



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

**Facultad de Medicina
Licenciatura en Biomedicina**

Efecto de un miembro de la familia ANR sobre la expresión de genes de virulencia regulados por PerA en *E. coli* enteropatógena

Para obtener el título de:
Licenciado en Biomedicina

Presenta:
Juan Bernardo Jaramillo Rodríguez

Director experto:
M.C. Cristina Lara Ochoa

Co-Director:
D.C. Ygnacio Martínez Laguna

Puebla, Pue. Noviembre del 2019



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina
Licenciatura en Biomedicina

Efecto de un miembro de la familia ANR sobre la expresión de genes de virulencia regulados por PerA en *E. coli* enteropatógena

Para obtener el título de:
Licenciado en Biomedicina

Juan Bernardo Jaramillo Rodríguez

Director experto:

M.C. Cristina Lara Ochoa

Co-Director:

Dr. Ygnacio Martínez Laguna

Puebla, Pue. 2019



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA.
FACULTAD DE MEDICINA.
COORDINACIÓN DE TITULACIÓN Y EFICIENCIA TERMINAL DE PREGRADO
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

FORMATO "A" DE REGISTRO Y AUTORIZACIÓN DE PROTOCOLO DE INVESTIGACION

No. de Folio de Registro: 034/2019

DATOS DEL SOLICITANTE.

Nombre Completo: **Juan Bernardo Jaramillo Rodríguez**

Matricula: 201315446

Correo Electrónico: **jaramillojua@gmail.com**

Firma: _____

NOMBRE DEL TEMA:

Efecto de un miembro de la familia ANR sobre la expresión de genes de virulencia regulados por PerA en *E. coli* enteropatógena.

JUSTIFICACIÓN:

EPEC es uno de los principales agentes etiológicos de diarrea que afecta a niños en países en vías de desarrollo. La regulación de la expresión de sus genes de virulencia es un proceso esencial para el desarrollo de la patogenicidad porque asegura la colonización exitosa en el hospedero.

PerA es una proteína fundamental durante la etapa inicial de la infección por este patógeno porque promueve su propia expresión y la de la fimbria BFP. A su vez, PerA tiene un efecto indirecto positivo sobre la expresión de los genes de virulencia codificados en la isla LEE. El mecanismo que utiliza para activar la transcripción de sus genes blanco es poco conocido, pero se ha identificado que se une a una secuencia consenso de 29 pb rica en AT río arriba de los promotores que regula. Además, estudios preliminares sugieren que interactúa con las subunidades alfa y sigma de la ARN polimerasa para activar la transcripción de sus genes blanco, aunque el modelo todavía está en proceso de análisis.

Por otro lado, la identificación de una nueva familia de proteínas anti-AraC/XylS (ANR) ha llevado a conocer cómo es contrarrestada la activación ejercida por algunos miembros AraC/XylS. En este sentido, la presencia de un miembro de ANR en EPEC y el estudio de su función permitirá obtener una mayor comprensión acerca de los mecanismos que esta bacteria emplea para modular la expresión de sus genes de virulencia. El estudio del efecto de un regulador negativo que contrarreste la función de una proteína activadora de la familia AraC/XylS podrá esclarecer su asociación con la virulencia.

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar el efecto del *orfRS14140* sobre la expresión de los genes regulados por el activador transcripcional PerA en *E. coli* enteropatógena.

TIPO DE ESTUDIO: Exploratorio

INSTITUCIÓN EN LA QUE SE REALIZARÁ EL ESTUDIO: Centro de Detección Biomolecular

DIRECTOR EXPERTO:

Nombre: **M.C. Cristina Lara Ochoa**

NIP.BUAP: 100518232

Especialidad: **Biología molecular y regulación en bacterias** Correo Electrónico: **clara_ochoa@hotmail.com**

Firma de aceptación: _____

CO-DIRECTOR:

Nombre: **Dr. Ygnacio Martínez Laguna**

NIP.BUAP: 100101933

Especialidad: **Biología molecular y regulación en bacterias** Correo Electrónico: **igmatine@gmail.com**

Firma de aceptación: _____

Fecha Y Firma de Autorización: _____

COORDINADORA DE TITULACION Y E.T

MASS IRMA ORTEGA SANCHEZ



BUAP

Oficio No SIEP / C.I. / 240 /2019

Asunto: Constancia de Registro

M.C. CRISTINA LARA OCHOA
DR. YGNACIO MARTÍNEZ LAGUNA
JUAN BERNARDO JARAMILLO RODRÍGUEZ

PRESENTES:

El Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la B.U.A.P., a través de la Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado hace **CONSTAR** que el Proyecto de Investigación presentado en autoría Colectiva por:

- JUAN BERNARDO JARAMILLO RODRÍGUEZ
- M.C. CRISTINA LARA OCHOA
- DR. YGNACIO MARTÍNEZ LAGUNA

Titulado:

"Efecto de un miembro de la familia ANR sobre la expresión de los genes de virulencia regulados por PerA en Escherichia coli enteropatógena"

Ha sido registrado en esta Secretaría con los siguientes datos:

Fecha de registro: 24 de mayo de 2019.

Número de Libro: 2

Número de Hoja: 99

Número de Registro: 721

Vigencia:

Inicio 24 de mayo 2019

Termino 30 de agosto de 2019

ATENTAMENTE

"PENSAR BIEN, PARA VIVIR MEJOR"

H. PUEBLA DE Z., A 24 DE MAYO DE 2019.

M.C. JOSE LUIS GANDARA RAMIREZ
PRESIDENTE DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN



D.C. JORGE ALEJANDRO CEREDA



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA.
FACULTAD DE MEDICINA.
COORDINACIÓN DE EFICIENCIA TERMINAL EN PREGRADO

FORMATO "C" DE AUTORIZACIÓN DE TESIS.
LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

DATOS DEL SOLICITANTE.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia: Mis padres Mireya y Bernardo por apoyarme siempre, procurar que nada me falte e impulsarme siempre a salir adelante. Este trabajo es gracias a ustedes, no podría haberlo hecho sin su apoyo, es un logro que se los debo y que tal vez un poco tarde, pero es el fruto de mucho esfuerzo y no solo de los últimos años, sino de toda una vida. De alguna forma supieron darme la mejor educación desde niño para que por inercia pueda ir poco a poco ir hacia adelante y en el futuro próximo ser independiente. Me han enseñado que la vida no es fácil y cuesta, a valorar lo poco o mucho que se tiene, aprender a ganarlo, a siempre salir adelante... Son las mejores enseñanzas que un hijo puede pedir. A pesar de los problemas y adversidades hemos sabido salir adelante como familia y espero que así siga siendo. Se han esforzado muchísimo para que y pueda llegar a esta etapa de mi vida. Les debo todo. También a mi hermano por ser más que un hermano mi amigo y compartir muchos momentos chidos que me ayudan a sobrellevar lo complicado que pueden ser las cosas. Gracias por todo, por creer en mí, por estar siempre los quiero mucho.

A mis tíos por siempre preocuparse por mí y estar al pendiente. De manera especial a mi tía Viky, mi tío Marcos que sin ninguna obligación siempre me han apoyado, a mi tía Estela y Genaro que han sido un ejemplo para seguir el camino de la ciencia, a Gaby un ejemplo de que se puede llegar muy lejos. La lista es muy grande, a mis abuelos y los que ya no están conmigo pero de alguna forma viven en los recuerdos y enseñanzas.

A mis amigos y compañeros: Ares, Armando (beuty), Ollin y Gerardo (Mop) por compartir conmigo gran parte de la carrera y ayudarme a soportarla cuando se ponía fea o aburrida. Han estado desde el principio, no se en que momento comenzamos a hablarnos y ser amigos, pero agradezco a las fuerzas del azar que me haya tocado en el mismo grupo que ustedes (no me imagino en el otro). Estos últimos 6 años no hubieran sido los mismos sin ustedes :')

Mis amigos y compañeros del laboratorio, Ivan, Karen, Karla, Ivanzote, Fredy, Amin, Abraham y los que ya se fueron, gracias por hacer que el día en el laboratorio sea muy ameno y divertido, mas que mis compañeros son como una segunda familia, y aunque no con todos puede convivir mucho tiempo cada que regreso, no me siento ajeno a todos. En especial agradezco que no solo nos llevemos bien en el ambiente laboral, que podamos salir a divertirnos, viajar, ir a comer, beber una cervecita... Siempre pueden contar conmigo.

A la Dra Lili Cedillo por apoyarnos siempre en el lab, no desampararnos y comprendernos en nuestros momentos de "recreo" a la hora de la comida jeje.

A mi tutora: Gracias Mtra Cris por aceptarme como su alumno y darme la oportunidad de aprender muchísimas cosas que en cualquier otro lugar no lo hubiera hecho. Con toda seguridad puedo decir que tuve la suerte de que uno de los mejores miembros de la academia de Biomedicina asesorara mi tesis, no importa lo que digan algunos, son unos envidiosos, gracias por confiarme este proyecto con el que adquirí mucha experiencia que me va a servir toda mi trayectoria académica, le voy a estar eternamente agradecido. A pesar de que muchas veces tenía problemas técnicos o salían cosas raras, siempre creyó en mí y tuvo mucha paciencia para ayudarme a resolver esas adversidades. Eso es algo que debo tomar mucho en cuenta, muy pocos son los tutores que en verdad le prestan atención a sus alumnos y trabajan directamente con ellos, es una gran virtud y siempre valoré eso. Gracias por sus consejos, sus enseñanzas, su paciencia, por promover el mejor ambiente que uno puede tener en un laboratorio, gracias a usted somos como una familia, (con una que otra oveja negra, pero esas las hay en todas partes jeje) que incluso nos abrió las puertas de su casa eso es algo muy bonito. En un futuro espero seguir de una u otra forma seguir colaborando con usted, le tengo un gran aprecio y respeto. Este proyecto lo inició usted sin terceros, me da mucho gusto que continúe y en el futuro cercano se pueda publicar. Mis mejores deseos y mucho éxito en lo que le depare el futuro.

A mi comité revisor: a la Dra Baca y la Dra Claudia por interesarse en mi trabajo desde que lo presenté por primera vez, enserio lo aprecio mucho, por tomarse su tiempo en revisarlo y darme sus valiosas sugerencias y consejos. Muchas gracias.

CONTENIDO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE TABLAS	v
RESUMEN	vi
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>E. coli</i> enteropatógena	3
1.1.1 Mecanismo de patogenicidad de EPEC.....	4
2. ANTECEDENTES	8
2.1 Antecedentes generales	8
2.2 Antecedentes específicos	10
3. JUSTIFICACIÓN	18
4. HIPÓTESIS CIENTÍFICA	18
5. OBJETIVOS	19
5.1 Objetivo general	19
5.2 Objetivos particulares.....	19
6. MATERIALES Y MÉTODOS	20
6.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento	20
6.2 Manipulaciones de ADN.....	21
6.3 PCR punto final	21
6.4 Electroforesis en gel de agarosa para la separación de ADN	22
6.5 Construcción y caracterización de pANREP	22
6.6 Extracción y purificación de ADN	25
6.6.1 Extracción de ADNg y plásmido por kit.....	25
6.6.2 Extracción de plásmido por lisis alcalina.....	26
6.6.3 Purificación de producto de PCR	26
6.6.4 Purificación de ADN a partir de gel de agarosa	27
6.7 Generación de células químicamente competentes.....	27
6.8 Transformación por choque térmico.....	27

6.9. Western blot.....	28
6.10 Perfil de proteínas secretadas.....	29
6.11 SDS-PAGE.....	29
6.12 Extracción de ARN.....	29
6.13 RT-PCR punto final y cuantitativa	30
6.14 Análisis bioinformáticos.....	32
6.15 Estadística.....	32
7. RESULTADOS	33
7.1 Análisis bioinformático del <i>orfRS14140</i>	33
7.1.1 Organización y ubicación del <i>orfRS14140</i> en el cromosoma de EPEC.....	33
7.1.2 Búsqueda de posibles promotores del <i>orfRS14140</i>	33
7.1.3 Predicción de estructura secundaria y terciaria de RS14140.	36
7.1.4 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de RS14140 con miembros de la familia ANR	37
7.2 Expresión del <i>orfRS14140</i> en EPEC WT bajo diferentes condiciones de crecimiento.....	39
7.3 Efecto de la sobreexpresión de RS14140 sobre las proteínas de virulencia de EPEC	41
7.5 Efecto de RS14140 sobre la expresión de genes regulados por PerA.	45
8. DISCUSIÓN.	47
9. CONCLUSIONES.....	56
10. PERSPECTIVAS.....	56
11. BIBLIOGRAFÍA.	58
12. ANEXOS.	22

AGRADECIMIENTOS

A mi familia: Mis padres Mireya y Bernardo por apoyarme siempre, procurar que nada me falte e impulsarme siempre a salir adelante. Este trabajo es gracias a ustedes, no podría haberlo hecho sin su apoyo, es un logro que se los debo y que tal vez un poco tarde, pero es el fruto de mucho esfuerzo y no solo de los últimos años, sino de toda una vida. De alguna forma supieron darme la mejor educación desde niño para que por inercia pueda ir poco a poco ir hacia adelante y en el futuro próximo ser independiente. Me han enseñado que la vida no es fácil y cuesta, a valorar lo poco o mucho que se tiene, aprender a ganarlo, a siempre salir adelante... son las mejores enseñanzas que un hijo puede pedir. A pesar de los problemas y adversidades hemos sabido salir adelante como familia y espero que así siga siendo. Se han esforzado muchísimo para que y pueda llegar a esta etapa de mi vida. Les debo todo. También a mi hermano por ser más que un hermano mi amigo y compartir muchos momentos chidos que me ayudan a sobrellevar lo complicado que pueden ser las cosas. Gracias por todo, por creer en mí, por estar siempre los quiero mucho. A mis tíos por siempre preocuparse por mí y estar pendiente. De manera especial a mi tía Viky, mi tío Marcos que sin ninguna obligación siempre me han apoyado, a mi tía Estela y Genaro que han sido un ejemplo para seguir el camino de la ciencia, a Gaby un ejemplo de que se puede llegar muy lejos. La lista es muy grande, a mis abuelos y los que ya no están conmigo pero de alguna forma viven en los recuerdos y enseñanzas.

A mis amigos y compañeros: Ares, Armando (beuty), Ollin y Gerardo (Mop) por compartir conmigo gran parte de la carrera y ayudarme a soportarla cuando se ponía fea o aburrida. Han estado desde el principio, no se en que momento comenzamos a hablarnos y ser amigos, pero agradezco a las fuerzas del azar que me haya tocado en el mismo grupo que ustedes (no me imagino en el otro). Estos últimos 6 años no hubieran sido los mismos sin ustedes :) Mis amigos y compañeros del laboratorio, Ivan, Karen, Karla, Ivanzote, Fredy, Amin, Abraham y los que ya se fueron, gracias por hacer que el día en el laboratorio sea muy ameno y divertido, mas que mis compañeros son como una segunda familia, y aunque no con todos puede convivir mucho tiempo cada que regreso, no me siento ajeno a todos. En especial agradezco que no solo nos llevemos bien en el ambiente laboral, que podamos salir a divertirnos, viajar, ir a comer, beber una cervecita... Siempre pueden contar conmigo.

A la Dra Lili Cedillo por apoyarnos siempre en el lab, no desampararnos y comprendernos en nuestros momentos de "recreo" a la hora de la comida jeje.

A mi tutora: Gracias Mtra Cris por aceptarme como su alumno y darme la oportunidad de aprender muchísimas cosas que en cualquier otro lugar no lo hubiera hecho. Con toda seguridad puedo decir que tuve la suerte de que uno de los mejores miembros de la academia de Biomedicina asesorara mi tesis, no importa lo que digan algunos, son unos envidiosos, gracias por confiarme este proyecto con el que adquirí mucha experiencia que me va a servir toda mi trayectoria académica, le voy a estar eternamente agradecido. A pesar de que muchas veces tenía problemas técnicos o salían cosas raras, siempre creyó en mí y tuvo mucha paciencia para ayudarme a resolver esas adversidades. Eso es algo que debo tomar mucho en cuenta, muy pocos son los tutores que en verdad le prestan atención a sus alumnos y trabajan directamente con ellos, es una gran virtud y siempre valoré eso. Gracias por sus consejos, sus enseñanzas, su paciencia, por promover el mejor ambiente que uno puede tener en un laboratorio, gracias a usted somos como una familia, (con una que otra oveja negra, pero esas las hay en todas partes jeje) que incluso nos abrió las puertas de su casa eso es algo muy bonito. En un futuro espero seguir de una u otra forma seguir colaborando con usted, le tengo un gran aprecio y respeto. Este proyecto lo inició usted sin terceros, me da mucho gusto que continúe y en el futuro cercano se pueda publicar. Mis mejores deseos y mucho éxito en lo que le depara el futuro.

