) + 827 pb *iclR* (inserto)= ~1084 pb estimados.

7.7 Evaluación de la sobreexpresión de IclR-6XH

Una vez caracterizada y seleccionada la construcción deseada se evaluó la sobreexpresión de la construcción resultante IclR-6XH. Se seleccionó la construcción que tuviera el inserto del tamaño esperado. El plásmido resultante y el vector vacío se transformaron en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) para evaluar la expresión de IclR-6XH (~33 kDa incluyendo la etiqueta de histidinas).

Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron que la traducción de IclR fue satisfactoria debido a que se observó la sobreexpresión de una banda del tamaño esperado (~33 kDa) (Figura 13). Dicha banda se identificó cuando se indujo con arabinosa (Figura 13, carriles 5, 6 y 7), mientras que sin inducción o en el carril de la cepa con vector no fue visible (Figura 13, carriles 2,3 y 4).

El asterisco señala productos no identificados de un peso aproximado de ~50 kDa que se observa una disminución en su expresión al sobreexpresar IclR con 0.2 de arabinosa.

La flecha azul indica a IclR-6XH sobreexpresado en diferentes concentraciones de arabinosa.

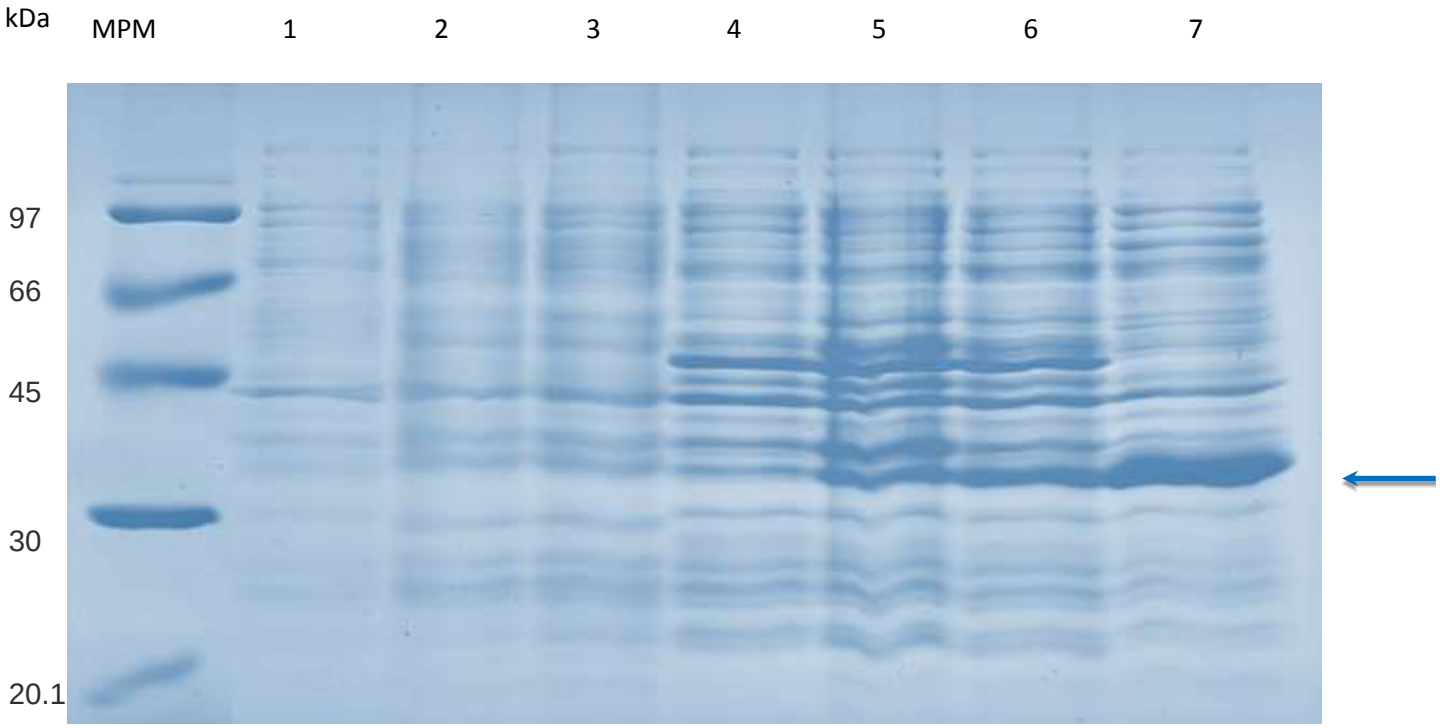


Figura 13. Perfil de proteínas totales portando el pBAD-IclR con diferentes concentraciones de arabinosa.
SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie de las proteínas obtenidas de la sobreexpresión de IclR con diferentes concentraciones de arabinosa. Marcador de peso molecular (MPM), 1) EPEC WT, 2) EPEC WT pBAD, 3) EPEC WT pBAD+0.2 arabinosa, 4) EPEC WT pBAD-IclR sin inducir, 5) EPEC WT pBAD-IclR +0.002% arabinosa, 6) EPEC WT pBAD-IclR 0.02% arabinosa, 7) EPEC pBAD-IclR+0.2% arabinosa. La fecha azul señala el a IclR-6XH de ~33 kd, expresado en diferentes concentraciones de arabinosa.

Finalmente, se evaluó el efecto de la sobreexpresión de IclR-6XH sobre las proteínas de virulencia de EPEC. Los resultados indicaron que la sobreexpresión de IclR inducida con 0.2% de arabinosa provocó una disminución en el perfil de las proteínas de virulencia secretadas (datos no mostrados). Esto sugiere que IclR podría actuar como un represor de la virulencia a través de PerA. Estos hallazgos serán analizados con mayor detalle en nuestro grupo de investigación.

8. DISCUSIÓN

Las bacterias cuentan con vías de regulación que responden a procesos complejos frente a diferentes señales ambientales a las que se exponen, como el pH, nutrientes o temperatura, basada en la expresión o represión de genes que le permiten la supervivencia, adaptación y en casos específicos, colonizar y generar daño. El estudio de esta regulación es un proceso complejo que enfrenta retos para su análisis *in vivo*.

Particularmente en EPEC, parte de su regulación aún es desconocida, debido entre otras cosas a que es un patógeno de infantes y no se cuenta con modelos animales. Sin embargo, algunos avances en el campo de la bioinformática podrían ayudar en el análisis de la interacción de la red compleja que se orquesta dentro de las bacterias.

En este trabajo se analizó el activador transcripcional PerA, tomando las aportaciones de Puente, Martínez-Laguna e Ibarra y como referencia principal el trabajo de Fabiola González Lara en 2019 que identificó una serie de proteínas que podrían estar modulando la función del regulador transcripcional PerA (Clements *et al*., 2012; González *et al*., 2019; Lara-Ochoa *et al*., 2021).

La primera parte de los análisis *in sillico* realizados con “PSOPIA” con el listado de proteínas (Tabla 1) mostraron los mejores valores, comenzando por la proteasa ClpX con 0.4187, seguido de 0.3537 para las proteínas PurR, DeoR/GlpR, IclR, ExuR, FNR, EutQ y finalmente 0.3613 para: NarL, EspD, KdgR.