A mi comité revisor: a la Dra Baca y la Dra Claudia por interesarse en mi trabajo desde que lo presenté por primera vez, enserio lo aprecio mucho, por tomarse su tiempo en revisarlo y darme sus valiosas

LISTA DE ABREVIATURAS

A/E: Adherencia y destrucción (siglas en inglés)
AAF: Fimbria de adherencia agregativa (siglas en inglés)
Aar: Regulador activado por AggR (siglas en inglés)
ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNg: ADN genómico
AL: Adherencia Localizada
ANR: Regulador negativo de la familia AraC (siglas en inglés)
ARN: Ácido ribonucleico
ATPasa: Adenosina trifosfatasa
BFP: Pili formador de mechones (siglas en inglés)
CFA: Factor de colonización antígeno (siglas en inglés)
DAF: Factor de aceleración de deterioro (siglas en inglés)
DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco (siglas en inglés)
DO₆₀₀: Densidad Óptica a 600 nanómetros
EAF: Factor de adherencia de EPEC (siglas en inglés)
EAST1: Toxina termo-estable 1 de EAEC (siglas en inglés)
ECP: Pili común de *E. coli* (siglas en inglés)
Esc: Componente de secreción de *E. coli* (siglas en inglés)
Esp: Proteínas secretadas por *E. coli* (siglas en inglés)
GrIA: Regulador global de *LEE*-activador (siglas en inglés)
GrIR: Regulador global de *LEE*-represor (siglas en inglés)
HTH: Hélice-vuelta-Hélice (siglas en inglés)
kDa: kiloDalton
kpb: kilopares de bases
LEE: Locus de borrado y destrucción del enterocito (siglas en inglés)
Ler: Regulador codificado en *LEE* (siglas en inglés)
LT: Toxina termo-lábil (siglas en inglés)
Map: Proteína asociada a la mitocondria (siglas en inglés)
mg: miligramos
ml: mililitros
mM: milimolar
Nle: No codificado en *LEE* (siglas en inglés)
NTC: Control no templado (siglas en inglés)
ORF: marco de lectura abierta (siglas en inglés)
pAA: plásmido de adherencia agregativa (siglas en inglés)
pb: pares de bases
PBST: Buffer salino de fosfatos-Tween
PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés)
per: Regulador codificado en plásmido (siglas en inglés)

pMol: Picomolar
PVDF: Floruro de polivinilideno
rpm: revoluciones por minuto
RT-PCR: Transcripción reversa- PCR punto final
RT-qPCR: Transcripción reversa-PCR cuantitativa (siglas en inglés)
SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SEP: Proteínas de Secreción de *E. coli* (siglas en inglés)
ShET1: Enterotoxina 1 de *Shigella* 1 (siglas en inglés)
SSTIII: Sistema de secreción tipo III
ST: Toxina termo-estable (siglas en inglés)
STEC: *E. coli* productora de toxina shiga (siglas en inglés)
Stx: Toxina Shiga (siglas en inglés)
TA: Temperatura Ambiente
Tir: Receptor de la Intimina translocado (siglas en inglés)
Tm: Temperatura de alineamiento (siglas en inglés)
TRIS: Tris(hidroximetil) aminometano
WT: Cepa silvestre (siglas en inglés)
μl: microlitros
°C: grados centígrados

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Patotipos diarreogénicos de <i>E. coli</i> y su mecanismo de patogenicidad.	2
Figura 2. Principales determinantes genéticos requeridos para los fenotipos de Adherencia localizada y la lesión A/E en EPEC.	4
Figura 3. Modelo de patogénesis de EPEC.	5
Figura 4. Esquema del SSTIII de EPEC.	6
Figura 5. Esquema general de la regulación de los principales factores de virulencia de EPEC.	13
Figura 6. Esquema general de los miembros de la familia AraC/XylS.	14
Figura 7. Árbol filogenético de homólogos de Aar en patógenos Gram negativos.	16
Figura 8. Esquema de la regulación de genes de virulencia ubicados en el plásmido pAA de EAEC.	17
Figura 9. Ubicación y organización genética del <i>orfRS14140</i> en el genoma de EPEC, <i>Citrobacter rodentium</i> y <i>Salmonella enterica</i> .	35
Figura 10. Esquema de la predicción de promotores del <i>orfRS14140</i> y <i>orfRS14135</i> .	36
Figura 11. Predicción de la estructura secundaria y terciaria de RS14140.	37
Figura 12. Alineamiento entre Aar y RS14140.	38
Figura 13. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de RS14140 con miembros de la familia ANR de enteropatógenos.	38
Figura 14. Expresión del <i>orfRS14140</i> en diferentes condiciones de crecimiento de EPEC WT.	40
Figura 15. Western blot de la expresión de RS14140-6XH en BL21 (DE3).	42
Figura 16. Curva de crecimiento de EPEC WT y EPEC/pANREP.	43
Figura 17. Efecto de RS14140 sobre el perfil de proteínas secretadas de EPEC.	44
Figura 18. Efecto de RS14140 sobre la expresión de BfpA y EspA en EPEC.	44
Figura 19. Efecto de RS14140 sobre la expresión de genes regulados por PerA en EPEC.	46
Figura 20. Modelo de la actividad de RS14140 en el mecanismo de regulación de los genes de virulencia de EPEC.	55

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectores codificados en LEE y su función.	7
Tabla 2. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.	20
Tabla 3. Oligonucleótidos usados en este trabajo.	21
Tabla 4. Condiciones de PCR usadas en este trabajo.....	22
Tabla 5. Factores de transcripción encontrados río arriba del orfRS14140.	36

RESUMEN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es uno de los principales causantes de diarrea en niños menores de 5 años de edad en países en vías de desarrollo. La infección por EPEC se caracteriza por dos fenotipos característicos: la adherencia localizada (AL) y la lesión de adherencia y destrucción (A/E). Los componentes genéticos requeridos para estos fenotipos están codificados principalmente en el plásmido EAF (EPEC adherence factor) y en la isla de patogenicidad LEE (Locus of Enterocyte Effacement), respectivamente. La expresión de los genes de virulencia está bajo el efecto de diversos reguladores, uno de ellos es PerA (Plasmid Encoded Regulator A), una proteína perteneciente a la familia AraC/XylS que activa su propia expresión y la del operón *bfp* involucrado en la formación del pilus BFP (Bundle Forming Pilus). PerA activa también la expresión a nivel transcripcional del regulador PerC y éste a su vez modula de manera positiva a los genes de la isla LEE, a través del regulador Ler (LEE Encoded Regulator).

En 2014, Santiago y colaboradores reportaron la existencia de una nueva familia de reguladores anti-virulencia llamada ANR (AraC-family Negative Regulator) que suprimen el efecto de miembros de la familia AraC/XylS en patógenos Gram negativos. Aar (AggR-activated regulator), el prototipo de esta familia presente en *E. coli* enteroagregativa interactúa (proteína-proteína) con AggR, un regulador AraC/XylS que activa a nivel transcripcional varios genes de virulencia. Tal interacción evita que AggR se una al ADN aboliendo su función como activador. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de RS14140 (un homólogo de Aar) sobre la expresión de los genes de virulencia regulados por PerA en EPEC WT. Para esto, se realizó RT-PCR punto final con la finalidad de evaluar la expresión del *orfRS14140* y *perA* en EPEC WT cultivada en diferentes condiciones de crecimiento, los resultados obtenidos indican que cuando la bacteria es cultivada en medio DMEM a 37°C (condiciones de inducción de los genes de virulencia), el *orfRS14140* se expresa en bajas cantidades desde etapas tempranas de la curva de crecimiento, disminuyendo ligeramente durante la fase estacionaria; mientras que *perA* se expresa en mayor cantidad que *RS14140* a lo largo de la curva de crecimiento de esta bacteria. En la condición de represión de genes de virulencia (LB/37°C), *RS14140* se expresa en mayor concentración que en DMEM, en contraste con la baja transcripción de *perA*. De manera interesante, cuando la bacteria fue cultivada en DMEM/amonio a 37°C (condición de represión), *RS14140* mostró una expresión mayor desde etapas tempranas de la curva de crecimiento de la bacteria y disminuyó de manera gradual al final de la misma. Por otra parte, se evaluó mediante RT-qPCR, el efecto en multicopia de la proteína RS14140 en EPEC WT sobre la transcripción de *perA*, *bfpA* y *perC* ubicados en el plásmido EAF, así como de *espB* y *escJ* codificados en la isla LEE. Al mismo tiempo, se estudió el efecto de esta proteína tipo ANR sobre la expresión de BfpA y EspA mediante Western Blot y sobre el perfil de proteínas secretadas por el sistema de secreción tipo III de EPEC. Los resultados obtenidos indican que RS14140 reprime la transcripción de todos los genes evaluados a excepción de *gyrB* usado como control. Este efecto de represión también fue observado sobre la expresión de las proteínas BfpA, EspA y las proteínas secretadas; mientras que GroEL, usada como control no fue afectada.

Los resultados de este trabajo indican que RS14140, un miembro de la familia ANR, modula negativamente la expresión de los genes de virulencia regulados por PerA. Dicho efecto podría ocurrir mediante la interacción proteína-proteína con el activador transcripcional PerA, por lo que esta última no sería capaz de favorecer la expresión de sus genes blanco. La existencia de esta nueva familia de reguladores Anti-AraC/XylS revela la adaptación y evolución que sufren los patógenos para mantener un equilibrio entre las proteínas activadoras y represoras que aseguren la expresión de factores de virulencia solo bajo condiciones ambientales adecuadas con la finalidad de favorecer su sobrevivencia en el hospedero.

1. INTRODUCCIÓN

La diarrea representa la segunda causa de morbilidad y mortalidad a nivel mundial en menores de cinco años de edad, principalmente en países en vías de desarrollo, causando la muerte de alrededor de 525,000 niños cada año (UNICEF, 2018; WHO, 2017). Se define como deposición líquida de tres o más veces al día y es usualmente síntoma de una alteración en el tracto intestinal provocada por una amplia gama de bacterias, virus y parásitos que son adquiridos al consumir agua y/o, alimentos contaminados, por contacto persona-persona o vía zoonótica. Los principales agentes infecciosos causantes de diarrea son Rotavirus y *E. coli* (WHO, 2017).

E. coli es un bacilo Gram negativo, flagelado, no formador de esporas y perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Es adquirido poco tiempo después del nacimiento para luego formar parte de la microbiota del intestino humano en una relación simbiótica durante toda la vida. La presencia de esta bacteria es necesaria para procesos importantes durante la digestión y la síntesis de vitaminas como la vitamina K y el complejo B (Donnenberg, 2013; Hill and Drasar, 1975; Wiwanitkit, 2011). Sin embargo, existen diversos patotipos de esta especie que han adquirido una gran variedad de factores de virulencia. Muchas veces estos factores están codificados en elementos genéticos móviles que les conceden la capacidad de adaptarse a nuevos nichos ecológicos provocando diversas enfermedades en seres humanos (Kaper et al., 2004).

Los patotipos de *E. coli* se clasifican en dos grandes grupos: los patotipos extra intestinales (ExPEC) al que pertenecen *E. coli* uropatógena (UPEC) y *E. coli* asociada a meningitis (MNEC); y patotipos intestinales donde se reconocen seis tipos: *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). El repertorio de factores de virulencia que poseen estos patógenos incluyen: toxinas, fimbrias, sistemas de secreción, entre otros (Kaper et al., 2004; Nataro and Kaper, 1998).

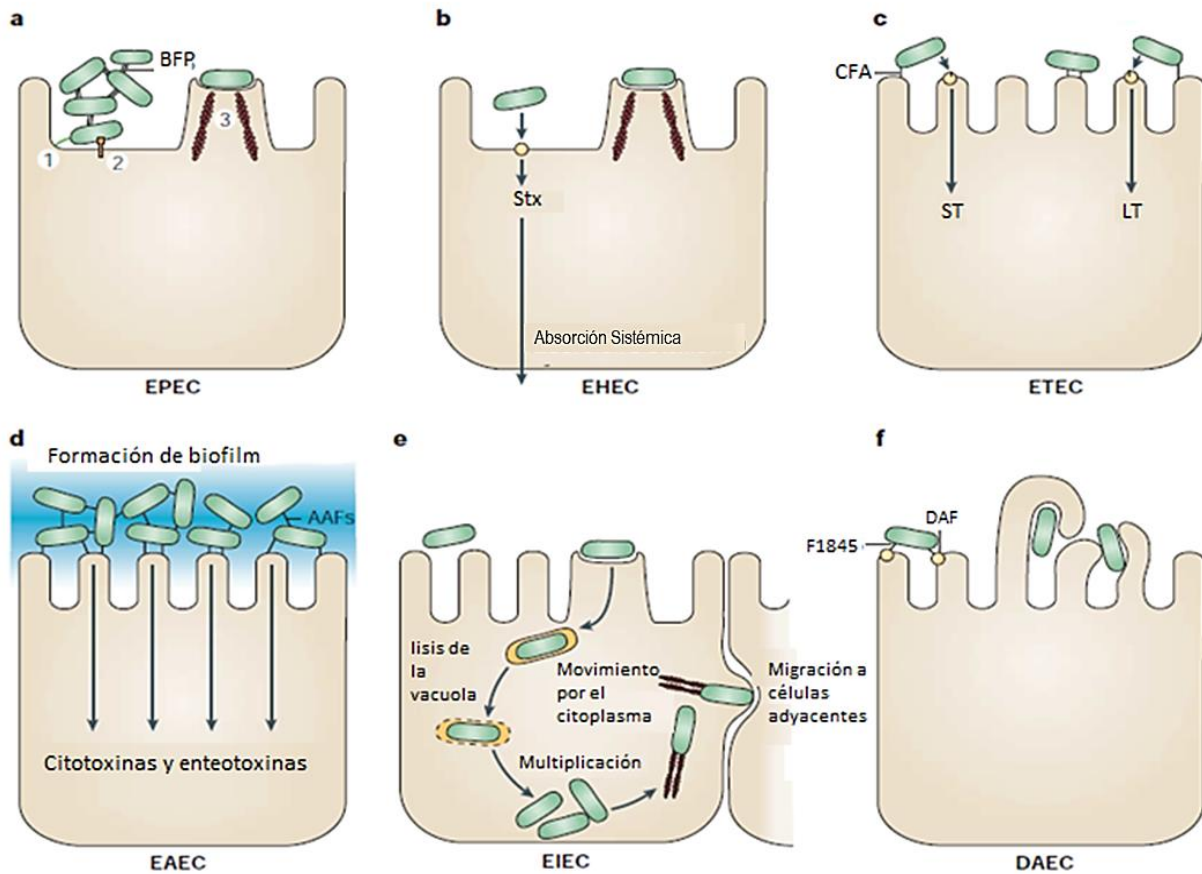


Figura 1. Patotipos diarreogénicos de *E. coli* y su mecanismo de patogenicidad.

a) EPEC coloniza el intestino delgado produciendo la lesión A/E en tres pasos: **1)** adherencia inicial donde participa principalmente la fimbria BFP que favorece la agregación bacteriana y la formación de microcolonias, **2)** translocación de proteínas por medio de un sistema de secreción tipo 3 (SSTIII) que altera las vías de transducción de señales de los enterocitos, **3)** adherencia íntima en la que participan las proteínas Tir e Intimina, tal interacción lleva a la formación de una estructura parecida a un pedestal sobre la que reside la bacteria. **b)** EHEC coloniza el intestino grueso generando también la lesión A/E, además produce la toxina Shiga (Stx) que es responsable de colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico. **c)** ETEC coloniza el intestino delgado usando factores de adherencia como la fimbria CFA (Colonization Factor Antigen) y produce daño por medio de la toxina termoestable (ST) y/o la toxina termolábil (LT). **d)** EAEC puede colonizar tanto el intestino delgado como el grueso formando biopelículas en forma de “ladrillos apilados”, además libera diversas enterotoxinas. **e)** EIEC invade las células epiteliales del colon, posteriormente lisa el fagosoma y promueve la formación de “colas de actina” con las que se puede mover dentro de la célula y a células adyacentes. **f)** DAEC coloniza el intestino delgado con ayuda de la adhesina F1845 y DAF (Decay-Accelerating Factor) entre otras, e induce la formación de prolongaciones de la membrana en forma de dedos alrededor de la bacteria. Tomado y modificado de (Kaper et al., 2004).

1.1 *E. coli* enteropatógena

EPEC fue el primer patotipo de *E. coli* descrito como causante de diarrea en niños, actualmente representa la segunda causa de diarrea infecciosa en menores de 5 años de edad sólo por debajo de rotavirus y seguido de ETEC. La enfermedad provocada por EPEC se caracteriza por diarrea aguda de severidad variada, en algunos casos prolongada provocando pérdida de fluidos y fiebre (Lanata et al., 2013; Ochoa and Contreras, 2011).

EPEC coloniza el intestino delgado en donde provoca dos fenotipos característicos: la adherencia localizada (AL) y la lesión de adherencia y destrucción (A/E). El fenotipo AL se debe principalmente a la producción de una fimbria tipo IV llamada BFP (Bundle Forming Pilus) que media la agregación bacteria-bacteria y la adherencia a las células epiteliales estableciendo un primer contacto con el hospedero (Donnenberg et al., 1992; Gomes et al., 1989). La lesión A/E es producida por diversas proteínas llamadas efectoras que mediante un sistema de secreción tipo III (SSTIII) son translocadas dentro del enterocito. Estas proteínas inducen la alteración de las vías de transducción de señales del citoesqueleto provocando la destrucción de las microvellosidades intestinales y la acumulación de actina debajo del sitio de adherencia de la bacteria, formando una estructura en forma de copa o pedestal sobre la cual EPEC se adhiere íntimamente (Donnenberg, 2013; Kaper et al., 2004; Ochoa and Contreras, 2011).

Los componentes genéticos requeridos para el desarrollo de estos fenotipos se encuentran codificados en un plásmido de 70 a 100 Kpb llamado EAF (EPEC Adherence Factor) (Figura 2A), y en una isla de patogenicidad de 35 Kpb llamada LEE (Locus of Enterocyte Effacement) (Figura 2B) (Kaper et al., 2004).

En el plásmido EAF se localiza el operón *bfp* formado por 14 genes los cuales codifican los componentes necesarios para el ensamblaje de BFP (Stone et al., 1996), entre los que destacan: *bfpA* (pilina), *bfpP* (Pre-pilin-peptidasa), *bfpD* (ATPasa de secreción), *bfpF* (ATPasa de retracción), entre otros (Donnenberg, 2013). En el mismo plásmido, se encuentra además el operón *per* (Plasmid-Encoded Regulator) formado por los genes *perA*, *perB* y *perC*; los cuales codifican

reguladores de la virulencia de esta bacteria (Figura 2A) (Gomez-Duarte and Kaper, 1995).

La isla de patogenicidad LEE está ubicada en el cromosoma y contiene 41 marcos de lectura abierto organizados principalmente en 5 operones policistrónicos (*LEE1-5*): *LEE1*, *LEE2* y *LEE3* contienen los genes *esc* y *sep* que codifican los componentes principales del SSTIII. En el operón *LEE1* se encuentra también el gen *ler* (LEE Encoded Regulator) que codifica un regulador que activa la expresión de los genes de la isla. *LEE4* alberga genes que codifican proteínas secretadas por el SSTIII como *espA*, *espB*, *espD* y *espF*. Finalmente, *LEE5* contiene los genes *eae* y *tir* que codifican la proteína Intimina de adhesión y su receptor Tir, respectivamente (Franzin and Sircili, 2015). Otros elementos importantes codificados en LEE son los reguladores GrIA y GrIR los cuales modulan la expresión de los genes de la isla de manera positiva y negativa, respectivamente (Figura 2B) (Deng et al., 2004).

1.1.1 Mecanismo de patogenicidad de EPEC

Para describir cómo EPEC coloniza y produce daño en el intestino delgado se ha propuesto un modelo de tres etapas: adherencia inicial, transducción de señales y adherencia íntima (Figura 3). Estas etapas no precisamente suceden en ese orden, bien pueden suceder simultáneamente, pero este modelo nos ayuda a comprender mejor el proceso de patogénesis de esta bacteria (Nataro and Kaper, 1998).

La adherencia inicial consiste en la unión no íntima entre EPEC y la célula hospedera produciéndose la AL (Donnenberg et al., 1992). Para este fenotipo son requeridos distintos elementos. El principal es la fimbria BFP que favorece la agregación bacteriana y la formación de microcolonias (Nataro and Kaper, 1998), mediante la unión específica a fosfatidiletanolamina, un lípido de membrana presente tanto en células bacterianas como en epiteliales (Barnett Foster et al., 1999; Khursigara et al., 2001). Otros receptores propuestos, en su mayoría oligosacáridos son: N-acetil-galactosamina, Asialo-GM1/GM2, lacto-N-neotetraosa entre otros.