Algunas de estas proteínas comparten como característica ser reguladores moleculares o que en su mayoría comparten al menos un motivo de unión a ADN tipo HTH. Los valores obtenidos fueron similares a los encontrados con pares de secuencias que previamente se han analizado y se tiene evidencia experimental de que tienen contacto como: Aar y AggR al igual que AggR y Aap (Rodriguez-Valverde *et al*., 2023; Santiago *et al*., 2014; Santiago *et al*., 2017).

En adición, el servidor web “PPA-Pred2” mostró valores positivos para la formación de complejos proteicos estables (kD) y energéticamente favorables (ΔG) destacando a las proteínas: IclR, ExuR, FNR, EutQ, NarL, EspD y ClpX como se ve en la Tabla 7. Estas proteínas mostraron resultados cercanos a los obtenidos con los controles: Aar-AggR y Aap-AggR que obtuvieron una ΔG= -9.10

kcal/mol y la kD de 2.10 x 10-8 M mientras que para la segunda: ΔG= -9.12 kcal/mol y la kD de 2.02 x 10-7 M.

Para complementar los análisis se determinaron los posibles sitios de interacción entre las proteínas evaluadas y PerA utilizando el servidor “iFrag”. Los resultados se ven ilustrados en un mapa de contacto que representa en color rojo las regiones con mayor probabilidad de interacción y en color azul las de menor probabilidad de contacto (Garcia-Garcia *et al*., 2017).

Los mapas de contacto generados del análisis coincidieron con los mejores valores de los previos análisis destacando los complejos formados por: ClpX, PurR, KdgR, DeoR/GlpR, IclR, ExuR, EspD y FNR.

De manera particular, las posiciones identificadas en los diferentes complejos analizados comparten que en la secuencia de PerA las regiones de contacto están situadas en la parte media, zona del conector (161-163), parte inicial del dominio C-terminal (164-274), indicando que podrían poseer un sitio probable de interacción ubicado entre la región que flanquea al sitio conector como se ha descrito en otros estudios(Ibarra *et al*., 2013).

En conjunto, los análisis mostraron los mejores resultados para las proteínas ClpX, PurR e IclR. El primero de estos, ClpX arrojó valores de 0.4187 en “PSOPIA” y -3.60 kcal/mol, 1.06e-10 M en “PPA-Pred2” con regiones de contacto entre 180 a 160 para PerA y 115 a 180 para ClpX. En el caso de PurR mostró valores de 0.3537 en “PSOPIA”, -1.07 kcal/mol, 7.57e-09 M con “PPA-Pred2” y sitios de contacto en la región 125-180/75-130/80-130 para PerA y 100-155/180-220/240-260 en PurR.

Finalmente se decidió continuar el análisis con IclR que obtuvo en “PSOPIA” 0.3537 y valores positivos para la formación y estabilidad de complejos con valores de: ΔG= -5.17 kcal/mol y la kD de 7.54 x 10-12 M en “PPA-Pred2” con un mapa de contacto (Figura 6 E) mostrando sitios importantes de contacto en las regiones de 180 a 220 con PerA y 100 a 200 en IclR.

Esta proteína fue una de las candidatas encontradas en condiciones de represión (presencia de sales de amonio) en el análisis de Gonzales Lara, y se destaca por pertenecer a la familia que lleva su nombre que incluye tanto a activadores,

represores y proteínas con actividad dual (González *et al*., 2019; Yamamoto y Ishihama, 2003). Esta familia regula eventos fisiológicos y funciones diversas como: la derivación en la ruta del glioxilato, metabolismo de los aminoácidos, producción de antibióticos, percepción del quórum, formación de biopelícula y regulación de bombas para la salida de fármacos (Yamamoto y Ishihama, 2003; zhou *et al*., 2012).

Para analizar la interacción con PerA se generó un modelo de acoplamiento molecular utilizando el programa Alpha Fold2 que en términos simples funciona como si a medida que avanza el análisis y dependiendo de la información que obtiene, el algoritmo imita la forma en la que una persona armaría un rompecabezas: colocando primero las piezas en grupos pequeños, en este caso aminoácidos, y luego buscando la forma de unir estos grupos en un todo.

Alpha Fold2 generó un modelo de IclR-PerA (Figura 9) con un alto grado de confianza y luego fue analizado en el visualizador molecular Pymol resaltando los residuos con alto potencial de interacción en las regiones de cada proteína.

En color azul se presenta la proteína IclR (i) con los residuos His-207 y ASN-208 ubicados en la octava alfa hélice mantienen contacto con los residuos de PerA (ii) en ASN-115, GLU-116, MET-117 Y ASN-120 ubicados en la segunda alfa hélice (a y b); en otra región se muestra el contacto de los residuos de IclR LYS-57 Y ARG-55 de la tercera alfa hélice con los residuos SER-102, ASP-101 Y SER-99 del final de la primeria alfa hélice de PerA (c y d).

El modelo de acoplamiento molecular también destaca que en esas regiones la distancia de contacto es inferior a los 3 Å, una distancia que estima una alta probabilidad de interacción proteína-proteína; apoyando la premisa de que el contacto se establece en la región que flanquea el sitio del conector en PerA.

Adicionalmente, el análisis con HawkDock estimó una energía libre de unión del complejo de -27.47 (kcal/mol), un valor favorable para la formación y estabilidad del complejo.

Con base en los resultados bioinformáticos se caracterizó y seleccionó la construcción deseada para evaluar la sobreexpresión de la construcción resultante IclR-6XH. Para ello se seleccionó la construcción que tuviera el inserto del tamaño

esperado. El plásmido resultante y el vector vacío se transformaron en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) para evaluar la expresión de IclR-6XH (32 kDa incluyendo la etiqueta de histidinas).

Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron que la traducción de IclR fue satisfactoria debido a que se observó la sobre expresión de una banda del tamaño esperado (~33 kDa) (Figura 13). Dicha banda se identificó cuando se indujo con arabinosa (Figura 13, carriles 5, 6 y 7), mientras que sin inducción o en el carril de la cepa con vector no fue visible (Figura 13, carriles 2,3 y 4).

En conjunto, los análisis bioinformáticos mostraron que el complejo molecular PerA-IclR podría mostrar una interacción energéticamente estable y favorable presentando posibles sitios de contacto entre la primera y segunda alfa hélice del regulador PerA con IclR. Además, la parte experimental mostró que la sobre expresión de *iclR*, podría jugar un papel importante en la regulación de otros genes presentes en EPEC ya sea de forma directa o indirecta como parte de la regulación ambiental frente a un entorno privado de nutrientes cuando no ha llegado a su nicho bacteriano. Además, por la naturaleza de IclR al controlar diversos procesos sobre el metabolismo no se descarta que pueda controlar otros factores que intervengan en la regulación de la virulencia de EPEC ya que aún no se cuenta con estudios que lo sugieran.