Se conoce además de BFP, la participación de la fimbria ECP (*E. coli* Common Pilus), que es un factor de adherencia importante para la colonización a células

epiteliales en cepas de *E. coli* tanto comensales como patógenas (Rendon et al., 2007). Se ha observado que ECP es coexpresado con BFP durante el desarrollo de la AL, funcionando como un factor de adherencia accesorio que promueve la unión al epitelio intestinal y las interacciones bacteria-bacteria (Saldana et al., 2009).

Una vez que se establece la adherencia inicial entre EPEC y la célula intestinal, se induce la expresión y ensamblaje del SSTIII, un complejo aparato compuesto por más de 20 proteínas que se organizan en componentes que abarcan las dos membranas de la bacteria y que culmina en una aguja que se extiende hacia el interior de la célula hospedera mediante la cual son transportadas las proteínas efectoras dentro de ella (Figura 4). Esto desencadena la segunda etapa del mecanismo de patogenicidad de esta bacteria llamada transducción de señales (Figura 3) (Nataro and Kaper, 1998). Las proteínas efectoras como: Map, EspB, EspF, EspG, EspH, EspZ y Tir; inducen una serie de alteraciones en las vías de transducción de señales del hospedero, las cuales se resumen en la Tabla 1 y que tienen como finalidad favorecer la supervivencia de EPEC. Además de los efectores codificados en LEE, existen una gran cantidad que son translocados por el SSTIII pero que están codificados en otras regiones del cromosoma de EPEC. Gran parte de estos genes son denominados Nle (Non-LEE Encoded) y sus funciones están relacionadas con la respuesta inflamatoria, anti-fagocitosis, e incluso la inducción de la respuesta inmune innata (Dean and Kenny, 2009). Un efector importante no codificado en LEE es EspC quien es un auto transportador que puede usar el SSTIII para entrar al hospedero actuando como enterotoxina y causando daño al citoesqueleto de actina debido a su actividad proteolítica (Kaper et al., 2004).

La adherencia íntima que conforma la tercera etapa, es mediada por la interacción entre una proteína de membrana externa de la bacteria llamada Intimina y Tir. Éste último es translocado al citoplasma de la célula hospedera mediante el SSTIII y posteriormente insertado en la membrana funcionando como receptor para la Intimina. Además de la función como receptor, Tir también promueve la interacción con proteínas asociadas con el reclutamiento de actina contribuyendo a la formación del pedestal (Croxen and Finlay, 2009) (Figura 3).

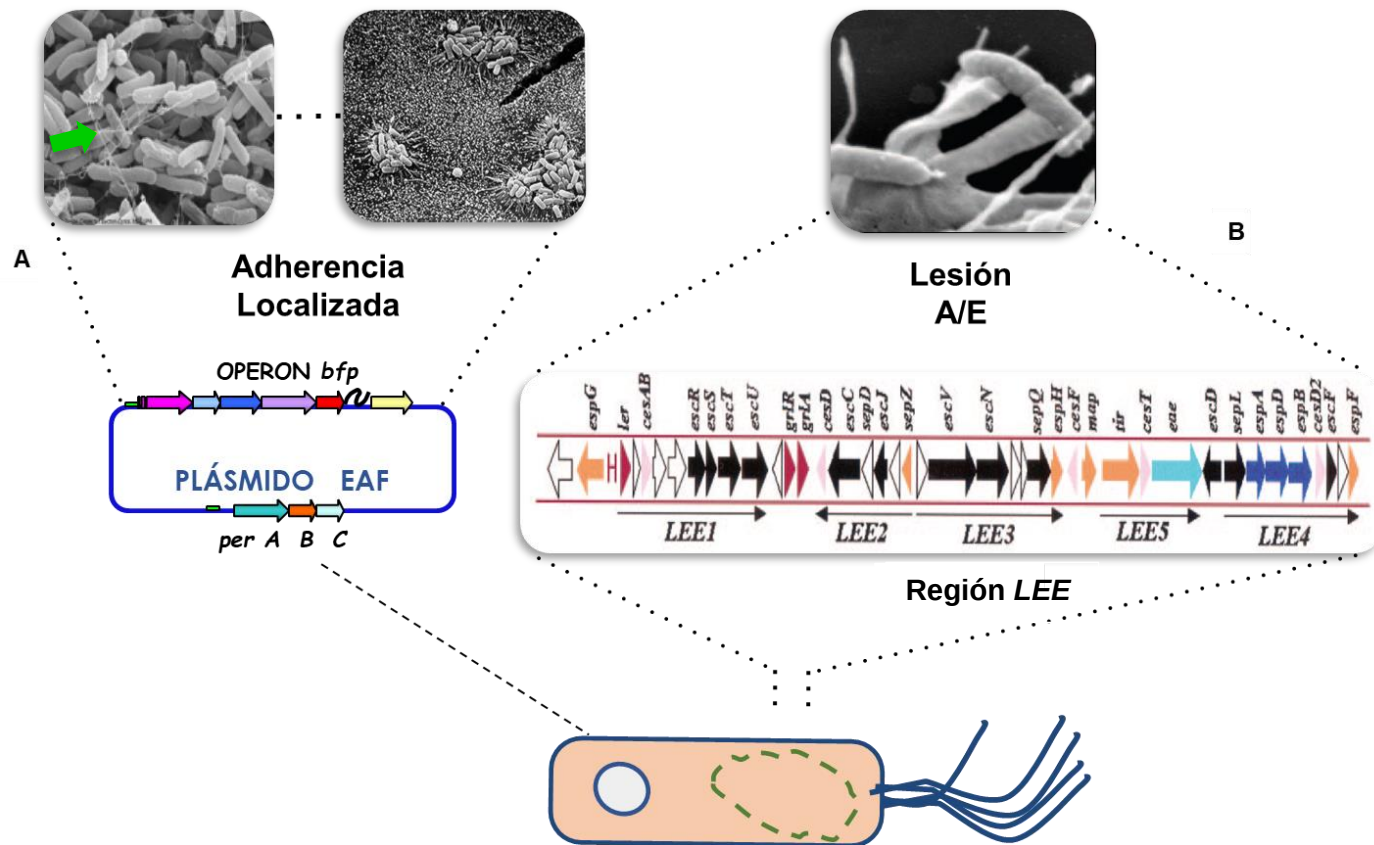


Figura 2. Principales determinantes genéticos requeridos para los fenotipos de Adherencia localizada y la lesión A/E en EPEC.

(A) Plásmido EAF donde se encuentra el operón *bfp* que codifica el pilus BFP (flecha verde en la micrografía), el cual favorece la agregación bacteriana y la formación del fenotipo de adherencia localizada. En este plásmido se ubica también el operón *per* que codifica los reguladores de virulencia PerA y PerC. **(B)** La isla de patogenicidad LEE se ubica en el cromosoma, está conformada por 5 operones policistrónicos (*LEE* 1-5), los cuales codifican un SSTIII y sus efectores. Las proteínas efectoras modifican las vías de transducción de señales del enterocito causando alteraciones en su citoesqueleto que llevan a la formación de la lesión A/E.

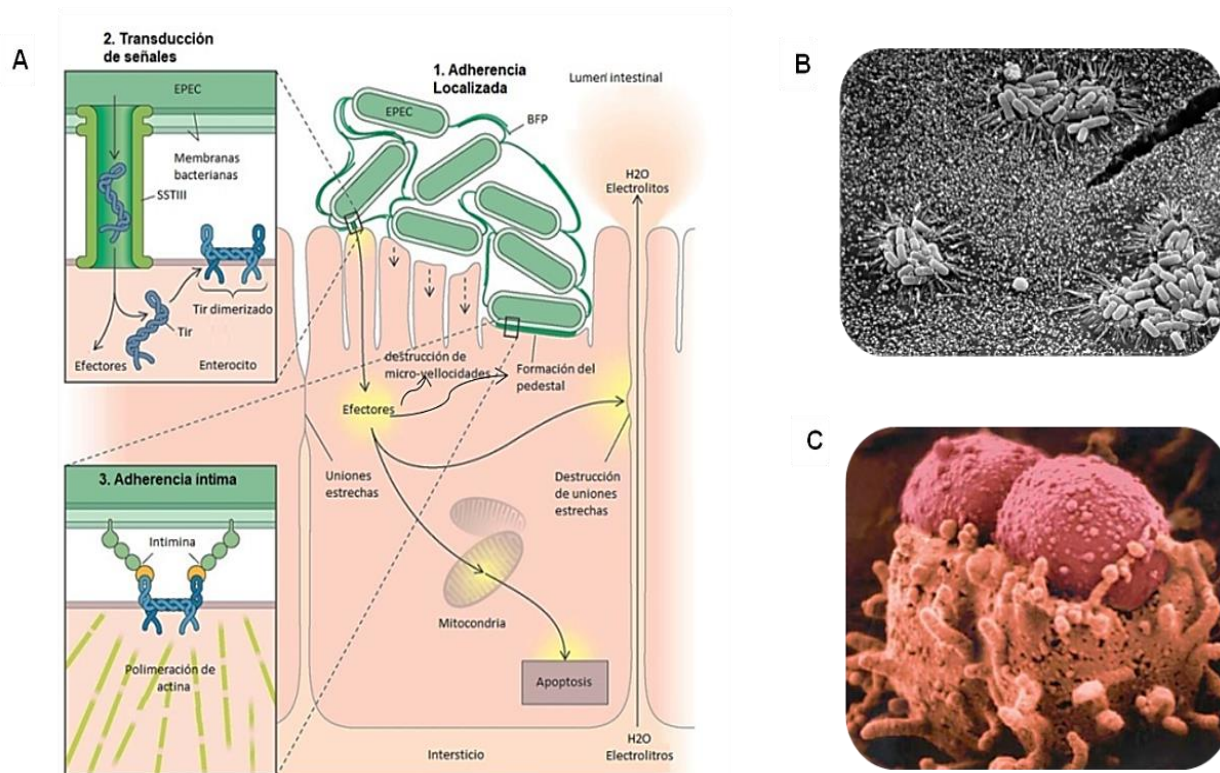


Figura 3. Modelo de patogénesis de EPEC.

A) Las tres fases del mecanismo de patogenicidad de EPEC: **1. Adherencia localizada:** donde principalmente participa la fimbria BFP. **2. Transducción de señales** mediado por el SSTIII que transloca numerosos efectores dentro del hospedero los cuales tienen diversas funciones como: destrucción de las microvellosidades, destrucción de las uniones estrechas, formación del pedestal, y apoptosis. Se destaca también Tir, que actúa como efector para la formación del pedestal de actina y como receptor de Intimina. **3. Adherencia íntima** que se produce por la unión entre Intimina y Tir. Tal interacción favorece el reclutamiento de actina por debajo del sitio donde la bacteria se adhiere; lo que genera la formación de una estructura en forma de copa o pedestal. Esquema tomado y modificado de (what-when-how.com/acp-medicine/infections-due-to-escherichia-coli-and-other-enteric-gram-negative-bacilli-part-1/).

B) Microscopia de barrido del fenotipo de AL en células Hep-2 infectadas con EPEC. **C)** Microscopía de barrido del pedestal en enterocitos. Microscopías de J. A. Girón tomadas de (Kaper et al., 2004).

En su conjunto, todos los elementos que participan en el mecanismo de patogenicidad de EPEC tienen como consecuencia los siguientes eventos: reorganización del citoesqueleto, alteración de la integridad de uniones estrechas, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, alteración del tráfico vesicular, inhibición de la transición de la fase G₂/M del ciclo celular, alteración en la apoptosis y modulación de la respuesta inmune del hospedero, entre otras. Por tanto, la

diarrea se produce como consecuencia de la disminución de la superficie de absorción de nutrientes, alteración del equilibrio iónico y aumento de la permeabilidad paracelular (Chen and Frankel, 2005).

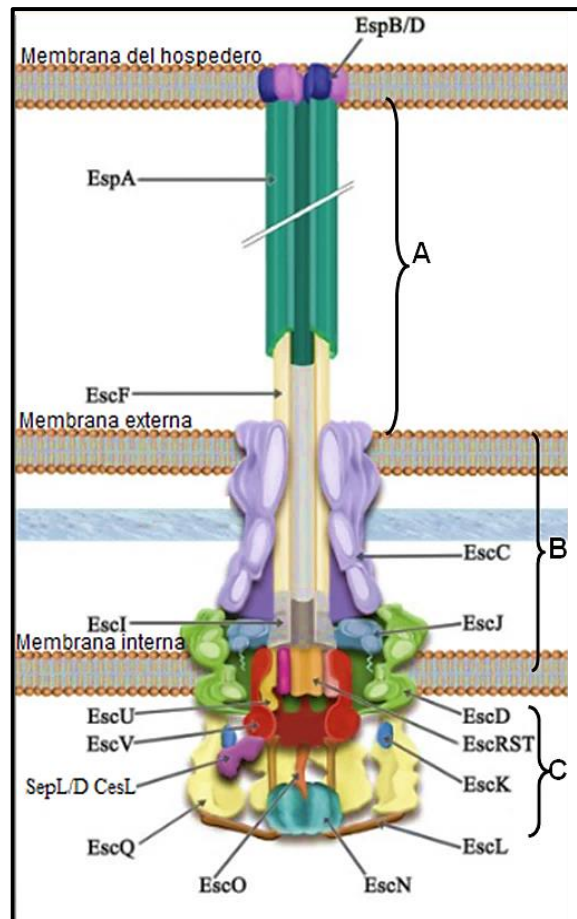


Figura 4. Esquema del SSTIII de EPEC.

Este complejo aparato se divide en tres partes principales: **(A)** Apéndices extracelulares que consisten en: poro translocador (formado por EspB/D), aguja (formado por EspF) y filamento (formado por EspA). **(B)** Cuerpo basal formado por tres anillos interconectados por una varilla periplásmica (formada por EscI). El primer anillo abarca la membrana externa y el espacio periplásmico (formado por EscC) y dos anillos concéntricos insertados en la membrana interna (formados por EscD y EscJ), los cuales albergan al aparato exportador (formado por EscR/S/T/U/V). y **(C)** Componentes citoplasmáticos que comprenden el complejo ATPasa (formado por EscN/L/O), la plataforma de clasificación o “sorting” (formado por EscQ/L/K) y el complejo translocador (formado por SepL/D y CesL). Tomado y modificado de (Gaytan et al., 2016).

Tabla 1. Efectores codificados en LEE y su función.

Tir	Es translocado dentro del hospedero sirviendo como receptor para Intimina y además funciona como un efector esencial para la formación del pedestal. Al entrar al hospedero, Tir es fosforilado en el residuo 474 de tirosina y de esa manera puede reclutar a Nck y a su vez a las proteínas N-WASP y Arp2/3, las cuales activan la nucleación de actina. Este proceso puede suceder independientemente de Nck ya que Tir por sí sola es capaz de interactuar directamente con actina y promover su polimerización.	(Goosney et al., 2000; Gruenheid et al., 2001; Kenny, 1999; Kenny et al., 1997b)
EspF	Es un efector multifuncional. Al igual que Tir, activa la nucleación de actina al reclutar N-WASP y Arp2/3. También participa en la ruptura de la barrera epitelial al promover la endocitosis de las uniones estrechas. Por otra parte, altera el funcionamiento de la mitocondria provocando la muerte celular programada. Otros efectos de EspF son: alteración de los filamentos intermedios, inhibición de la fagocitosis, destrucción del núcleo, entre otros.	(Dean et al., 2005; Ugalde-Silva et al.)
EspG	Este efector también es multifuncional. Tiene la capacidad de inactivar ciertas GTPasas dando como resultado el remodelado del citoesqueleto de actina y de la red de microtúbulos provocando la formación de fibras de estrés. Esto afecta la integridad de orgánulos entre ellos el aparato de Golgi y como consecuencia se interrumpe el tráfico vesicular. EspG también inhibe los canales de transporte iónico y las acuaporinas.	(Donnenberg, 2013; Ugalde-Silva et al.)
EspH	Participa en la formación y crecimiento del pedestal a través del reclutamiento de N-WASP y Arp 2/3. También afecta los desmosomas al promover la internalización y posterior degradación de DSG2 y DSC2 que son proteínas esenciales para este tipo de uniones paracelulares. Por otra parte, EspH inhibe la GTPasa Rho promoviendo el desensamble del citoesqueleto de actina.	(Roxas et al.; Wong et al.)
EspZ	Interesantemente este efector tiene un efecto benéfico para la célula hospedera protegiéndola de la muerte celular. Esto lo hace actuando sobre la mitocondria mediante tres vías: 1) Manteniendo el potencial de membrana, 2) Mediante la retención del citocromo C dentro de ella y, 3) Inhibiendo la actividad de las caspasas 3, 7 y 9.	(Roxas et al.)
EspB	Cumple la función de proteína transportadora al formar un poro en la membrana de la célula hospedera, junto con EspD, a través del cual pasan las diferentes proteínas efectoras. Además, funciona como efector participando en la destrucción de las microvellosidades intestinales y en la supresión de la fagocitosis bloqueando la unión entre miembros de la superfamilia de las miosinas y la actina.	(Donnenberg, 2013; Iizumi et al., 2007)
Map	Este efector se transporta al interior de la mitocondria alterando su funcionamiento e induciendo apoptosis. También participa en la formación del pedestal a través del reclutamiento de N-WASP y Arp2/3. Además, promueve la redistribución de las uniones estrechas al interferir en su ensamblaje.	(Donnenberg, 2013)

2. ANTECEDENTES

2.1 Antecedentes generales

La regulación de los genes de virulencia en patógenos está relacionada a su capacidad para detectar diversos factores ambientales como: temperatura, disponibilidad de iones metálicos, concentración de aniones, pH, tensión de oxígeno y osmolaridad, por mencionar algunos (Thomas and Wigneshweraraj, 2014). Esto hace que dichos genes estén sometidos a un mecanismo complejo de estricta regulación que asegura su expresión sólo bajo condiciones ambientales óptimas, evitando un gasto metabólico intenso y alertar al sistema inmunológico del hospedero antes de una colonización exitosa (Clarke et al., 2003).

Los patógenos intestinales como las *E. coli* diarreogénicas, tienen la habilidad de coordinar de manera diferencial la expresión de sus genes de virulencia durante su tránsito a través del tracto gastrointestinal, garantizando de esta forma su supervivencia (Thomas and Wigneshweraraj, 2014). En EPEC, los genes de virulencia están bajo el control de una compleja red de regulación que aún no ha sido definida en su totalidad, a pesar de ello se ha determinado que diferentes reguladores globales modulan la virulencia de EPEC, entre éstos se incluyen las proteínas: H-NS, IHF, Fis, BipA y QseA (Abe et al., 2008).

Los reguladores específicos que participan en la red de regulación de los factores de virulencia de EPEC se encuentran codificados principalmente en la isla LEE y en el plásmido EAF (Figura 5). El primer gen de LEE1 codifica a Ler, un regulador específico que modula de forma positiva la expresión de los operones *LEE1*, *LEE2*, *LEE3*, *LEE4* y *LEE5* (Figura 5) ya que se encarga de liberar el efecto de represión mediada por H-NS (Histone-like nucleoid-structuring protein) (Bustamante et al., 2001). Otros reguladores importantes codificados en LEE son GrlA y GrlR, los cuales actúan río arriba de la cascada de regulación de Ler (Figura 5) (Deng et al., 2004). GrlA actúa liberando el efecto represor de H-NS uniéndose a una región entre el promotor de *ler*. Las condiciones en las que se activa la regulación por GrlA *in vitro* son medio DMEM a 37°C en agitación (Bustamante et al., 2011). GrlR por su lado antagoniza la actividad de GrlA (Deng et al., 2004), mediante la interacción proteína-proteína (Creasey et al., 2003). Se ha demostrado que GrlR también

reprime la expresión de LEE mediante un mecanismo independiente de su interacción con GrlA, el cual es aún desconocido (Lara-Ochoa y col. Datos no publicados).

Dentro del plásmido EAF aproximadamente a 6.7 kb río abajo del locus de *bfp* está ubicado el operón *perABC*, el cual se transcribe como una unidad policistónica y codifica proteínas reguladoras. La principal es PerA, una proteína que funciona como su propio activador transcripcional y por consecuencia de los genes restantes del operón *per*, así como de la del operón *bfp* (Figura 5). La expresión de *perA* ocurre a lo largo de la curva de crecimiento de EPEC teniendo su punto máximo durante la fase estacionaria temprana (Martinez-Laguna et al., 1999; Porter et al., 2004). Su expresión se activa una vez que la bacteria encuentra las condiciones ideales de colonización (Porter et al., 2004). Por otra parte, la expresión de *perA* es reprimida por diversos elementos (Figura 5): uno de ellos es GadX que la modula negativamente a nivel transcripcional cuando la bacteria es sometida a un pH ácido (Shin et al., 2001). Otro represor es H-NS, una proteína de asociación al ADN que se une en las regiones reguladoras de los operones *per* y *bfp* (Porter et al., 2004). El tercer gen del operón *per* codifica para PerC y es otro regulador específico que participa en la red de regulación de la virulencia de EPEC. Su función es modular de forma positiva la expresión de *ler* (Figura 5) (Porter et al., 2004), mediante un mecanismo similar al de GrlA, sin embargo a diferencia de éste, las condiciones ambientales que favorecen la regulación mediada por PerC *in vitro* son medio DMEM estático con 5% de CO₂ (Bustamante et al., 2011).

Los factores ambientales que regulan positivamente la expresión de los genes de virulencia de EPEC son: fase exponencial de la curva de crecimiento, temperatura de 37°C, pH 7, osmolaridad fisiológica, presencia de cloruro de calcio (1.4 mM) y bicarbonato de sodio (10-44 mM) (Clarke et al., 2003; Kenny et al., 1997a). En el laboratorio se usa el medio de cultivo para células eucariotas DMEM a 37°C para inducir la expresión de los genes de virulencia ubicados en el plásmido EAF y la isla LEE (Kenny et al., 1997a; Martinez-Laguna et al., 1999). Por otro lado, las condiciones que reprimen la expresión de estos factores de virulencia son el crecimiento en medio rico como el LB, temperaturas por arriba y debajo de 37°C

(Kenny et al., 1997a; Puente et al., 1996) y la presencia de sales de amonio. Al respecto, una concentración de sulfato de amonio de 20 mM reduce hasta un 90% la expresión de *perA* y *bfpA* (Martinez-Laguna et al., 1999) y 48 mM de cloruro de amonio, reduce drásticamente la secreción de proteínas (Kenny et al., 1997a). El mecanismo de regulación por amonio es aún desconocido, pero se sabe que el elemento involucrado en esta regulación es específico de EPEC (Martinez-Laguna et al., 1999).

2.2 Antecedentes específicos

PerA es una proteína de 31.6 kDa perteneciente a la familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS. Los miembros de esta familia regulan funciones importantes como el metabolismo del carbono, respuesta al estrés y virulencia. Estos reguladores se caracterizan por poseer 2 dominios (Figura 6): una región poco conservada ubicada hacia el extremo N-terminal cuya función principal es detectar señales químicas y 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 al ADN. Esta región también contiene un probable sitio de interacción con la ARN polimerasa (RNAP) (Figura 6) (Gallegos et al., 1997; Gomez-Duarte and Kaper, 1995).

El mecanismo que utiliza PerA para activar la transcripción de sus genes blanco es todavía desconocido. Se ha demostrado que se une a una secuencia consenso de 29 pb ricas en AT ubicada río arriba de los promotores de estos genes, entre las posiciones -83 a -55 de *bfpA* y -75 a -47 de *perA* (GAAATATATAAAAAAAAAAAGAAAAAAAAAGA y GAAAAATATCAGTAAATTTTAAATAAATA, respectivamente) (Ibarra et al., 2003). Recientemente, en nuestro grupo de trabajo se demostró que PerA interactúa con las subunidades alfa y sigma de la RNAP. Lo que sugiere que este regulador activa la transcripción de sus genes blanco mediante el anclaje de la maquinaria transcripcional en los promotores que regula, aunque el modelo todavía está en proceso de análisis (Lara, 2019). La interacción de proteínas de esta familia con la maquinaria transcripcional ha sido reportado para AraC, XylS, SoxS, MarA, Rob y ToxT (Gallegos et al., 1997).

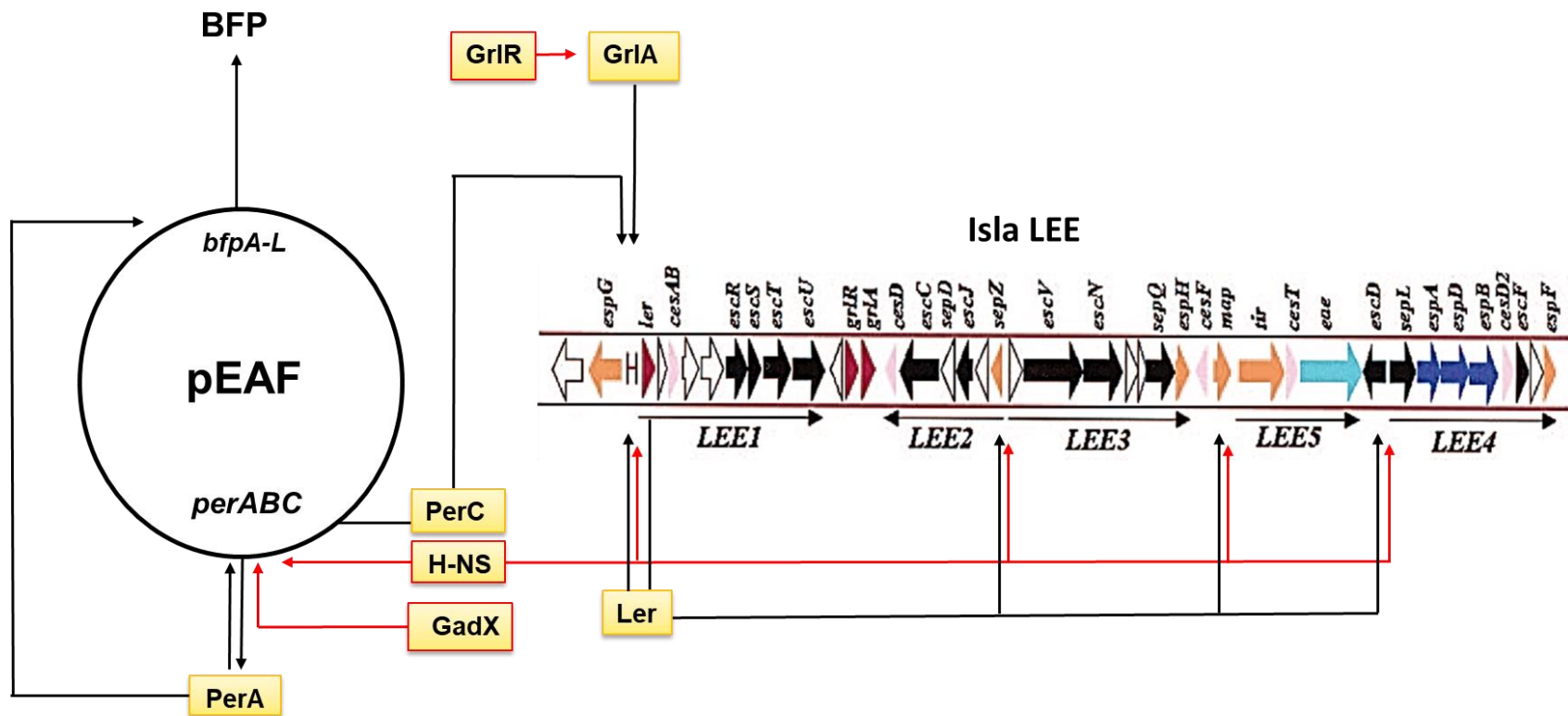


Figura 5. Esquema general de la regulación de los principales factores de virulencia de EPEC.

Ver texto para más detalle. Las flechas negras indican regulación positiva y las flechas rojas indican represión.

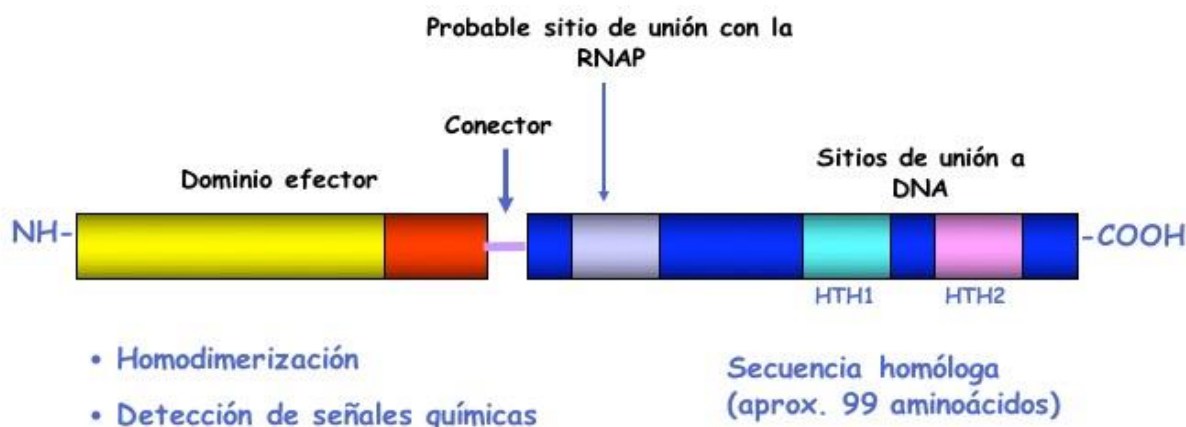


Figura 6. Esquema general de los miembros de la familia AraC/XylS.

Las proteínas que pertenecen a esta familia se caracterizan por poseer un dominio ubicado en el N-terminal altamente variable también llamado dominio efector relacionado con la detección de señales químicas y homodimerización. Mientras que hacia el extremo C-terminal se ubica un dominio altamente conservado entre los miembros de la familia, formado por cerca de 99 aminoácidos que contiene 2 motivos HTH mediante los cuales los reguladores se unen al ADN de los genes que regulan. En algunas proteínas, se encuentra también en el C-terminal un sitio de unión a la RNAP que favorece el anclaje de la maquinaria transcripcional en los promotores de los genes blanco.

De manera interesante, Santiago y colaboradores reportaron en 2014 una nueva familia de reguladores anti-virulencia que actúan como antagonistas de miembros de la familia AraC/XylS, por lo que llamaron a esta familia ANR (AraC-family Negative Regulator) (Santiago et al., 2014). Los miembros de esta familia se caracterizan por estar formadas de 39 a 80 aminoácidos y tener un peso molecular de entre 4.36 a 9.54 kDa. Mediante análisis filogenéticos, este grupo identificó que estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en diversos patógenos Gram negativos (Figura 7) (Santiago et al., 2014).

La proteína sobre la cual basaron sus estudios y que emplearon para proponer a esta familia de reguladores es Aar (AggR-activated regulator) presente en el patógeno EAEC. Esta es una proteína muy pequeña con un peso de 7.2 kDa que modula negativamente la actividad de AggR (Aggregative Regulator) (Santiago et al., 2014; Santiago et al., 2016), el cual es un regulador perteneciente a la familia AraC/XylS codificado en el plásmido pAA (Plasmid of Aggregative Adherence) (Figura 8). AggR activa la expresión de al menos 44 genes, entre ellos su propia expresión, una fimbria de la familia DR llamada AAF/II, un sistema de secreción tipo

VI putativo, sistema de secreción Aap y Aat, una Isopentenil difosfato isomerasa (IDI) y una gran cantidad de proteínas hipotéticas, entre otras (Figura 8) (Morin et al., 2013).

Aar es una proteína insoluble con una estructura secundaria formada por tres hélices alfa sin motivos de unión a ADN (Santiago et al., 2014). El mecanismo de acción mediante el cual Aar ejerce su actividad es a través de la interacción proteína-proteína con AggR. Los aminoácidos de Aar esenciales para esta interacción se encuentran principalmente formando las hélices alfa 2 y 3. Los análisis bioinformáticos, muestran que tales aminoácidos se encuentran ampliamente conservados en todos los miembros ANR (Santiago et al., 2014; Santiago et al., 2016).

Interesantemente, *aar* (que codifica para Aar) es también uno de los genes activados por AggR, lo que indica que ambos reguladores forman un circuito de regulación que mantiene controlada la activación y represión de los genes de virulencia en función de las condiciones ambientales (Figura 8) (Santiago et al., 2014).

Recientemente fue identificado, mediante RNA-seq que Aar regula tanto negativa como positivamente una gran cantidad de genes. Una parte importante de esta regulación es a través de la modulación de los miembros de la familia H-NS mediante la interacción proteína-proteína, disminuyendo la afinidad de unión al ADN por este tipo de proteínas. Esto tiene como efecto el incremento en la expresión de ciertos genes que están bajo la represión de reguladores de la familia H-NS. Empero, dentro de estos genes cuya expresión es favorecida, se encuentran los que codifican a los propios miembros de la familia H-NS (debido a que fungen como su propio represor), por lo que también se promueve la represión de muchos otros genes (Santiago et al., 2017). Esta compleja regulación es muy importante durante el proceso de infección *in vivo* lo cual sugiere la importancia de una red de regulación mediada por Aar y posiblemente de todos los miembros de la familia ANR.

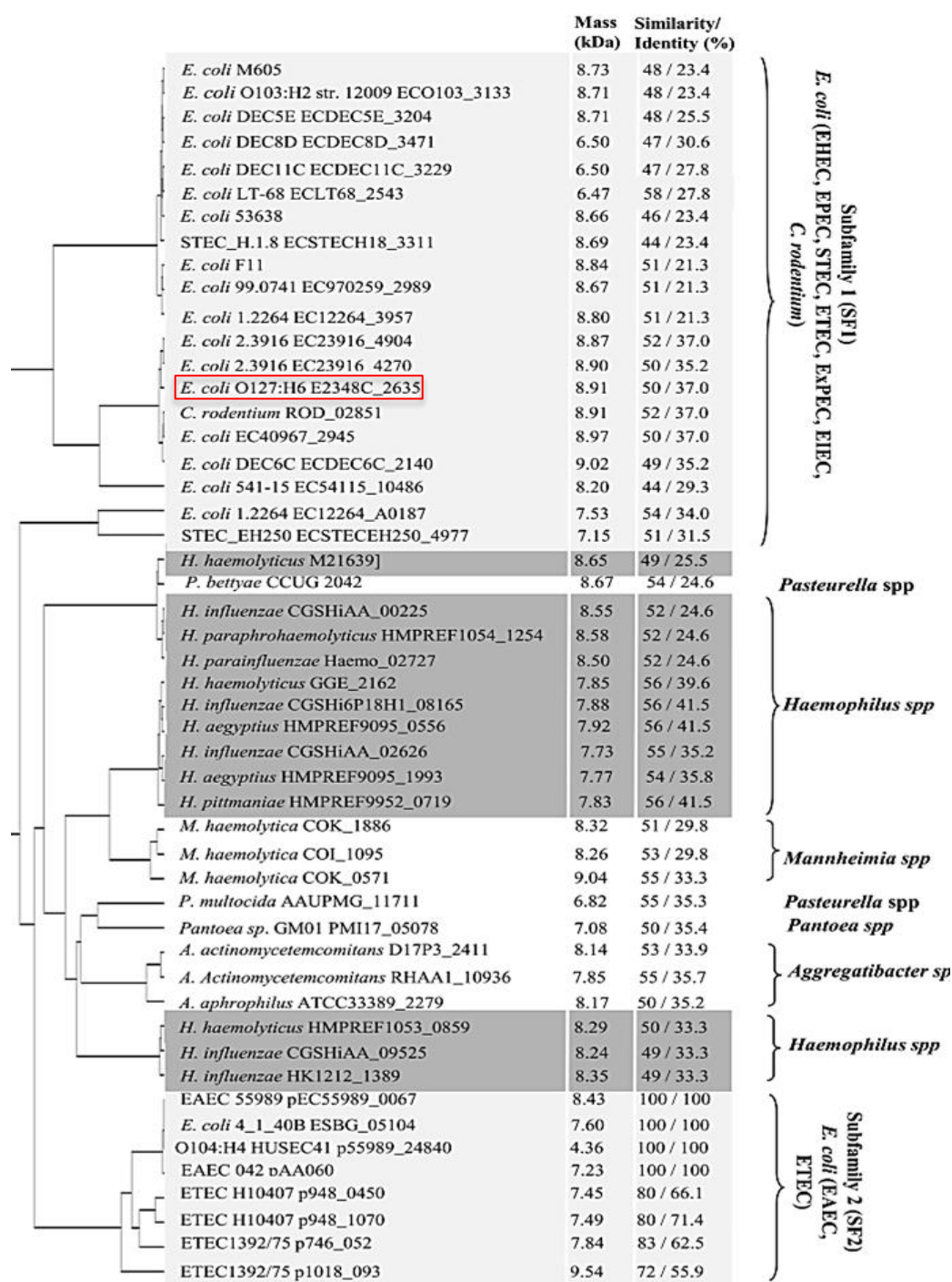


Figura 7. Árbol filogenético de homólogos de Aar en patógenos Gram negativos.