Los resultados obtenidos en este proyecto aportan información importante sobre la interacción presuntiva de IclR con PerA, que puede usarse en estudios futuros más específicos para develar la forma de interactuar con PerA y el impacto en la patogénesis de EPEC. A su vez los resultados de este proyecto, nos proporcionan información importante sobre las proteínas que interaccionan presuntivamente con PerA y que podrán usarse en estudios futuros más específicos para develar la regulación mediada por PerA en la patogénesis de EPEC, aportando un enfoque metodológico para estudiar de forma más específica tanto proteínas con un alto potencial de interacción así como regiones dentro de las mismas para estudios más puntuales.

9. CONCLUSIONES

- Mediante análisis *in silico* se identificaron diversos reguladores transcripcionales, a partir de los datos de Lara-Ochoa *et al*., 2021, que mostraron una alta predicción para la interacción con PerA, estas proteínas incluyen a: IclR, KdgR, ClpX, PuR, ExuR, FnR y NarL.
- Los sitios probables de interacción en PerA con los reguladores transcripcionales analizados sugieren residuos de aminoácidos (80-200) que forman el sitio conector y parte del carboxilo terminal de este regulador.
- Los análisis bioinformáticos indicaron altos valores de predicción entre la interacción PerA con IclR. Un regulador transcripcional de la vía del glioxilato y del que no se tiene evidencia hasta el momento de su participación en la regulación de virulencia en este patógeno. Los residuos de aminoácidos de PerA involucrados en la interacción con IclR sugieren que se ubican entre las posiciones 100 a 200 y para IclR entre 180-220.
- Este trabajo permitió generar un modelo *in silico* de PerA que comprende la proteína completa y que no existía anteriormente, dicho modelo es de gran importancia para estudiar las interacciones que establece este importante regulador de virulencia con otras proteínas y que podrían estar modulando su función.
- El modelo de acoplamiento molecular PerA-IclR generado sugiere que los residuos de aminoácidos importantes en la interacción incluyen 2 regiones: en la primera región los residuos His-207 y ASN-208 de IclR mantienen contacto con los residuos ASN-115, GLU-116, MET-117 y ASN-120 de PerA; la segunda región predice el contacto de los residuos de IclR LYS-57 y ARG-55 con los residuos de PerA SER-102, ASP-101 y SER-99.
- Se realizó la construcción del plásmido pBAD-IclR y se comprobó la sobreexpresión de esta proteína en el fondo genético de la cepa BL21. Se sugiere que IclR-6XH es un represor de virulencia porque la sobreexpresión disminuyó la secreción de proteínas de virulencia en EPEC. Dicha construcción servirá para evaluar a detalle el efecto sobre los genes de virulencia de EPEC y la relación con PerA.
- La función de PerA como activador transcripcional podría ser modulada a través de la interacción con más de un regulador transcripcional ya que en los análisis *in silico* se identificaron varías proteínas con valores favorables que podrían ser objeto de estudio.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar la sobreexpresión de IclR sobre la expresión de los genes de virulencia y purificar la proteína IclR para evaluar la interacción directa con PerA a través de ensayos de interacción proteína-proteína bajo diferentes condiciones.
- Generar mutantes de IclR en los residuos de aminoácidos que mostraron alta probabilidad de interacción con PerA.
- Generar mutantes de PerA en los residuos de aminoácidos que mostraron alta probabilidad de interacción con IclR.
- Evaluar la interacción de los demás reguladores transcripcionales que obtuvieron resultados prometedores, mediante ensayos de interacción proteína-proteína.
- Generar mutantes cromosomales de dichos reguladores transcripcionales para analizar el efecto y su participación en la regulación de virulencia de este patógeno.
- Generar modelos de interacción más complejos con la última versión de AlphaFold3 en su versión ColabFold con más de un par de proteínas y añadiendo regiones de ADN.

11. BIBLIOGRAFÍA

(IHME), I. d. E. y. M. d. l. S. (2021). *Resultados del Estudio de carga global de enfermedades 2019* Seattle, Estados Unidos: IHME

Abe, H., Miyahara, A., Oshima, T., Tashiro, K., Ogura, Y., Kuhara, S.,…Tobe, T. (2008). Global regulation by horizontally transferred regulators establishes the pathogenicity of Escherichia coli. *DNA Res*, *15*(1), 25-38. https://doi.org/10.1093/dnares/dsm033

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. *J Bacteriol*, *187*(23), 7918-7930. https://doi.org/10.1128/JB.187.23.7918-7930.2005

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. *Mol Microbiol*, *39*(3), 664-678. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02209.x

Chang, H., Guo, J., Wei, Z., Huang, Z., Wang, C., Qiu, Y.,…Zeng, M. (2021). Aetiology of acute diarrhoea in children in Shanghai, 2015-2018. *PLoS One*, *16*(4), e0249888. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0249888

Chung, T., Klumpp, D. J., & LaPorte, D. C. (1988). Glyoxylate bypass operon of Escherichia coli: cloning and determination of the functional map. *J Bacteriol*, *170*(1), 386-392. https://doi.org/10.1128/jb.170.1.386-392.1988

Clements, A., Young, J. C., Constantinou, N., & Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic Escherichia coli. *Gut Microbes*, *3*(2), 71-87. https://doi.org/10.4161/gmic.19182

Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*, *8*(1), 26-38. https://doi.org/10.1038/nrmicro2265

Dean, P., y Kenny, B. (2009). The effector repertoire of enteropathogenic E. coli: ganging up on the host cell. *Curr Opin Microbiol*, *12*(1), 101-109. https://doi.org/10.1016/j.mib.2008.11.006

Donnenberg, Seth, y Michael. (2013). *Escherichia coli Pathotypes and Principles of Pathogenesis* (Vol. 2).

Donnenberg, M. S., & Finlay, B. B. (2013). Combating enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) infections: the way forward. *Trends Microbiol*, *21*(7), 317-319. https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.05.003

Donnenberg, M. S., Girón, J. A., Nataro, J. P., y Kaper, J. B. (1992). A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic Escherichia coli associated with localized adherence. *Mol Microbiol*, *6*(22), 3427-3437. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1992.tb02210.x

Dupont, A., Sommer, F., Zhang, K., Repnik, U., Basic, M., Bleich, A.,…Hornef, M. W. (2016). Age-Dependent Susceptibility to Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) Infection in Mice. *PLoS Pathog*, *12*(5), e1005616. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005616

Elliott, S. J., Wainwright, L. A., McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Deng, Y. K., Lai, L. C.,…Kaper, J. B. (1998). The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic Escherichia coli E2348/69. *Mol Microbiol*, *28*(1), 1-4. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00783.x

Farfán-García, A. E., Ariza-Rojas, S. C., Vargas-Cárdenas, F. A., y Vargas-Remolina, L. V. (2016). [Virulence mechanisms of enteropathogenic Escherichia coli]. *Rev Chilena Infectol*, *33*(4), 438-450. https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000400009

Franzin, F. M., y Sircili, M. P. (2015). Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorragic Escherichia coli subjected to a complex network of gene regulation. *Biomed Res Int*, *2015*, 534738. https://doi.org/10.1155/2015/534738