Se distinguen dos subfamilias: SF1 que incluye EHEC, EPEC (modelo de estudio en este trabajo resaltado con un cuadro rojo), STEC, ETEC, ExPEC, EIEC y *Citrobacter rodentium*. SF2 que incluye a EAEC y ETEC. Para generar este árbol utilizaron el programa Clustal W (Santiago et al., 2014). Se indica el peso de cada proteína y el % de similitud e identidad con Aar.

Entre los patógenos que poseen una proteína tipo ANR se encuentra EPEC (E2348/69) serotipo O127:H6, el *orfRS14140* ubicado en su cromosoma codifica una proteína putativa de 8.91 kDa que muestra 37% de identidad y 50% de similitud con Aar (Santiago et al., 2014). El papel de este ORF (Open Readin G Frame) en la red de regulación de los genes de virulencia de EPEC no ha sido descrito, por lo que el objetivo de este trabajo es evaluar el efecto de su expresión y su relación con la función de PerA, el principal miembro de la familia AraC/XylS de este patógeno que tiene un papel esencial en la virulencia de EPEC.

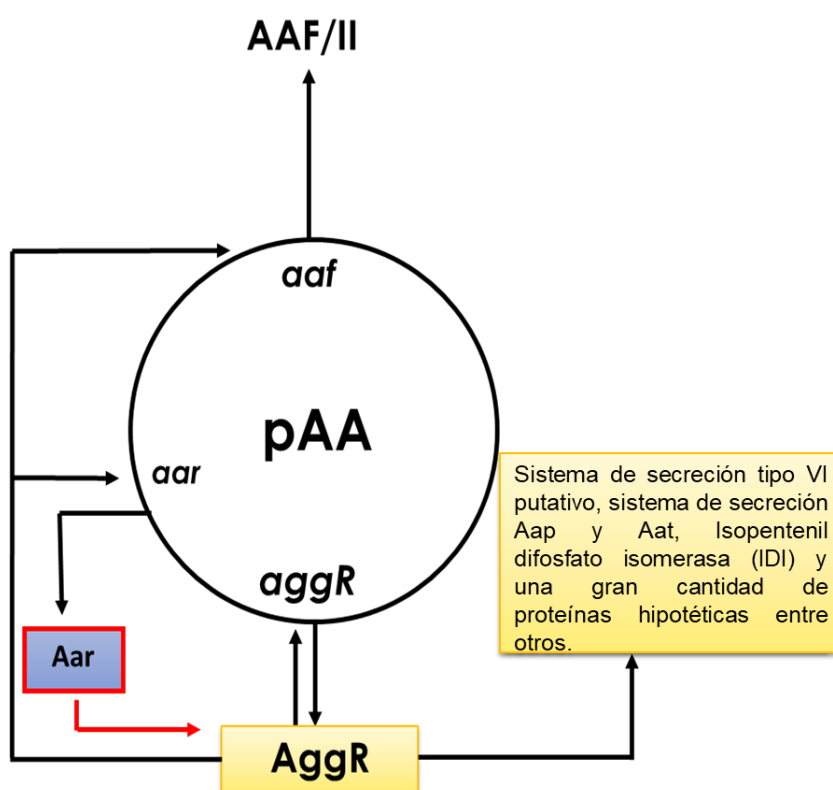


Figura 8. Esquema de la regulación de genes de virulencia ubicados en el plásmido pAA de EAEC.

AggR induce su propia expresión, así como de una gran cantidad de genes, entre ellos: los relacionados con la formación de la fimbria AAF/II, los que codifican para componentes de un sistema de secreción tipo VI putativo, un sistema de secreción Aap y Aat, una Isopentenil difosfato isomerasa putativa (IDI) y una gran cantidad de proteínas hipotéticas. AggR también activa la transcripción de *aar*. La síntesis de Aar ejerce un efecto antagónico sobre AggR mediante la interacción proteína-proteína, lo que lleva a la represión de todos los genes activados por AggR.

3. JUSTIFICACIÓN

EPEC es uno de los principales agentes etiológicos de diarrea que afecta a niños en países en vías de desarrollo. La regulación de la expresión de sus genes de virulencia es un proceso esencial para el desarrollo de la patogenicidad porque asegura la colonización exitosa en el hospedero.

PerA es una proteína fundamental durante la etapa inicial de la infección por este patógeno porque promueve su propia expresión y la de la fimbria BFP. A su vez, PerA tiene un efecto indirecto positivo sobre la expresión de los genes de virulencia codificados en la isla LEE. El mecanismo que utiliza para activar la transcripción de sus genes blanco es poco conocido, pero se ha identificado que se une a una secuencia consenso de 29 pb rica en AT río arriba de los promotores que regula. Además, estudios preliminares sugieren que interactúa con las subunidades alfa y sigma de la ARN polimerasa para activar la transcripción de sus genes blanco, aunque el modelo todavía está en proceso de análisis.

Por otro lado, la identificación de una nueva familia de proteínas anti-AraC/XylS (ANR) ha llevado a conocer cómo es contrarrestada la activación ejercida por algunos miembros AraC/XylS. En este sentido, la presencia de un miembro de ANR en EPEC y el estudio de su función permitirá obtener una mayor comprensión acerca de los mecanismos que esta bacteria emplea para modular la expresión de sus genes de virulencia. El estudio del efecto de un regulador negativo que contrarreste la función de una proteína activadora de la familia AraC/XylS podrá esclarecer su asociación con la virulencia.

4. HIPÓTESIS CIENTÍFICA

El *orfRS14140* reprime la expresión de los genes de virulencia regulados por la proteína activadora PerA en *E. coli* enteropatógena.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Estudiar el efecto del *orfRS14140* sobre la expresión de los genes regulados por el activador transcripcional PerA en *E. coli* enteropatógena.

5.2 Objetivos particulares

- Realizar el análisis bioinformático del *orfRS14140*, así como de la proteína que codifica.
- Evaluar la expresión del *orfRS14140* en condiciones de inducción y de represión de los genes de virulencia de EPEC.
- Clonar el *orfRS14140* de EPEC con una etiqueta de histidinas en el vector pBAD/Myc-His.
- Evaluar el efecto de la sobreexpresión del *orfRS14140* sobre los genes regulados por PerA.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 2. Las cepas se cultivaron de forma rutinaria en medio Luria-Bertani (LB) que contiene peptona de caseína (1%), extracto de levadura (0.5%) y cloruro de sodio (1%). Para la expresión de los genes de virulencia, las cepas bacterianas se crecieron en medio DMEM (Gibco-BRL Life Technologies, Grand Island, N.Y) que contiene glucosa (0.45%) y L-glutamina (584 mg); adicionado con 1% de LB a 37°C en baño de agitación a 220 rpm. A los medios se les agregó ampicilina (100 mg/ml), estreptomycin (100 mg/ml), arabinosa (0.002%, 0.02% o 0.2%) o sulfato de amonio (20 mM), según fue requerido.

Tabla 2. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.		
Cepa/Plásmido	Descripción	Referencia
Cepas de <i>E. coli</i>		
E2348/69	Cepa silvestre de EPEC O127:H6. St ^R	J.B. Kaper
<i>E. coli</i> DH5α	Cepa no patógena de <i>E. coli</i> con el genotipo <i>F- 80dlacZ M15 (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1hsdR17(rk-, mk+) phoAsupE44 -thi-1 gyrA96 relA1</i> , posee una alta eficiencia de transformación, confiere estabilidad del inserto y mejora la calidad del ADN plasmídico preparado a partir de minipreps.	(Woodcock et al., 1989)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	Cepa no patógena de <i>E. coli</i> con el genotipo <i>thiA2 [lon] ompT gal (λ DE3) [dcm] ΔhsdS λ DE3 = λ sBamHI ΔEcoRI-B int:: (lacI::PlacUV5::T7 gene1) i21 Δnin5</i> , deficiente en proteasas usada para producir eficientemente proteínas recombinantes.	New England Biolabs
Plásmidos		
pBAD/Myc-His A	Plásmido optimizado para su expresión en <i>E. coli</i> regulado por el promotor <i>araBAD</i> . Contiene un sitio de multiclonación con diversos sitios de restricción para varias de las principales enzimas del mercado. También contiene fusionados el epítipo Myc y una etiqueta de 6 histidinas en el C-terminal. Ap ^R	Thermo Fisher Scientific
pANREP	Construcción generada en este trabajo al clonar el ORF <i>RS14140</i> con una secuencia que codifica 6 histidinas en pBAD/Myc-His A, en los sitios <i>NcoI</i> y <i>HindIII</i>	Este trabajo

6.2 Manipulaciones de ADN

Las manipulaciones del ADN fueron realizadas de acuerdo a protocolos estándar de biología molecular (Sambrook and Russell, 2001). Las enzimas fueron obtenidas de Thermo Fisher Scientific y usadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos utilizados en ensayos de PCR, indicados en la Tabla 3, fueron sintetizados en la empresa T4 oligo.

6.3 PCR punto final

Tabla 3. Oligonucleótidos usados en este trabajo.			
Nombre	Secuencia 5' a 3'	Descripción	Referencia
ANEREPfw	gcacccatgggccatacagg atatcaaagag	Amplifica la región estructural del <i>orfRS14140</i> , usados para clonar en pBAD, se indican los sitios de restricción <i>NcoI</i> en el fw y <i>HindIII</i> junto con un sitio codificante para 6 histidinas en el rv.	Este trabajo
ANERPrv	tcgaaagcttttattaatgatga tgatgatgatgcccaagcgtt tcgcgttcagaggcggtcc a		
TRANREPfw	gtccagagcagaacaacg	Amplifica la región interna del ORF <i>RS14140</i> para RT-qPCR y RT-PCR punto final.	Este trabajo
TRANREPrv	gcgtttcggttcag		
TRperAfw	cactcattgggacatgg	Amplifica la región interna de <i>perA</i> para RT-qPCR y RT-PCR punto final.	Este trabajo
TRperArv	ttcattgaggttcgcag		
TRperCfw	gggttttatagacgagct	Amplifica la región interna de <i>perC</i> para RT-qPCR y RT-PCR punto final.	Este trabajo
TRperCrv	ctcctgtttatgtcgc		
TRbfpAfw	gggcagaccagttatag	Amplifica la región interna de <i>bfpA</i> para RT-qPCR y RT-PCR punto final.	Este trabajo
TRbfpArv	agtaaccaaagtcggtg		
TRespBfw	ggcagagtggatattc	Amplifica la región interna de <i>espB</i> para RT-qPCR y RT-PCR punto final.	Este trabajo
TRespBrv	agcctaaaatccccagg		
TRescJfw	ataataacggcttcccg	Amplifica la región interna de <i>escJ</i> para RT-qPCR y RT-PCR punto final.	Este trabajo
TRescJrv	atgaaacgctgcaatcg		
pBADfw	atgccatagcattttatcc	Amplifica la región de multiclonación del vector pBAD para caracterizar a las clonas.	Thermo Fisher Scientific
pBADrv	tctgattaatctgtatcagg		

Las mezclas para la reacción de PCR se realizaron usando el reactivo “DreamTaq Green PCR Master Mix” (2X) (Thermo Fisher Scientific), el cual se usó en la reacción

al 1X, los oligonucleótidos a una concentración de 0.4 μ M y $\sim$ 1 μ g de ADN cromosomal y $\sim$ 100 ng de ADN plasmídico. Las PCR se llevaron a cabo en un termociclador “Veriti 96-well” (Applied Biosystems) con el programa usado de rutina en el laboratorio y que se indica en en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de PCR usadas en este trabajo.			
Etapas	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
Desnaturalización inicial	93	5	1
Desnaturalización	93	1	35
Alineamiento	T^m del oligonucleótido	1	
Extensión	72	1	
Extensión final	72	10	1

6.4 Electroforesis en gel de agarosa para la separación de ADN

Las muestras de ADN se mezclaron con buffer de carga (10 mM Tris-HCl pH 7.6, 60% glicerol, 0.03% azul de bromofenol, 60 mM EDTA) y se cargaron en un gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X (40 mM Tris, 19 mM Ácido Acético, 1 mM EDTA). Las muestras se separaron a 100 volts por 30-60 min, luego se tiñeron con bromuro de etidio y se observaron en un fotodocumentador de luz ultravioleta (Carestream Gel Logic 2200 PRO).

6.5 Construcción y caracterización de pANREP

Para construir el plásmido pANREP, la secuencia de ADN que codifica el *orfRS14140* fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos ANEREPfw y ANERPrv, ocupando como molde ADN_g de EPEC WT extraído con el kit “Universal Quick-DNA Mini Prep kit” (ZYMO RESEARCH). El fragmento amplificado fue purificado con el kit “QIAquick PCR purification Kit” (QUIAGEN), a la par se purificó el vector pBAD/Myc-HisA con el kit “Zyppy Plasmid Mini prep kit” (ZYMO RESEARCH). Una vez purificados el producto de PCR y el vector, se prepararon reacciones para digerirlos con la enzima de restricción de digestión rápida *Hind*III (Thermo Fisher Scientific) utilizando las siguientes proporciones:

	PCR	Plásmido
Reactivo	Cantidad (μl)	Cantidad (μl)
<i>HindIII</i>	1.0	1.0
Buffer (10X)	2.0	2.5
DNA	17.0 (~2.0 μg)	20.5 (~1.5 μg)
H₂O	-	1.0
Total	20.0	25.0

Las reacciones se incubaron a 37°C/2 hrs

El ADN de las reacciones se precipitó con glucógeno; para esto se añadieron 700 μl de etanol absoluto y 20 μg de glucógeno (Sigma Aldrich), se incubó a -80°C/15min, luego los tubos se centrifugaron a 12,000 rpm/15 min, se desechó el sobrenadante, se dejaron secar las pastillas y se resuspendieron con agua grado biología molecular, para luego realizar la segunda reacción con la enzima *NcoI* (Thermo Fisher Scientific) con las siguientes cantidades:

	PCR	Plásmido
Reactivo	Cantidad (μl)	Cantidad (μl)
<i>NcoI</i>	1	1.0
Buffer 10X	2.5	3.0
DNA	20.0 (~2.0 μg)	25.0 (~1.5 μg)
H₂O	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, digeridos y purificados se ligaron con la T4 ligasa (Thermo Fisher Scientific) utilizando las siguientes cantidades:

Reactivo	Cantidad (μl)
----------	---------------

T4 ligasa	0.3
Buffer 10X	1.0
PCR	3.0 (~30 ng)
Vector	3.0 (~20 ng)
H₂O	2.7
Total	10.0

Las reacciones se incubaron a 23°C/30min.

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)	0.6
Oligonucleótido reverso (pBADRV)	0.6
H₂O	6.3
Total	15.0

Posteriormente se picaron las colonias candidatas al azar y se replicaron en una placa conteniendo agar LB con ampicilina, el resto de la colonia se inoculó en el tubo con la reacción de PCR. Las condiciones de PCR fueron las descritas 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. Para caracterizar si RS14140 se expresaba correctamente y se encontraba en fase con las 6 histidinas, las construcciones candidatas de la clonación fueron transformados en BL21(DE3), las cepas con los plásmidos fueron cultivados en medio LB/37°C hasta alcanzar una D.O.₆₀₀= 0.4, se agregó 0.2% de arabinosa y se dejó incubar por 4 horas más. Las células fueron lisadas por sonicación y el extracto total fue procesado para western

blot usando la sonda His Probe HRP (Thermo Fisher Scientific), para identificar la etiqueta de histidinas. Finalmente, se seleccionó una construcción que expresó la proteína del tamaño esperado y que se sintetiza en fase con las 6 histidinas, la región clonada fue secuenciada por el método de Sanger para verificar que no portara mutaciones.

6.6 Extracción y purificación de ADN

6.6.1 Extracción de ADNg y plásmido por kit

La extracción de ADNg se realizó con el kit “Universal Quick-DNA MiniPrep kit” (ZYMO RESEARCH). Se realizó un cultivo de toda la noche de EPEC WT en 5 ml de medio LB con estreptomicina, las células se concentraron a 13,000 rpm/1 min y a la pastilla se le agregaron 400 µl de buffer de lisis vortexeando por 6 segundos, se dejó incubar a TA por 10 minutos. El lisado se transfirió a una columna insertada en su tubo colector y se centrifugó a 13,000 rpm/1 min, se desechó el contenido del tubo, posteriormente se agregaron 200 µl de buffer de pre-lavado a la columna, se centrifugó nuevamente y se desechó el contenido del tubo. La columna se lavó con 500 µl de buffer de lavado, se centrifugó en las mismas condiciones y finalmente se pasó a un tubo de 1.5 ml, se agregaron 100 µl de buffer de elución a la matriz de la columna, se incubó por 5 min a TA y se centrifugó en las condiciones anteriores. El ADNg se almacenó a -20°C hasta su uso.

La extracción de ADN plasmídico se realizó con el kit “Zyppy Plasmid Miniprep kit” (ZYMO RESEARCH). Se realizó un cultivo de toda la noche de la cepa de *E. coli* DH5α + pBAD en 5 ml de medio LB con ampicilina. Las células se concentraron a 13,000 rpm/1 min y a la pastilla se le agregaron 100 µl de buffer de lisis 7x (color azul), se resuspendieron las células invirtiendo el tubo 6 veces y se dejó incubar a TA durante 2 min. Una vez que se lisaron las células, se agregaron 350 µl de buffer de neutralización (color amarillo) y se mezcló por inversión hasta que la mezcla viró a color amarillo y se formó un precipitado. Posteriormente, se centrifugó a 13,000 rpm/2 min, el sobrenadante se transfirió a una columna insertada en un tubo colector y se centrifugó a 13,000 rpm/ 1 min; el contenido del tubo colector se desechó y se agregaron 200 µl de buffer de lavado (Endo), se centrifugó nuevamente y se

desechó el líquido del tubo colector. La columna se lavó con 400 µl de buffer de lavado (Zyppy), se centrifugó en las condiciones anteriores, se transfirió a un tubo de 1.5 ml y se agregaron 50 µl de buffer de elución a la matriz de la columna dejando incubar 2 minutos a TA. Finalmente se centrifugó a 13,000 rpm/1 min y el ADN plasmídico se almacenó a -20°C hasta su uso.

6.6.2 Extracción de plásmido por lisis alcalina

Un cultivo bacteriano de 5 ml de toda la noche en medio LB fue concentrado por centrifugación a 12,000 rpm/1 min. La pastilla celular fue resuspendida en 200 µl de solución Birnie I (10mM EDTA, 25mM 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 5M, 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.

6.6.3 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 vortexó 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.

6.6.4 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.

6.7 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 (100mM CaCl₂, 5mM 6H₂OMgCl₂, 5mM Tris-HCl pH 7.0), se centrifugó nuevamente, se desechó el buffer, 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 buffer y se les agregaron 2 ml de buffer más 500 µl de glicerol. Finalmente, se almacenaron a -80°C hasta su uso.

6.8 Transformación por choque térmico.

Se agregaron 5 µl de plásmido (~0.5 µg) o la reacción de ligación a 50 µl de células competentes y se incubaron en hielo por 30 min. Posteriormente se procedió a dar el “choque térmico” incubando a 42°C por 2 min y luego en hielo por 5 minutos. Después se agregaron 200 µl de medio SOC (0.5% extracto de levadura, 2% triptona, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM MgSO₄, 0.4% glucosa) y se incubaron a

37°C/220 rpm por 1 h. Finalmente, se sembraron en una placa de LB adicionado con ampicilina y se incubaron en la estufa a 37°C toda la noche.

6.9 Western blot

Se obtuvieron extractos totales por sonicación a partir de cultivos en las condiciones deseadas y se corrieron en un SDS-PAGE. Posteriormente, se transfirieron a una membrana de PVDF la cual previamente fue tratada en metanol durante 15 seg, posteriormente en agua por 15 seg y finalmente, a la par que el gel, en buffer de transferencia (48mM Tris-base, 39 mM glicina, 0.045% SDS, 20% metanol) por 20 min. La transferencia se realizó en una cámara de transferencia semi-seca “TRANS-BLOT” (BIO RAD) en la que se colocó un filtro de celulosa humedecido con buffer de transferencia, encima se colocó la membrana de PVDF, luego el gel y finalmente otro filtro. La transferencia se realizó a 15 volts por 45 min. Una vez terminada la transferencia, la membrana se tiñó con rojo de ponceau (Thermo Fisher Scientific) diluido al 0.1% en ácido acético al 5% para corroborar que la transferencia se haya realizado exitosamente e identificar el marcador de peso molecular en la membrana. El colorante se removió con PBST (PBS 1X, 0.5M NaCl 0.1% Tween) y la membrana se bloqueó con leche baja en grasa (Svelty) disuelta al 10% con PBST por 2 h. Pasado el tiempo, la membrana se lavó con PBST y se incubó con el anticuerpo primario o la sonda His-Probe HRP a las siguientes diluciones:

His-Probe HRP	1:5000	(Thermo Fisher Scientific)
Anti-BfpA	1:10000	(Jorge Alberto Girón, Universidad de Virginia EUA)
Anti-EspA	1:10000	(Jorge Alberto Girón, Universidad de Virginia EUA)
Anti-GroEL	1:80000	(José Luis Puente IBT-UNAM)

Posteriormente se realizaron tres lavados de 10 min con PBST y luego se incubó por 1 h con el anticuerpo secundario Anti-Conejo diluido 1:20000 (Thermo Fisher Scientific) acoplado a peroxidasa de rábano (la sonda His-Probe HRP ya tiene acoplada la peroxidasa), pasado el tiempo se dieron otros tres lavados con

PBST y se agregaron los reactivos “Luminol enhancer solution” y “Peroxide solution” (Thermo Fisher Scientific) en proporción 1:1 por dos min y finalmente se reveló en una película “Kodak X-Omat LS film” (Sigma Aldrich).

6.10 Perfil de proteínas secretadas

Se crecieron las cepas de EPEC en medio DMEM con antibiótico e induciendo con arabinosa según el caso. Posteriormente, las células se dejaron crecer a 37°C/220 rpm hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ de 1.2, luego se tomaron tres alícuotas de cada cultivo en tubos de 1.5 ml, se centrifugaron a 13,300 rpm/5 min/TA y se tomaron 1.3 ml del sobrenadante en tubos nuevos a los cuales se les agregaron 145 µl de ácido tricloroacético al 98% y se dejaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente se centrifugaron a 13,300 rpm/30min/TA. Posteriormente se extrajo todo el medio con una jeringa y se dejaron secar las pastillas por 40 min a TA. Una vez secas, se les agregaron 10 µl buffer Laemmli (50% Glicerol, 10% β-mercaptoetanol, 4% SDS, 0.125M Tris-HCl pH 6.8, 0.004% bromofenol) y 3-4 µl de TRIS pH 11 para neutralizar el pH ácido. Finalmente se juntaron las tres alícuotas de cada cultivo, se corrieron en un SDS-PAGE y se tiñeron con azul de coomassie.

6.11 SDS-PAGE

A las muestras proteicas (extractos totales generados por sonicación o proteínas secretadas) se les agregó buffer Laemmli, luego se hirvieron por 10 min. Posteriormente se cargaron en un gel de acrilamida bis al 15% embebido en buffer Tris-Glicina-SDS (0.025M Tris, 0.192M glicina, 0.1% SDS). La electroforesis se realizó a 15 mA por 2 h.

6.12 Extracción de ARN

A partir de un cultivo en DMEM o LB se tomó una alícuota de 10 ml a D.O.₆₀₀ = 1.0 (a DO₆₀₀ menores, se ajustó el volumen), luego se centrifugó a 6000 rpm/10 min/4°C, se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500 µl de “Purezol RNA isolation reagent” (Bio Rad) dejando incubar por 5 min a TA. Luego se adicionaron 200 µl de cloroformo dejando 5 min a TA mezclando constantemente. Una vez pasado ese tiempo, se centrifugó a 12,000 rpm/15 min/TA, se transfirió el

sobrenadante a un tubo nuevo, se le agregaron 500 µl de isopropanol, se mezcló y se dejó 5 min/TA. Posteriormente, se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones, se desechó el sobrenadante y a la pastilla se le dieron dos lavados con 1 ml de etanol al 80%. La pastilla se dejó secar por 20 min a 37°C y se resuspendió con agua grado biología molecular incubando a 55°C/30 min vortexeando constantemente. Finalmente, el ARN se cuantificó en un nanofotómetro (IMPLEN) y se almacenó a -80°C hasta su uso.

6.13 RT-PCR punto final y cuantitativa

Se trataron 10 µg de cada muestra de ARN con “DNase I RNase-free” (Thermo Fisher Scientific) en las siguientes condiciones:

Reactivo	Cantidad
DNase I	5.0 µl
Buffer10x	1x en el volumen final
ARN	10.0 µg
H₂O	para completar el volumen final
Condiciones de reacción	
37°C	3 hrs
70°C	15 min

Posteriormente, las muestras se cuantificaron nuevamente para luego proceder con la RT-PCR usando el kit “Revert Aid First Strand cDNA Synthesis” (Thermo Fisher Scientific) que usa hexámeros al azar. Las reacciones se realizaron tal como se muestra a continuación.

Reactivo	Cantidad µl
RT	1.0
Buffer 5x	4.0
Inhibidor de ARNasa	1.0

dNTP's	2.0
Oligos random	1.0
ARN	Para 1 µg
H₂O	Para 20 µl

Condiciones de reacción

25°C	5min
42°C	60min
70°C	10min

El ADNc se usó para PCR punto final usando las condiciones de la Tabla 4. Las reacciones se prepararon como se muestra a continuación:

Reactivo	Cantidad (µl)
Green PCR Master Mix 2X	12.5
Oligonucleótido delantero	0.75
Oligonucleótido reverso	0.75
H₂O	10
ADNc	1 (0.1 µg)
Total	25.0

También se realizó PCR en tiempo real usando la “Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X)” (Thermo Fishern Scientific), preparando las reacciones tal como se muestra a continuación:

Reactivo	Cantidad (μl)
SYBR Green Master mix 2x	5.0
Oligonucleótido delantero	0.3
Oligonucleótido reverso	0.3
H ₂ O	2.4
ADNc diluido 1:10	2.0 (0.02 μg)
Total	10.0

Las reacciones de PCR en tiempo real se llevaron a cabo en un termociclador “Light Cycler 480” (Roche) y los datos se analizaron en el programa del equipo. Los experimentos se realizaron por duplicado.

6.14 Análisis bioinformáticos

Las secuencias fueron obtenidas del “Gene Bank”. Para calcular el peso molecular se usó el programa “ExPASy Prot Param Tool” (<https://web.expasy.org/protparam/>), para predecir la estructura secundaria y terciaria se utilizó el programa Robetta (<http://new.rosetta.org/>). Los alineamientos se realizaron en Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) y EMBOSS Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/). El logo se generó en WebLogo (<https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>). La predicción de promotores y sitios de unión de factores de transcripción se realizó usando el programa en línea BPPROM (www.softberry.com/berry.phtml?topic=bpprom&group=programs&subgroup=gfindb). La cuantificación de las bandas de RT-PCR punto final y Western Blot se realizaron con ImageJ.

6.15 Estadística

Las gráficas y análisis estadísticos se realizaron en “GraphPad Prism 8.1.1” (GraphPad Software, Inc., CA, USA), la diferencia significativa se calculó usando ANOVA con el test de comparación múltiple de “Dunnett” considerando diferencia significativa $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis bioinformático del *orfRS14140*

7.1.1 Organización y ubicación del *orfRS14140* en el cromosoma de EPEC

Para iniciar con la caracterización de esta proteína tipo ANR en EPEC, se analizó la secuencia del *orfRS14140* ubicado en el cromosoma de EPEC entre los nucleótidos 2721409-2721642 y etiquetado con la clave NC_011601.1 en la base de datos del NCBI (National Center of Biotecnology Information). Este gen tiene un tamaño de 234 pb y se encuentra en la misma orientación con otros 2 genes: *orfRS14135* (645 pb) y *orfRS14145* (192 pb) con los que aparentemente podría estar formando un operón (Figura 9A). Los 3 genes se encuentran junto a secuencias de un profago interrumpiendo el operón *eut* relacionado con el metabolismo del etanolamina (Figura 9A) (Roof and Roth, 1992) que al parecer no es funcional en EPEC (Luzader et al., 2013). A 7363 pb río arriba del *orfRS14140* se encuentra el gen *eutR* que codifica para la proteína del mismo nombre, la información en esta base de datos indica que es un regulador transcripcional perteneciente a la familia AraC/XylS (Figura 8A). La función de esta proteína no ha sido descrita en EPEC pero se sabe que en EHEC regula a los genes de virulencia de la isla LEE a través de la activación de *ler* (Luzader et al., 2013).

Al mismo tiempo, se realizó una búsqueda en el NCBI con la finalidad de conocer la conservación de la organización genética del locus donde se encuentra este ORF en otros patógenos genéticamente relacionados, los resultados de este análisis indican que la organización y orientación genética del *orfRS14140* en arreglo con los 2 genes putativos sin caracterizar es similar a la encontrada en las enterobacterias *Citrobacter rodentium* ICC168 (Figura 9B) y *Salmonella entérica* *Oranienburg* CFSAN039531 (Figura 9C). De manera interesante, dicha región también se encuentra flanqueada por restos de profago en estas bacterias (Figura 9).

7.1.2 Búsqueda de posibles promotores del *orfRS14140*

Se realizó también la búsqueda de promotores 150 pb río arriba de *orfRS14135*, *orfRS14140* y *orfRS14145*. Para esto, las secuencias obtenidas del NCBI se

analizaron mediante el programa BPROM, esta herramienta bioinformática identifica sitios potenciales de inicio de transcripción regulados por el factor sigma 70 (uno de los más comunes en *E. coli*) con un 80% de precisión y especificidad (Solovyev and Salamov, 2011). Los resultados obtenidos que se muestran en la Figura 10 indican la presencia de 2 posibles promotores, en orden de mayor valor de predicción son los siguientes: el primero con la “caja -10” en la posición -26 (“score” 44) y la “caja -35” (“score” 1) en la posición -52 respecto del ATG del *orfRS14135*; el segundo promotor se ubica con la caja -10 en la posición -58 (“score” 30) y la caja -35 (“score” 38) en la base -84 respecto del ATG del *orfRS14140*. En la secuencia analizada río arriba del *orfRS14145* no se encontraron promotores, por lo que se amplió la búsqueda a 250 pb río arriba de dicho gen. De esta forma, se encontró un promotor con la caja -10 en la posición -196 (“score” 23) y la caja -35 (“score” 49) en la base -222 respecto del ATG. Interesantemente, río arriba del *orfRS14135* se encontraron sitios putativos para la unión de factores de la transcripción (Tabla 5), los cuales se buscaron en la base de datos del NCBI para verificar si estos se encuentran en EPEC. Estos son: ArgR2 (represor de arginina 2) que reprime el metabolismo de la arginina aunque fue encontrado en cepas de *E. coli*, no se hallaron homólogos en EPEC; Crp (proteína receptora de AMPc) es un regulador transcripcional global activado por AMPc el cual si se encuentra en EPEC; GlpR (represor glicerol-sn-3 fosfato) reprime el regulón glicerol-sn-3 fosfato que si se encuentra en EPEC; PhoB es el regulador transcripcional en respuesta a fosfato encontrado en EPEC y H-NS la “proteína estructuradora del nucleóide termo-estable” es una proteína asociada a nucleótido que actúa como represor transcripcional, generalmente asociado a la supresión de genes adquiridos horizontalmente siendo un represor importante en EPEC (Porter et al., 2004).

Estos datos sugieren 2 posibles escenarios: 1) el gen putativo *RS14140* podría formar un operón con *RS14135* y *RS14145*, debido a la ubicación del promotor con mayor valor predictivo y, 2) cada ORF podría formar unidades transcripcionales independientes por la predicción de 3 promotores. Tales datos tienen que ser corroborados de manera experimental.

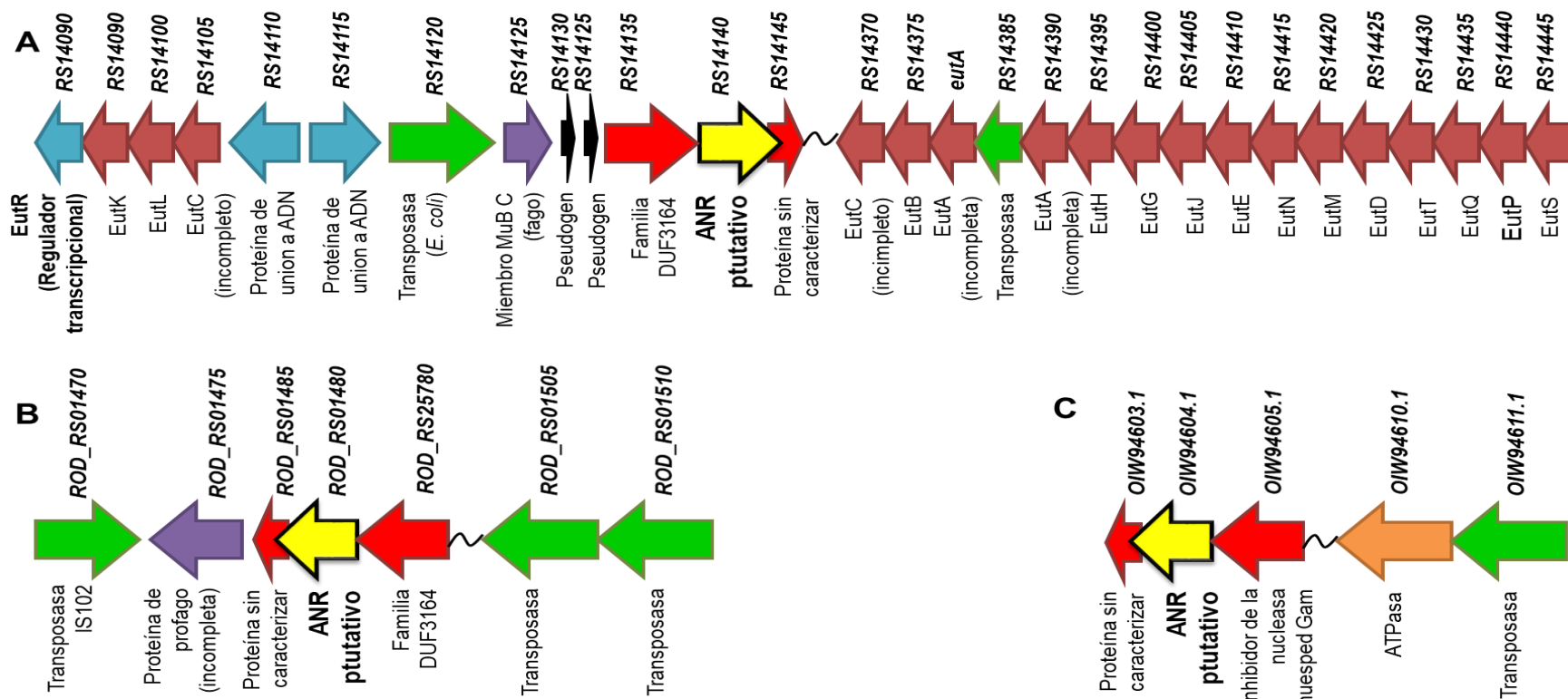


Figura 9. Ubicación y organización genética del *orfRS14140* en el genoma de EPEC, *Citrobacter rodentium* y *Salmonella enterica*.

A) Organización del *orfRS14140* de EPEC, B) ROD_RS01480 de *C. rodentium* ICC168 y C) OIW94610.1 de *S. enterica* Oranienburg CFSAN039531. De color amarillo están representados los genes que codifican a los miembros de la familia ANR y de rojo los genes con los que aparentemente forma un operón río arriba y río abajo. De color verde se resaltan las transposasas, en morado proteínas fágicas, en azul genes que codifican proteínas de unión a ADN resaltando en EPEC la presencia de RS14090 del operón *eut* (que codifica EutR), en color vino todos los genes de dicho operón y en negro pseudogenes

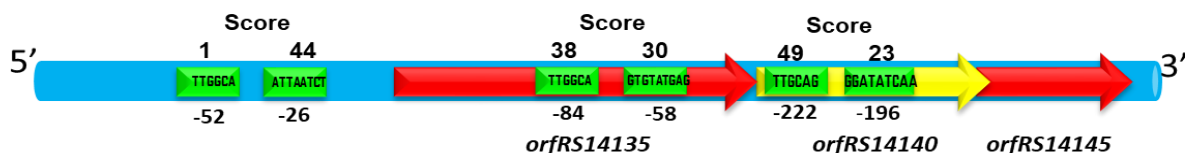


Figura 10. Esquema de la predicción de promotores del *orfRS14140* y *orfRS14135*.

Con la flecha amarilla se representa el gen *orfRS14140* y con flechas rojas *orfRS14135* y *orfRS14145*. Río arriba de cada gen se marcan con recuadros verdes las posibles cajas -10 y -35 correspondientes a cada promotor predicho por Bprom con sus secuencias. Debajo de cada recuadro su posición respecto al ATG y arriba el "score" de cada predicción. Esquema realizado con base en los datos obtenidos de BPROM.