Gallegos, M. T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., & Ramos, J. L. (1997). Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev*, *61*(4), 393-410. https://doi.org/10.1128/mmbr.61.4.393-410.1997

Garcia-Garcia, J., Valls-Comamala, V., Guney, E., Andreu, D., Muñoz, F. J., Fernandez-Fuentes, N., y Oliva, B. (2017). iFrag: A Protein-Protein Interface Prediction Server Based on Sequence Fragments. *J Mol Biol*, *429*(3), 382-389. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.11.034

Gaytán, M. O., Martínez-Santos, V. I., Soto, E., y González-Pedrajo, B. (2016). Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*, *6*, 129. https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00129

Gomes, T. A., Blake, P. A., y Trabulsi, L. R. (1989). Prevalence of Escherichia coli strains with localized, diffuse, and aggregative adherence to HeLa cells in infants with diarrhea and matched controls. *J Clin Microbiol*, *27*(2), 266-269. https://doi.org/10.1128/jcm.27.2.266-269.1989

González, Lara, Fabiola. (2019). *Búsqueda de proteína(s) que interactúen con el activador PerA de Escherichia coli enteropatóge na* Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.]. Internet.

Gómez-Duarte, O. G., y Kaper, J. B. (1995). A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal eaeA expression in enteropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun*, *63*(5), 1767-1776. https://doi.org/10.1128/iai.63.5.1767-1776.1995

Hennessey, C., Keogh, C. E., Barboza, M., Brust-Mascher, I., Knotts, T. A., Sladek, J. A.,…Gareau, M. G. (2021). Neonatal Enteropathogenic Escherichia coli Infection Disrupts Microbiota-Gut-Brain Axis Signaling. *Infect Immun*, *89*(9), e0005921. https://doi.org/10.1128/IAI.00059-21

Hill, M. J., y Drasar, B. S. (1975). The normal colonic bacterial flora. *Gut*, *16*(4), 318-323. https://doi.org/10.1136/gut.16.4.318

Ibarra, J. A., García-Zacarias, C. M., Lara-Ochoa, C., Carabarin-Lima, A., Tecpanecatl-Xihuitl, J. S., Perez-Rueda, E.,…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., & 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. *J Bacteriol*, *185*(9), 2835-2847. https://doi.org/10.1128/JB.185.9.2835-2847.2003

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O.,…Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, *596*(7873), 583-589. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nat Rev Microbiol*, *2*(2), 123-140. https://doi.org/10.1038/nrmicro818

Lanata, C. F., Fischer-Walker, C. L., Olascoaga, A. C., Torres, C. X., Aryee, M. J., Black, R. E., y UNICEF, C. H. E. R. G. o. t. W. H. O. a. (2013). Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One*, *8*(9), e72788. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072788

Lara-Ochoa, C., González-Lara, F., Romero-González, L. E., Jaramillo-Rodríguez, J. B., Vázquez-Arellano, S. I., Medrano-López, A.,…Ibarra, J. A. (2021). The transcriptional activator of the bfp operon in EPEC (PerA) interacts with the RNA polymerase alpha subunit. *Sci Rep*, *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. *Front Microbiol*, *14*, 1063368. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1063368

Lim, M. A., Kim, J. Y., Acharya, D., Bajgain, B. B., Park, J. H., Yoo, S. J., y Lee, K. (2020). A Diarrhoeagenic. *Int J Environ Res Public Health*, *17*(9). https://doi.org/10.3390/ijerph17093149

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. *Mol Microbiol*, *33*(1), 153-166. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01460.x

Molina, N. B., Oderiz, S., López, M. A., Basualdo, J., y Sparo, M. D. (2024). [Molecular characterization of diarrheagenic Escherichia coli from an outpatient pediatric population with diarrhea attended in two hospitals from Buenos Aires, Argentina]. *Rev Argent Microbiol*, *56*(1), 8-15. https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.06.002

Molina, N. B., Oderiz, S., Vescina, C., Córdoba, A., Basualdo, J., y Sparo, M. D. (2022). [First report of diarrheagenic Escherichia coli in pediatric outpatient population with diarrhea in La Plata, Argentina]. *Rev Argent Microbiol*, *54*(1), 15-21. https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.02.006

Murakami, K. S., Masuda, S., y Darst, S. A. (2003). Crystallographic analysis of Thermus aquaticus RNA polymerase holoenzyme and a holoenzyme/promoter DNA complex. *Methods Enzymol*, *370*, 42-53. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(03)70004-4

Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic Escherichia coli. *Clin Microbiol Rev*, *11*(1), 142-201. https://doi.org/10.1128/CMR.11.1.142

Nègre, D., Cortay, J. C., Galinier, A., Sauve, P., y Cozzone, A. J. (1992). Specific interactions between the IclR repressor of the acetate operon of Escherichia coli and its operator. *J Mol Biol*, *228*(1), 23-29. https://doi.org/10.1016/0022-2836(92)90488-6

Ochoa, T. J., y Contreras, C. A. (2011). Enteropathogenic escherichia coli infection in children. *Curr Opin Infect Dis*, *24*(5), 478-483. https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32834a8b8b

Paitan, Y. (2018). Current Trends in Antimicrobial Resistance of Escherichia coli. *Curr Top Microbiol Immunol*, *416*, 181-211. https://doi.org/10.1007/82_2018_110

Porter, M. E., Mitchell, P., Roe, A. J., Free, A., Smith, D. G., y Gally, D. L. (2004). Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, PerA from enteropathogenic Escherichia coli. *Mol Microbiol*, *54*(4), 1117-1133. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04333.x

Puente, J. L., Bieber, D., Ramer, S. W., Murray, W., & Schoolnik, G. K. (1996). The bundle-forming pili of enteropathogenic Escherichia coli: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol*, *20*(1), 87-100. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02491.x

Rendón, M. A., Saldaña, Z., Erdem, A. L., Monteiro-Neto, V., Vázquez, A., Kaper, J. B.,…Girón, J. A. (2007). Commensal and pathogenic Escherichia coli use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *104*(25), 10637-10642. https://doi.org/10.1073/pnas.0704104104

Rodriguez-Valverde, D., Giron, J. A., Hu, Y., Nataro, J. P., Ruiz-Perez, F., y Santiago, A. E. (2023). Highly-conserved regulatory activity of the ANR family in the virulence of diarrheagenic bacteria through interaction with master and global regulators. *Sci Rep*, *13*(1), 7024. https://doi.org/10.1038/s41598-023-33997-0

Saldaña, Z., Erdem, A. L., Schüller, S., Okeke, I. N., Lucas, M., Sivananthan, A.,…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. *J Bacteriol*, *191*(11), 3451-3461. https://doi.org/10.1128/JB.01539-08

Sambrook, J., y Russell, D. W. (2001). *Clonación molecular: Cap. 8. Amplificación in vitro del ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa* (P. d. l. d. C. S. Harbor, Ed. Vol. 2)

Santiago, A. E., Ruiz-Perez, F., Jo, N. Y., Vijayakumar, V., Gong, M. Q., y Nataro, J. P. (2014). A large family of antivirulence regulators modulates the effects of transcriptional activators in Gram-negative pathogenic bacteria. *PLoS Pathog*, *10*(5), e1004153. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004153