Tabla 5. Posibles sitios de unión de factores transcripción encontrados río arriba del *orfRS14140*

Factor de transcripción	Posición	Secuencia	Score
ArgR2	-67	TTTATTTT	7
CRP	-32	ACACACAT	12
GlpR	-31	CACACATT	6
PhoB	-24	TAATCTGT	7
H-NS	-2	TAATTTAA	9
PhoB	+1	TTTAATTA	11

7.1.3 Predicción de estructura secundaria y terciaria de RS14140

Utilizando el programa "ExPASy ProtParam Tool" se calculó el peso molecular de la proteína codificada por *orfRS14140* (77 aminoácidos) dando un resultado de 8.91 kDa. También se realizó el análisis para predecir la estructura secundaria *de novo*, así como el modelo mediante comparaciones de la estructura terciaria usando el programa en línea Robetta el cual indicó que la proteína tipo ANR de EPEC está formada por tres hélices alfa principales y una cuarta hélice alfa pequeña, la presencia de ésta última varía de acuerdo con los diferentes algoritmos usados por Robetta (Figura 11A). La predicción de la estructura terciaria indicó la presencia de 3 dominios formados por las hélices alfa principales (Figura 11B), dicha estructura es muy similar a la obtenida con el mismo programa, pero de Aar de EAEC (Figura 11C), a pesar de que sólo conservan entre ellas el 37% de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos.

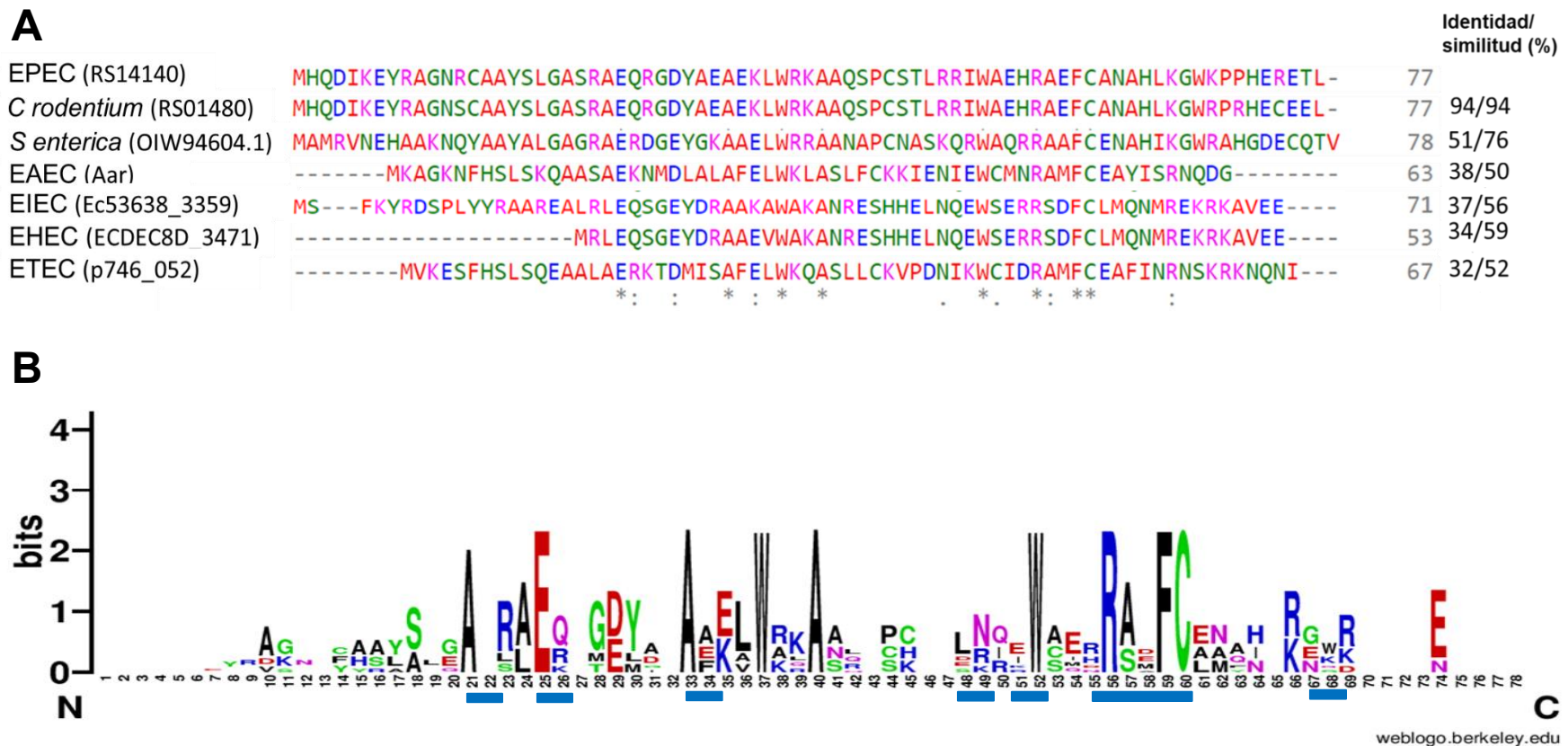


Figura 13. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de RS14140 con miembros de la familia ANR de enteropatógenos.

A. Alineamiento de RS14140 con proteínas tipo ANR de enteropatógenos realizado con el programa Clustal W. Entre paréntesis se encuentra el nombre de cada proteína y delante de cada secuencia se indica el % de identidad y similitud. Los asteriscos indican identidad y los puntos similitud. **B.** Análisis de los aminoácidos más conservados entre las proteínas de la familia ANR analizadas en **A**, utilizando el programa Weblogo. Se indican con líneas azules los aminoácidos esenciales para la función de Aar (Santiago et al., 2016). Los organismos analizados fueron: *E. coli* O127:H6 (EPEC), *C. rodentium* ICC168, *S. enterica* CFSAN039531, *E. coli* enteroagregativa O42 (EAEC), *E. coli* 53638 (EIEC), *E. coli* DEC8D (EHEC) y *E. coli* 1392/75 (ETEC).

7.2 Expresión del *orfRS14140* en EPEC WT bajo diferentes condiciones de crecimiento

Uno de los primeros experimentos para demostrar la función de este gen putativo en EPEC fue evaluar su expresión bajo diferentes condiciones de crecimiento. Para esto, la cepa EPEC WT fue cultivada a 37°C en los siguientes medios de cultivo: medio DMEM (condición que favorece la expresión de genes de virulencia), medio LB y DMEM/20 mM sulfato de amonio (condiciones que reprime los genes de virulencia) (Kenny et al., 1997a; Martinez-Laguna et al., 1999; Puente et al., 1996). Se tomaron alícuotas cada hora hasta la fase estacionaria temprana (para los cultivos en DMEM) y cada 30 minutos (para los cultivos en LB). Las muestras se procesaron para extracción de ARN y se realizó RT-PCR punto final de fragmentos de los genes *orfRS14140*, *perA* y *gyrB* (control). Los productos se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se cuantificaron usando el programa ImageJ (Figura 14).

Los resultados indican que cuando EPEC es cultivada en DMEM a 37°C, el *orfRS14140* tiene una expresión relativamente baja que se mantiene constante a lo largo de la curva de crecimiento de la bacteria, mientras que *perA* se expresa en mayor cantidad desde etapas tempranas y a lo largo de toda la curva (Figura 14 A), como ya se ha reportado ampliamente (Martinez-Laguna et al., 1999).

Por otro lado, en medio LB el *orfRS14140* se expresa con una intensidad similar a la observada en DMEM, mientras que la expresión de *perA* fue muy baja comparada a la observada en medio DMEM (Figura 14 B), lo que coincide también con datos reportados previamente (Puente et al., 1996).

De manera interesante, cuando EPEC es cultivada en medio DMEM en presencia de amonio, el *orfRS14140* mostró una expresión alta desde la primera hora de crecimiento y disminuyó gradualmente a lo largo de la curva (Figura 14 C). Contrario a la expresión de *perA* que mostró una expresión basal y un ligero incremento al final de la curva de crecimiento de la bacteria (Figura 14 C), tales datos también coinciden con lo reportado anteriormente (Martinez-Laguna et al., 1999). La expresión de *gyrB* que fue usada como control, no se vio afectada en ninguna de las condiciones evaluadas.

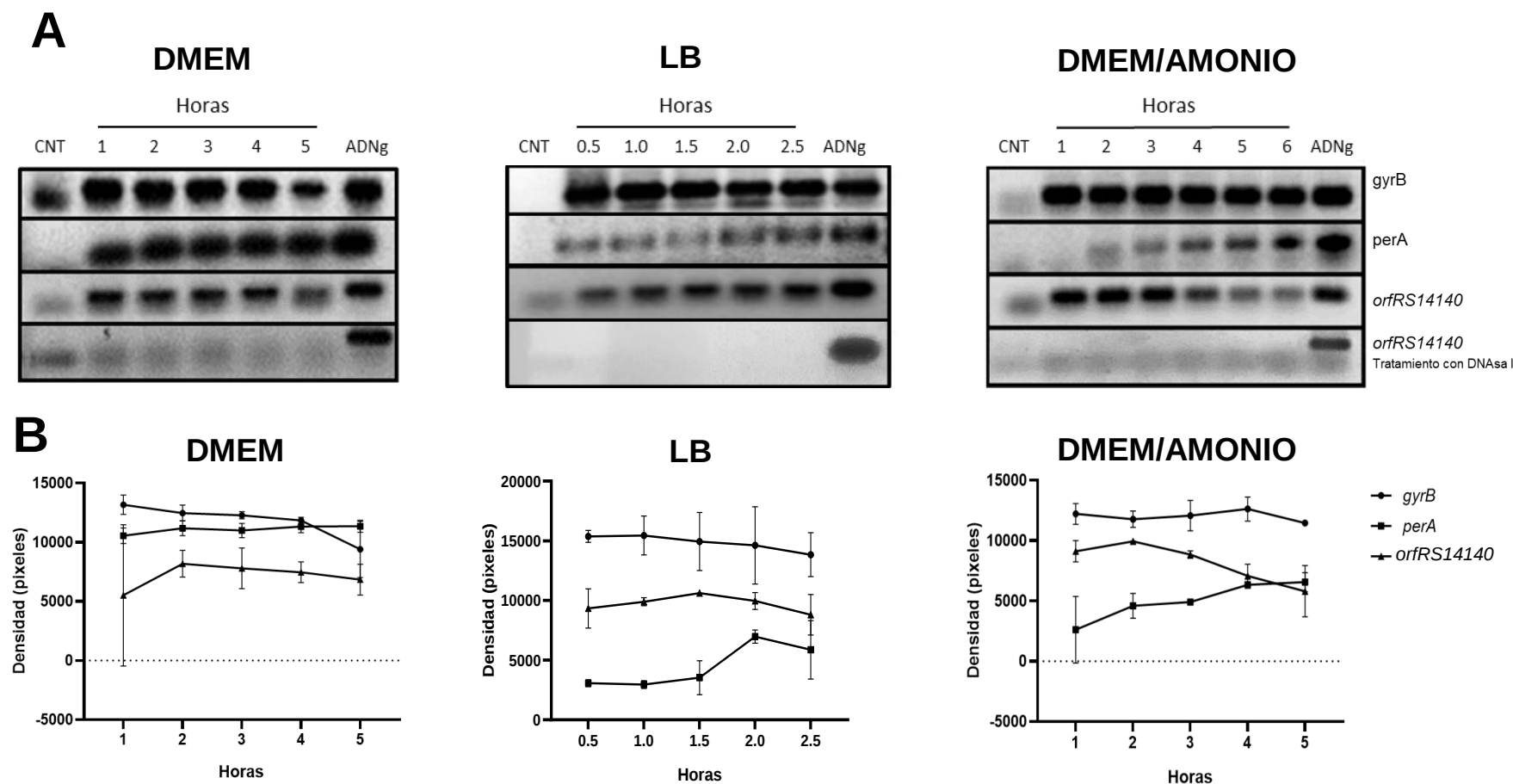


Figura 14. Expresión del *orfRS14140* en diferentes condiciones de crecimiento de EPEC WT.

La cepa de EPEC WT fue cultivada en medio DMEM, LB y DMEM suplementado con 20 Mm de sulfato de amonio a 37°C en agitación, se tomaron alícuotas cada hora (DMEM) o cada media hora (LB). Las muestras se procesaron para extracción de ARN y posteriormente se realizó RT-PCR punto final. **A.** Geles de agarosa representativos teñidos con bromuro de etidio de las RT-PCR punto final de la expresión de *gyrB*, *perA* y *orfRS14140*. En el primer carril se muestran los CNT (Control No Templado), en los carriles siguientes están los productos de las RT-PCR punto final y en el último carril, PCR con ADNg de cada gen evaluado. Como control, se realizó PCR del *orfRS14140* usando ARN tratado con DNasa I como molde. **B.** Gráficas del análisis por densitometría de las bandas de cada gel, usando ImageJ. En el eje de las Y están las unidades de densidad y en el eje de las X las horas de cultivo. Los ensayos se hicieron por duplicado, realizando las gráficas en GraphPad con sus respectivas desviaciones estándar.

7.3 Efecto de la sobreexpresión de RS14140 sobre las proteínas de virulencia de EPEC

Una vez determinado que el *orfRS14140* se está expresando en la bacteria bajo las condiciones de crecimiento analizadas, se evaluó el efecto de su sobreexpresión sobre los genes y proteínas regulados por el activador transcripcional PerA. Para lo cual, el gen estructural *orfRS14140* junto con la secuencia que codifica para 6 histidinas fue amplificado mediante PCR de punto final con los oligos ANREPfw y ANREPrv, que introducen los sitios de restricción *NcoI* y *HindIII*, respectivamente. El producto obtenido fue clonado en el vector pBAD/Myc-HisA y transformado en la cepa DH5 α . Las clonas candidatas se caracterizaron por PCR de colonia y se seleccionó la construcción que tuviera el inserto del tamaño esperado dando el plásmido pANREP. La construcción fue analizada por secuenciación tipo Sanger para verificar que no incluyera mutaciones y para comprobar que la secuencia de RS14140 se encontrara en fase con las secuencias que codifica para las 6 histidinas en su extremo C-terminal.

El pANREP y el vector vacío se transformaron en la cepa *E. coli* BL21 (DE3) para evaluar la expresión de la proteína RS14140-6XH. Analizando extractos proteicos totales mediante western blot usando la sonda His-Probe HRP (Thermo Fisher Scientific), para identificar la etiqueta de histidinas y comprobar la expresión en fase de la proteína RS14140-6XH.

Los resultados obtenidos de este ensayo indican que la traducción de RS14140 se encuentra en fase con las 6 histidinas debido a que se observó una banda del tamaño esperado (9.8 kDa incluyendo la etiqueta de histidinas) y que fue reconocido por la sonda (Figura 15). Dicha banda solo fue identificada cuando se indujo con arabinosa (Figura 15, carriles 4 y 5), mientras que sin inducción o en el carril de la cepa con vector no fue visible (Figura 15, carriles 2 y 3).

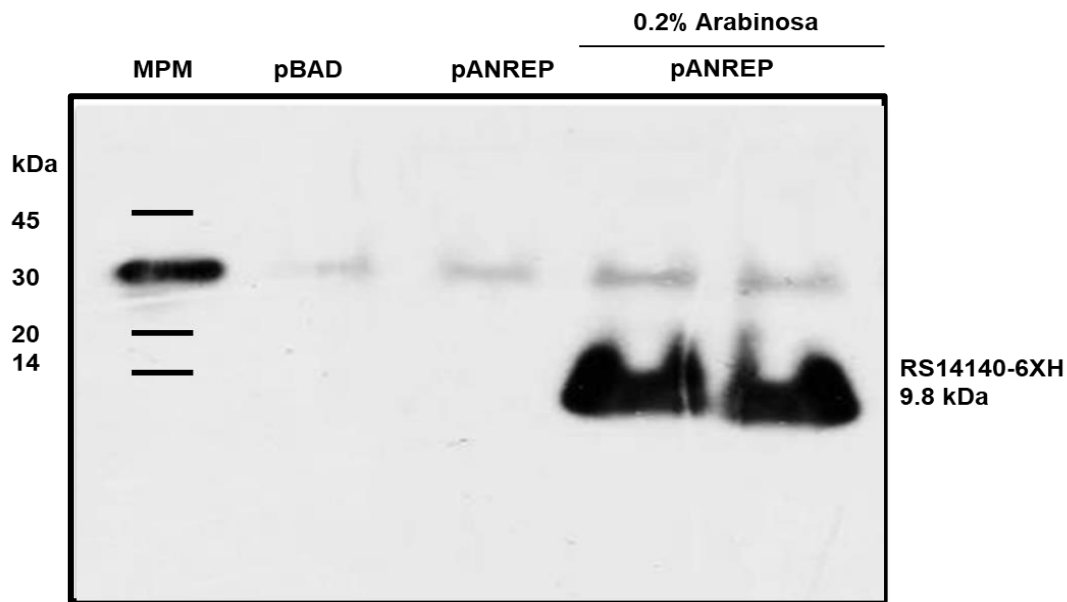


Figura 15. Expresión de RS14140-6XH en BL21 (DE3).

Western Blot de extractos proteicos totales de BL21 (DE3) crecida en medio LB a 220 rpm/5 hrs. La inducción se realizó a partir de la primera hora de crecimiento. Los extractos fueron separados mediante SDS-PAGE al 15% y transferidos a una membrana de PVDF. La membrana fue incubada con la sonda His-Probe HRP para detectar la etiqueta de histidinas. De izquierda a derecha se encuentran: marcador de peso molecular, BL21 (DE3) + pBAD/Myc-HisA, BL21 (DE3) + ANREP sin inducir y BL21 (DE3) + pANREP inducida con 0.2% de arabinosa. El peso de RS14140-6XH es de 9.8 kDa. La sonda hibrida con la proteína de 30 kDa del MPM y proteínas inespecíficas del mismo peso en

El siguiente ensayo fue evaluar el efecto de la sobreexpresión de RS14140 sobre los genes de virulencia regulados por PerA, para lo cual el pANREP se transformó en la cepa EPEC WT. La cepa con plásmido primero fue analizada mediante una curva de crecimiento durante 6 horas en medio DMEM a 37°C, para descartar que el RS14140-6XH en multicopia ejerciera un efecto inespecífico sobre el metabolismo de EPEC. La construcción pANREP no afectó el crecimiento de EPEC WT en las condiciones analizadas debido a que la curva de crecimiento fue similar a las mostradas por la cepa EPEC WT (Figura 16).

Posteriormente, las cepas EPEC WT y EPEC + pANREP fueron crecidas en medio DMEM a 37°C en agitación, se agregaron 0.002%, 0.02% y 0.2% de arabinosa para inducir la sobreexpresión de RS14140-6XH y se tomaron alícuotas a D.O.₆₀₀ = 1.0 y

1.2, para evaluar el efecto sobre BfpA y EspA en extractos totales y sobre el perfil de proteínas secretadas de EPEC. Los resultados obtenidos indican que la sobreexpresión de RS14140-6XH con 0.2% de arabinosa disminuye la secreción de las proteínas EspC, EspB/D y EspA (Figura 17, carril 5). Mientras que en el western blot de extractos totales se observó que la expresión de BfpA disminuyó drásticamente cuando RS14140-6XH es inducida desde 0.02% e inhibida en presencia de 0.2% de arabinosa (Figura 18). La expresión de EspA también es reprimida por RS14140-6XH en presencia de 0.2% de arabinosa (Figura 18). Este efecto de represión de RS14140 solo afectó específicamente a los genes de virulencia analizados debido a que la expresión de la proteína GroEL, utilizada como control, no fue afectada (Figura 18). En este ensayo también se detectó a RS14140-6XH y solo fue visible cuando se indujo con 0.02 y 0.2% de arabinosa (Figura 18).