Santiago, A. E., Yan, M. B., Hazen, T. H., Sauder, B., Meza-Segura, M., Rasko, D. A.,…Nataro, J. P. (2017). The AraC Negative Regulator family modulates the activity of histone-like proteins in pathogenic bacteria. *PLoS Pathog*, *13*(8), e1006545. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006545

Shin, S., Castanie-Cornet, M. P., Foster, J. W., Crawford, J. A., Brinkley, C., y Kaper, J. B. (2001). An activator of glutamate decarboxylase genes regulates the expression of enteropathogenic Escherichia coli virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator, Per. *Mol Microbiol*, *41*(5), 1133-1150. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02570.x

Sohel, I., Puente, J. L., Ramer, S. W., Bieber, D., Wu, C. Y., y Schoolnik, G. K. (1996). Enteropathogenic Escherichia coli: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J Bacteriol*, *178*(9), 2613-2628. https://doi.org/10.1128/jb.178.9.2613-2628.1996

Sridharan, S., Howard, N., Kerbarh, O., Błaszczyk, M., Abell, C., y Blundell, T. L. (2010). Crystal structure of Escherichia coli enterobactin-specific isochorismate synthase (EntC) bound to its reaction product isochorismate: implications for the enzyme mechanism and differential activity of chorismate-utilizing enzymes. *J Mol Biol*, *397*(1), 290-300. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.01.019

Stone, K. D., Zhang, H. Z., Carlson, L. K., y Donnenberg, M. S. (1996). A cluster of fourteen genes from enteropathogenic Escherichia coli is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Mol Microbiol*, *20*(2), 325-337. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1996.tb02620.x

Torres, A. G. (2017). [Not Available]. *J Pediatr (Rio J)*, *93*(6), 548-550. https://doi.org/10.1016/j.jped.2017.05.002

Trabulsi, L. R., Keller, R., y Tardelli Gomes, T. A. (2002). Typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli. *Emerg Infect Dis*, *8*(5), 508-513. https://doi.org/10.3201/eid0805.010385

Ugalde-Silva, P., Gonzalez-Lugo, O., & Navarro-Garcia, F. (2016). Tight Junction Disruption Induced by Type 3 Secretion System Effectors Injected by Enteropathogenic and Enterohemorrhagic Escherichia coli. *Front Cell Infect Microbiol*, *6*, 87. https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00087

Varadi, M., Anyango, S., Deshpande, M., Nair, S., Natassia, C., Yordanova, G.,…Velankar, S. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Res*, *50*(D1), D439-D444. https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061

Vidal, J. E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., & Navarro-García, F. (2007). [Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic Escherichia coli]. *Salud Publica Mex*, *49*(5), 376-386. https://doi.org/10.1590/s0036-36342007000500008

Weng, G., Wang, E., Wang, Z., Liu, H., Zhu, F., Li, D., y Hou, T. (2019). HawkDock: a web server to predict and analyze the protein-protein complex based on computational docking and MM/GBSA. *Nucleic Acids Res*, *47*(W1), W322-W330. https://doi.org/10.1093/nar/gkz397

WHO. (2018). Diarrheal diseases. In. https://data.unicef.org/topic/childhealth/diarrhoeal-disease/.

Williamson, H. S., y Free, A. (2005). A truncated H-NS-like protein from enteropathogenic Escherichia coli acts as an H-NS antagonist. *Mol Microbiol*, *55*(3), 808-827. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04421.x

Yamamoto, K., y Ishihama, A. (2003). Two different modes of transcription repression of the Escherichia coli acetate operon by IclR. *Mol Microbiol*, *47*(1), 183-194. https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03287.x

Young, J. C., Clements, A., Lang, A. E., Garnett, J. A., Munera, D., Arbeloa, A.,…Frankel, G. (2014). The Escherichia coli effector EspJ blocks Src kinase activity via amidation and ADP ribosylation. *Nat Commun*, *5*, 5887. https://doi.org/10.1038/ncomms6887

Yugandhar, K., y Gromiha, M. M. (2014). Feature selection and classification of protein-protein complexes based on their binding affinities using machine learning approaches. *Proteins*, *82*(9), 2088-2096. https://doi.org/10.1002/prot.24564

zhou, Y., Huang, H., Zhou, P., y Xie, J. (2012). Molecular mechanisms underlying the function diversity of transcriptional factor IclR family. *Cell Signal*, *24*(6), 1270-1275. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2012.02.008

12. ANEXOS

Tabla 8. Oligonucleótidos diseñados para ClpX			
EP-CLPXF	cactcgagcatgacagataaacgcaa	Amplifica la región de *clpX,* usados para clonar en pBAD, se agregan los sitios de restricción *Xho*I en el Fw y *Hind*III en Rv.	Este trabajo
EP-CLPXR	ttgtccgtagaccacttttcgaaa		

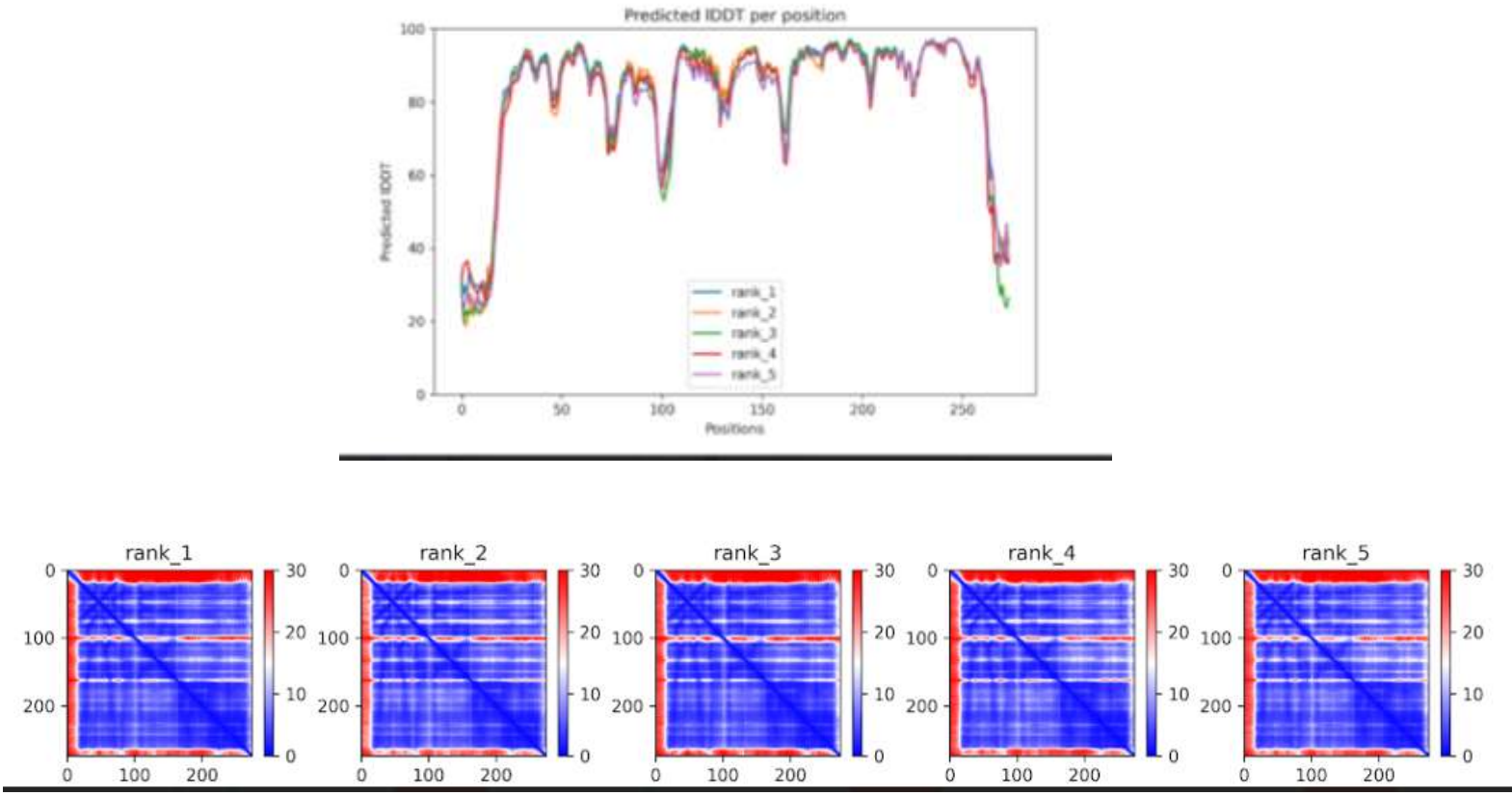
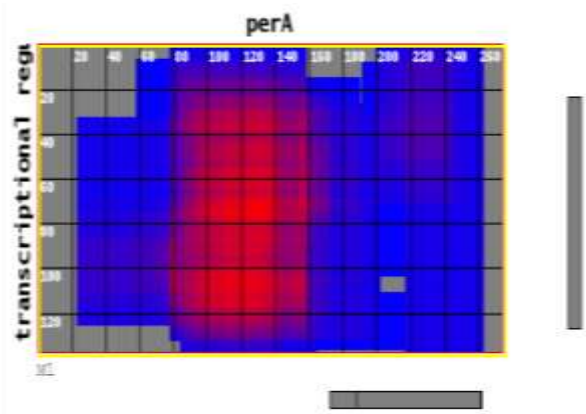
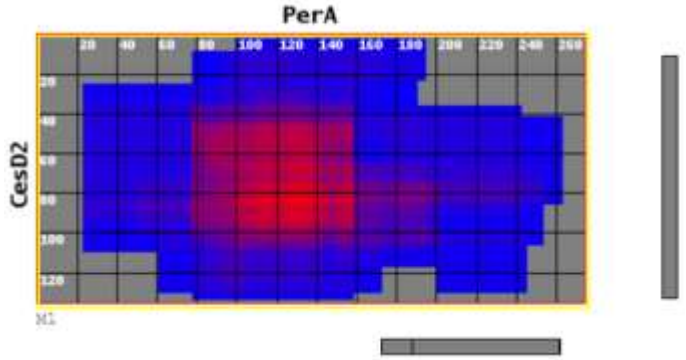
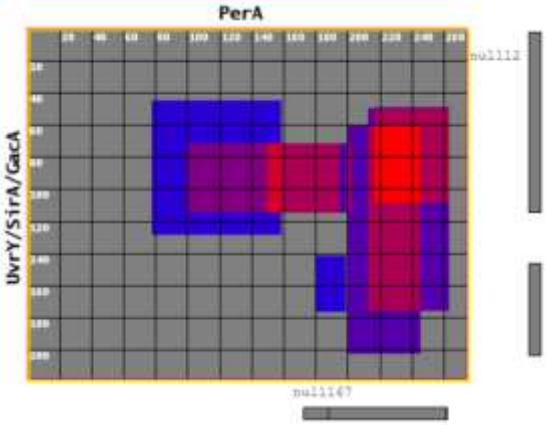


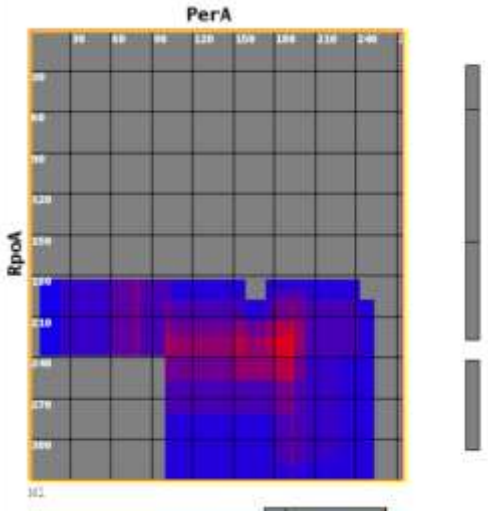
Figura 14. Mapas y gráficos de predicción de modelo

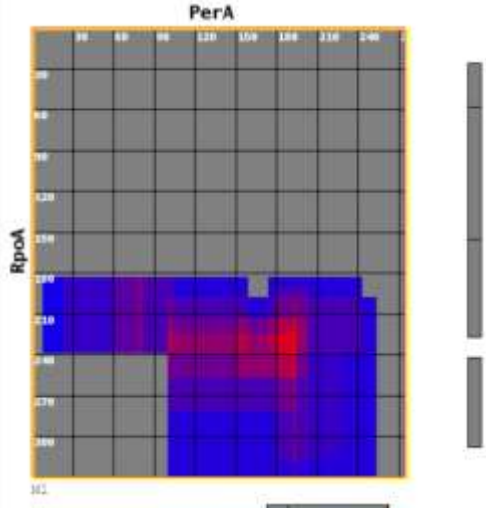
Gráfica del test para la predicción confiable de diferencias en las distancias Cα (IDDT-Cα) y Graficas de la predicción de corrección de posición y distancias de los aminoácidos de los mejores modelos predichos por AlphaFold2 para elegir el mejor modelo.

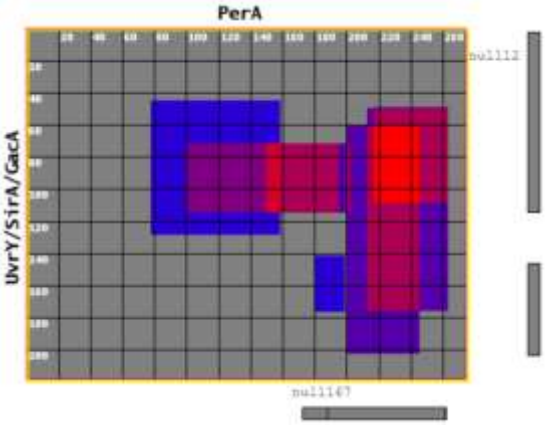

perA
transcriptional regu

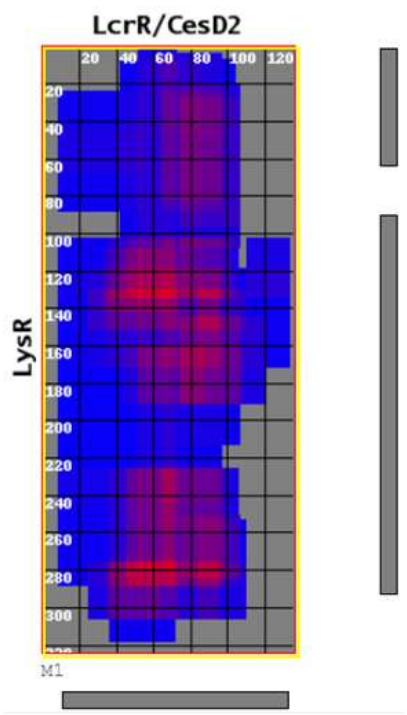

PerA
CesD2

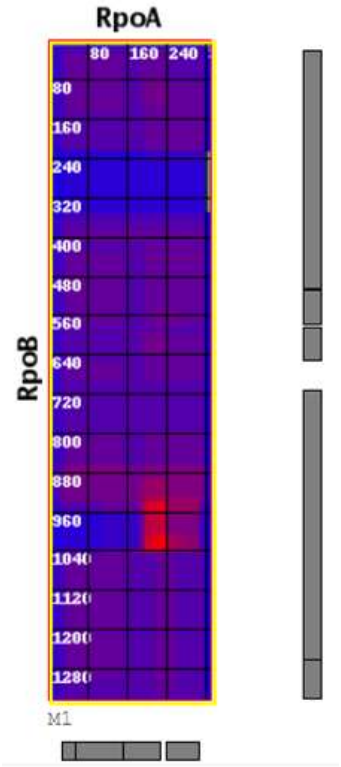

PerA
UvrY/SirA/GacA


PerA
RpoA


PerA
RpoA


PerA
UvrY/SirA/GacA


LcrR/CesD2
LysR
M1


RpoA
RpoB
M1

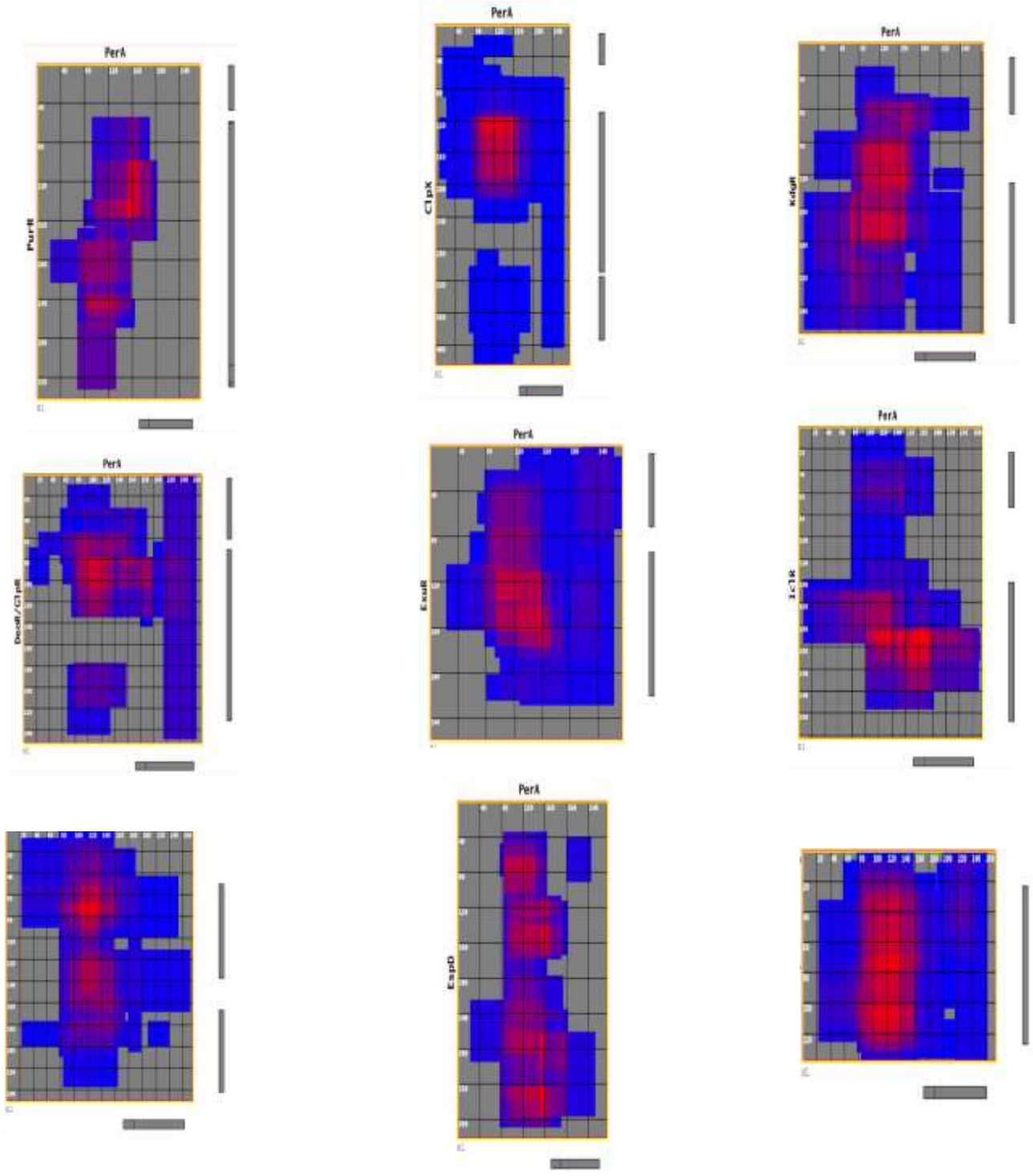


Figura 15. Mapas de contacto de otras proteínas con el regulador PerA.
En color azul muestran una puntuación baja de interacción y los de color gris una nula interacción. Adicionalmente, se muestran los dominios proteicos generados automáticamente por PFAM. Imagen generada en: “iFrag” (http://sbi.imim.es/iFrag/).

Figura16. Modelos de acoplamiento molecular de ClpX y PurR con PerA.
Modelado de las proteínas ClpX y PurR predichos y modelados con ALPHAFOLD2 en su forma oligomérica, visualizado y modificado en PyMOL La figura se generó utilizando Pymol (The PyMOL Molecular Graphics System, versión 2.0 Schrödinger, LLC).

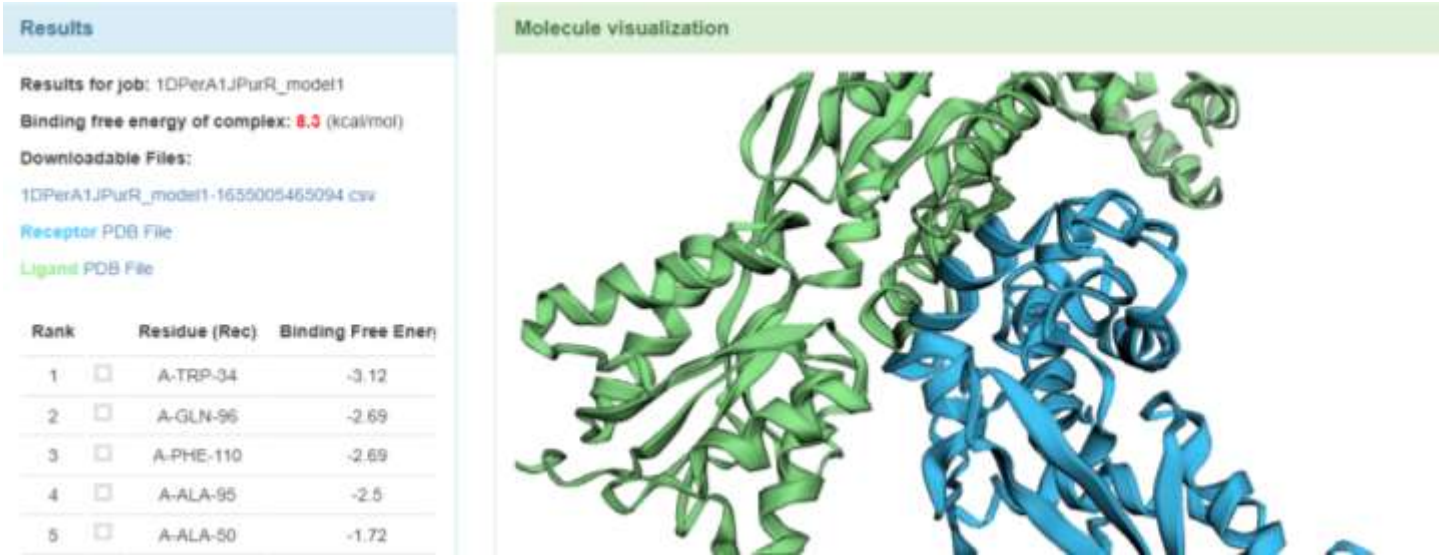


Figura 17. Predicción de energía libre de enlace del complejo PurR-PerA.

Predicción de la energía libre de unión del complejo formado por PurR y PerA mostrando los 5 principales residuos de contacto del complejo.

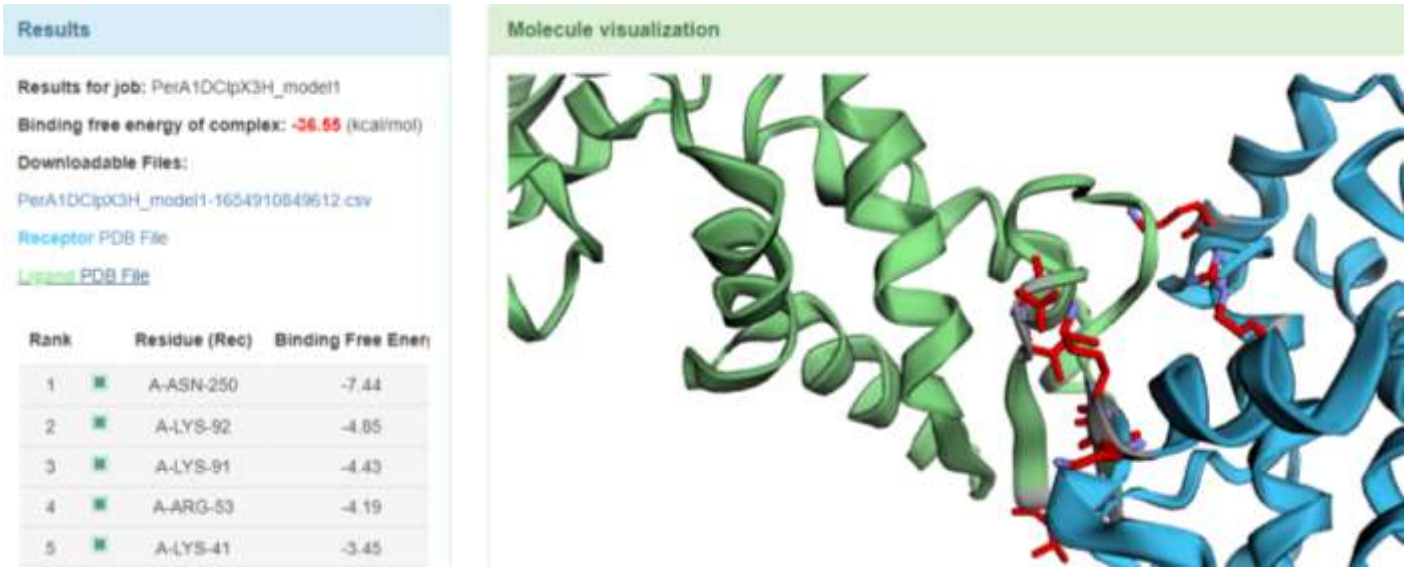


Figura 10. Predicción de energía libre de enlace del complejo ClpX-PerA.

Predicción de la energía libre de unión del complejo formado por ClpX y PerA mostrando los 5 principales residuos de contacto del complejo proteico.

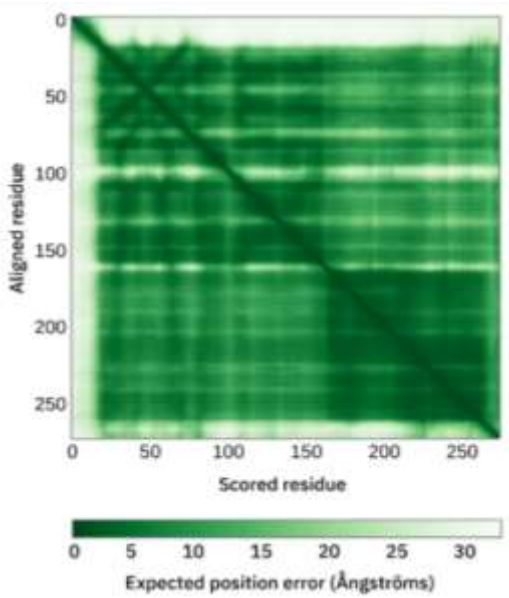


Figura 19. Mapa de error de alineación previsto

Comparación del error en la predicción de pares de residuos entre la estructura y los residuos predichos (Jumper *et al*., 2021).

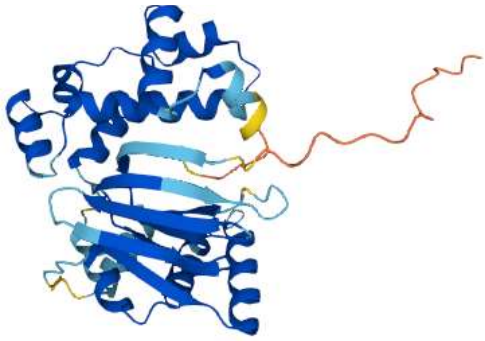


Figura 20. Predicción del modelo de la estructura PerA utilizando Colab fold/Alpha fold 2.

Modelo generado con AlphaFold2 para generar un modelo de interacción con la proteína IclR. Con el número de entrada a UniProt: P43459 · PERA_ECO27.