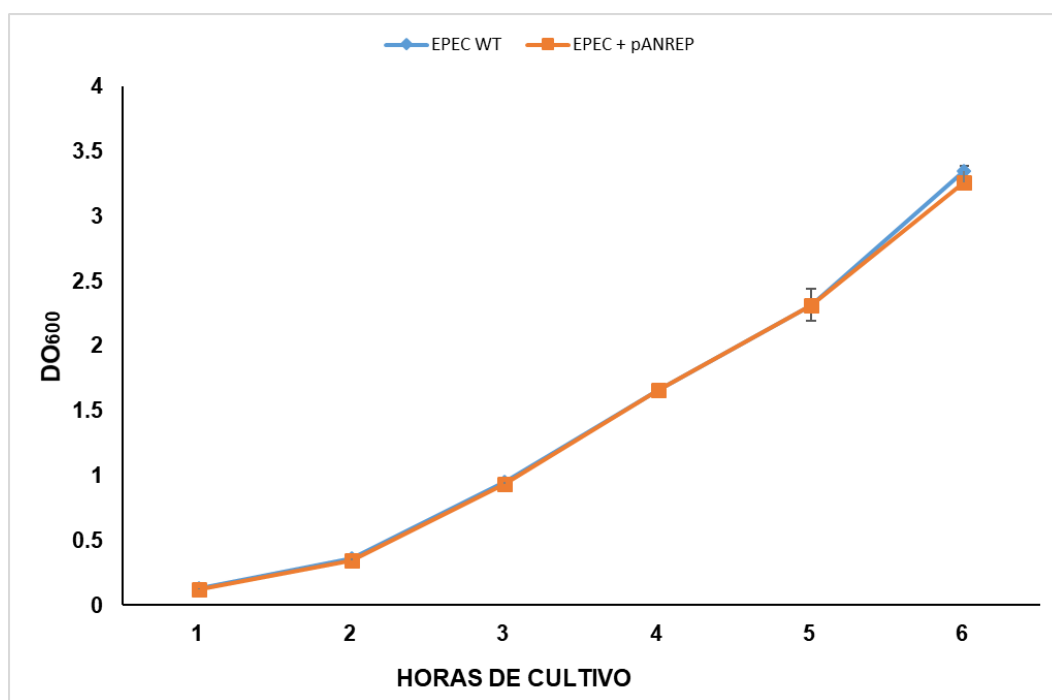


Figura 16. Curva de crecimiento de EPEC WT y EPEC/pANREP

Las cepas se crecieron en medio DMEM a 220 rpm/6 hrs, tomando una alícuota cada hora y midiendo su DO₆₀₀. Las curvas se realizaron por duplicado.

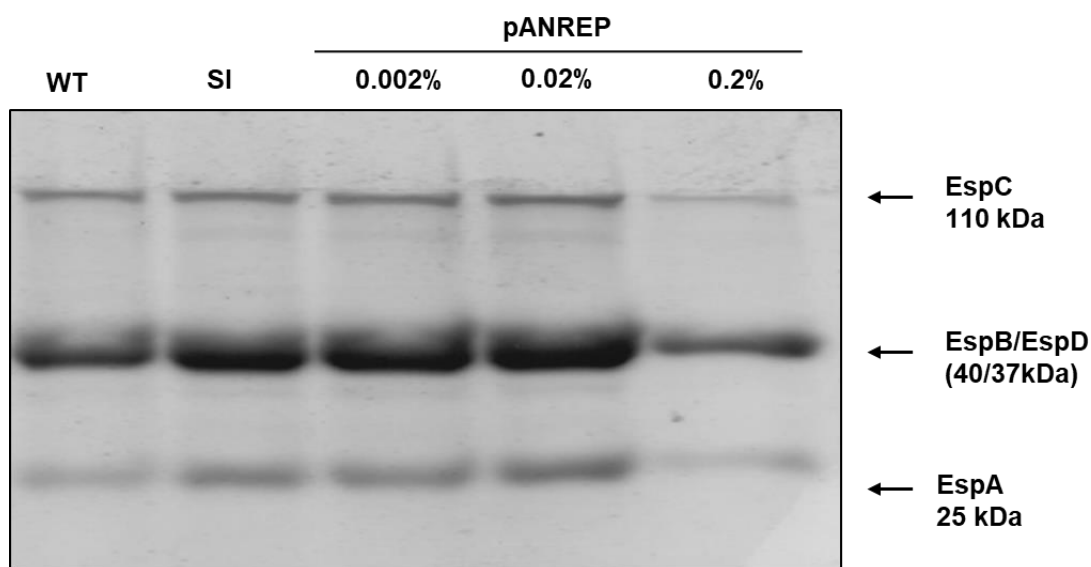


Figura 17. Efecto de RS14140 sobre el perfil de proteínas secretadas de EPEC.

Perfil de proteínas secretadas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% y teñido con azul de Coomassie. De izquierda a derecha se encuentran: EPEC WT, EPEC + pANREP sin inducir (SI) e inducida con 0.002%, 0.02% y 0.2% de arabinosa. Se indica con una flecha a EspC (110kDa), seguido por EspB/EspD (40/ 37 kDa) y EspA (25kDa). Las muestras fueron tomadas a D.O.₆₀₀= 1.2.

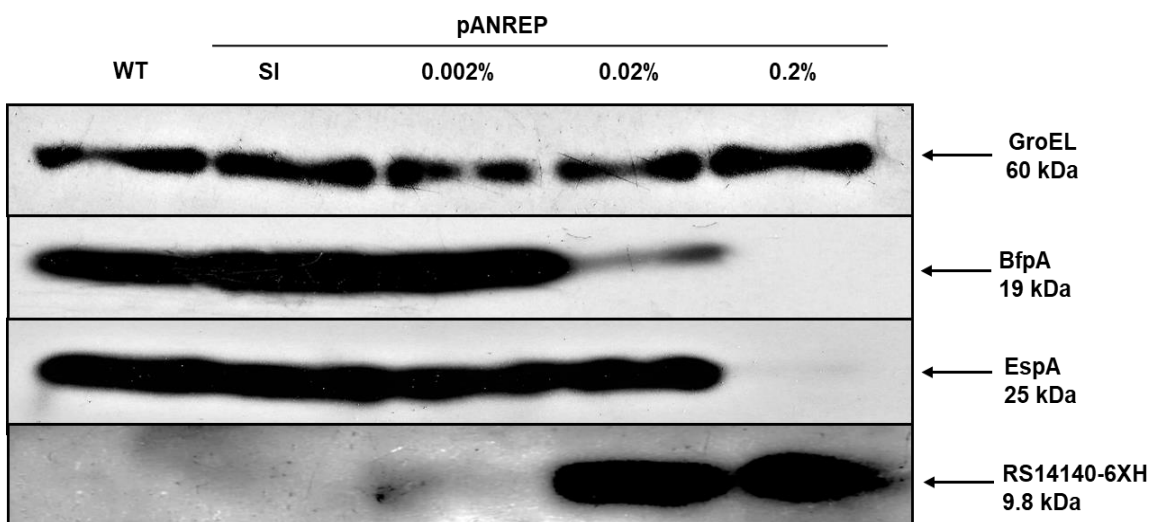


Figura 18. Efecto de RS14140 sobre la expresión de BfpA y EspA en EPEC.

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

7.5 Efecto de RS14140 sobre la expresión de genes regulados por PerA.

Una vez determinado el efecto que ejerce la sobreexpresión de RS14140 sobre el perfil de proteínas secretadas, así como sobre BfpA y EspA; se evaluó el efecto de esta proteína mediante ensayos de RT-qPCR. Para esto, las cepas de EPEC WT+ pBAD/Myc-HisA y EPEC + pANREP fueron cultivadas en 50 ml de medio DMEM a 37°C en agitación, en presencia de 0.002%, 0.02% y 0.2% de arabinosa o sin inductor; hasta alcanzar una D.O.₆₀₀ = 1.0. Las células fueron procesadas para extracción de ARN y RT-qPCR. Se analizó la expresión de *orfRS14140*, *perA* y *perC* (operón *per*), *bfpA* (operón *bfp*), *espB* y *escJ* (*LEE4* y *LEE2*, respectivamente) y el gen *gyrB* como control. Los resultados de expresión relativa muestran que cuando RS14140-6XH es inducida con 0.002% de arabinosa la transcripción de *perA* se redujo en un 25.7%, *perC* 22.6%, *espB* 39% y *escJ* 42.6% (Figura 19); cuando es inducida con 0.02% de arabinosa la expresión de *perA* disminuyó 36.9%, *perC* 48.45%, *bfpA* 74.2%, *espB* 67% y *escJ* 34.4% (Figura 19, barra 4); al inducir RS14140 con 0.2% de arabinosa la transcripción de *perA* disminuyó 78.6%, *perC* 81.8%, *bfpA* 95.7%, *espB* 92.9% y *escJ* 82.2% (Figura 19). Estos porcentajes se calcularon tomando como base la expresión relativa de cada gen en EPEC WT (Figura 19). Se muestra también el incremento de la expresión relativa de *RS14140* en presencia de diferentes concentraciones de arabinosa (Figura 19, *orfRS14140*). Los resultados obtenidos indican que RS14140 ejerce un efecto represor a nivel transcripcional sobre los genes regulados directamente por PerA tanto los codificados en el plásmido EAF como los que regula indirectamente en la isla LEE.

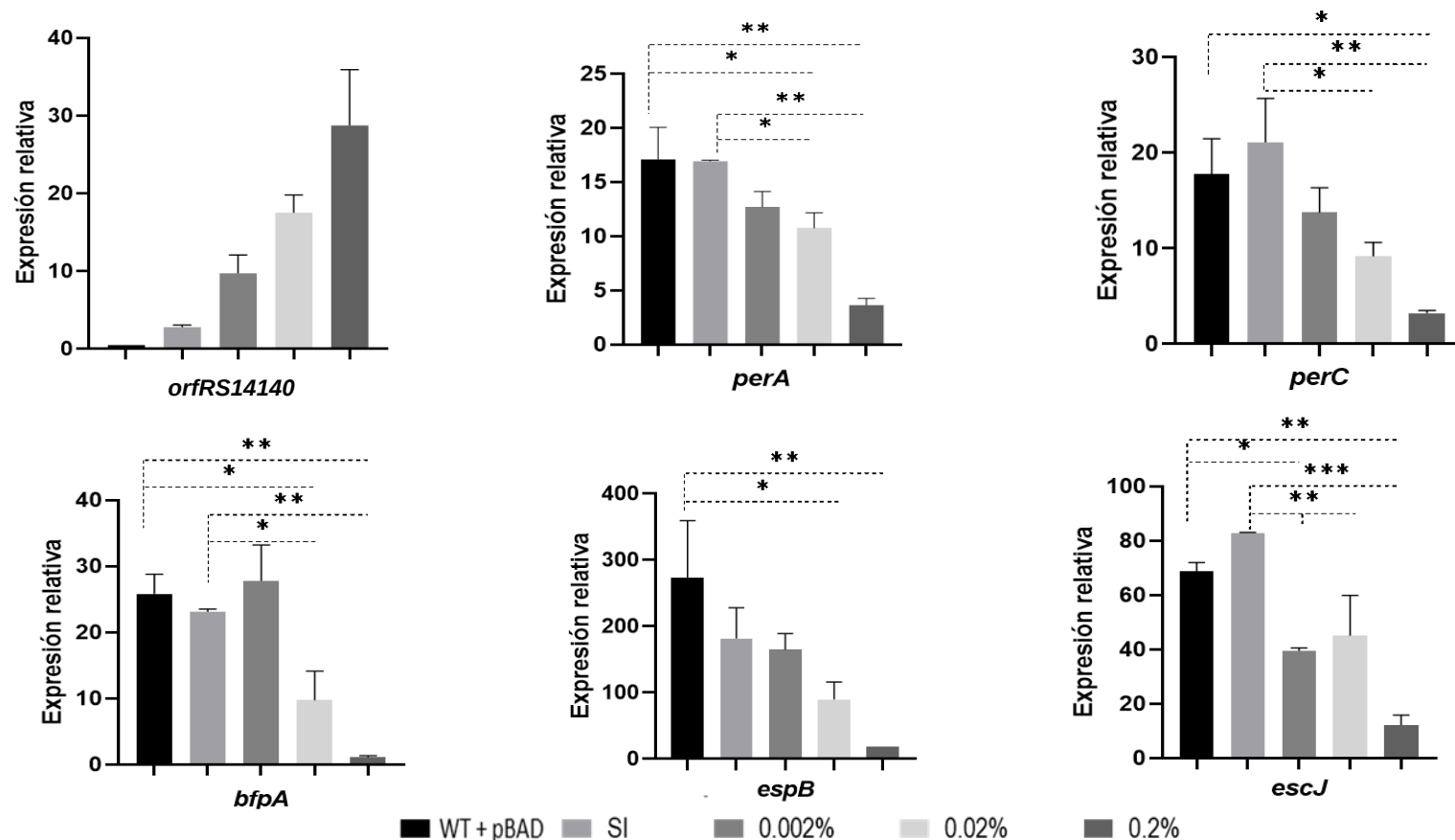


Figura 19. Efecto de RS14140 sobre la expresión de genes regulados por PerA en EPEC.

Expresión relativa del *orfRS14140*, *perA*, *perC*, *bfpA*, *espB* y *escJ* en EPEC WT + pBAD/Myc-HisA y EPEC/pANREP sin inducir e inducida con 0.002%, 0.02% y 0.2% de arabinosa. La expresión relativa se calculó usando la expresión de *gyrB* como referencia. Los asteriscos señalan la diferencia significativa calculada por ANOVA (***P<0.0002; **P<0.0021; *P<0.5). Muestras tomadas a DO₆₀₀ = 1.0 en medio DM. Los ensayos se realizaron por duplicado.

8. DISCUSIÓN.

La familia de reguladores transcripcionales AraC/XylS están ampliamente distribuidas tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivas. Estas proteínas son de gran relevancia debido que regulan una gran diversidad de genes involucrados en funciones importantes como metabolismo, respuesta a estrés y virulencia (Gallegos et al., 1997). Por tal motivo su expresión está fuertemente regulada para ser activadas en el momento adecuado y así asegurar una colonización exitosa al hospedero. Si se considera específicamente a EPEC (el modelo de estudio en este trabajo) se sabe que PerA (principal miembro de la familia AraC/XylS en esta bacteria) se expresa bajo determinadas condiciones ambientales *in vitro* (medio DMEM 37°C en agitación) activando la expresión de los genes *bfp* y *per* (incluyendo su propia expresión) (Martinez-Laguna et al., 1999);(Puentes et al., 1996).

La autoactivación de PerA es muy eficiente, debido a ello es importante la presencia de elementos que repriman su expresión cuando las condiciones ambientales no la requieran. Está demostrado que un medio rico como el LB, así como temperatura mayor o menor a 37°C y la presencia de sales amonio, reprimen la expresión de *perA* (Martinez-Laguna et al., 1999). Por otro lado, proteínas reguladoras como GadX (otro miembro de la familia AraC/XylS) reprime a *perA* en pH ácido (Shin et al., 2001) y H-NS tiene un rol de modulador negativo, principalmente a 30°C (Porter et al., 2004). Por lo tanto, la presencia de un miembro de la familia ANR en EPEC, codificado en el *orfRS14140* es de gran interés ya que nos ayudará a conocer más sobre la red de regulación de los genes de virulencia de esta bacteria.

El gen *orfRS14140* tiene un tamaño de 234 pb y codifica una proteína de 77 aa con una estructura de tres hélices alfa con un peso molecular de 8.91 kDa. Está codificada en el cromosoma de EPEC junto a los genes de un profago y formando aparentemente un operón río arriba con el *orfRS14135* de 645 pb que codifica un producto de 214 aa perteneciente a la familia DUF3164 las cuales son proteínas fágicas con función desconocida. Río abajo, empalmando las últimas 20 pb, colinda con el *orfRS14140* de 192 pb que codifica una proteína de 63 aa no caracterizada que se encuentra conservada en distintas cepas de *E. coli* y otras especies como

Citrobacter rodentium y *Salmonella enterica* en la misma disposición que en EPEC junto a un miembro de la familia ANR lo cual nos sugiere que estos dos genes en estas bacterias podrían tener un origen en común. Cerca de este *orf* se encuentran también codificados elementos putativos de transposición y restos de un profago lo cual nos sugiere que estos genes podrían provenir de un origen externo (Donnenberg, 2013) . Para complementar este análisis se realizó la búsqueda de promotores río arriba de *orfRS14135*, *orfRS14140* y de *orfRS14145* usando el programa en línea BPROM. Los resultados esquematizados en la Figura 10, muestran la presencia de promotores río arriba de los tres genes. De manera interesante, río arriba de *orfRS14135* se encontraron sitios putativos para unión de diversos factores de transcripción (Tabla 5). La presencia de esos sitios putativos para la unión de los factores de transcripción, no necesariamente significa que estén actuando sobre ese gen, pero sirve para tener en cuenta en futuros estudios, sobre todo si se comprueba que el *orfRS14135* forma un operón con el *orfRS14140*.

De acuerdo a los datos obtenidos de BPROM, existe la posibilidad de que los tres genes formen un operón ya que el promotor río arriba del *orfRS14135* tiene un nivel de predicción alto. Sin embargo, también existe la posibilidad de que los tres genes formen unidades de transcripción independientes ya que en todos se predijo un promotor, aunque la predicción del promotor río arriba de *orfRS14145* muy alejado del ATG y ya que la información proporcionada BPROM nos recuerda que comúnmente los promotores se encuentran en un rango de 150 bases río arriba del ORF, esto nos sugiere que este gen no estaría formando una unidad transcripcional independiente. Todo lo anterior se tiene que corroborar experimentalmente realizando una RT-PCR punto final usando unos oligonucleótidos que amplifiquen los tres genes juntos y por separado así como del *orfRS14135-orfRS14140* y del *orfRS14140 -orfRS14145* en parejas.

Una característica que proponen Santiago et al. (2014) de acuerdo a sus observaciones, es que los miembros de la familia ANR se encuentran codificados cerca y con dirección de la transcripción opuesta del miembro de la familia AraC/XylS que regula. A pesar de ello, el *orfRS14140* se encuentra en el

cromosoma mientras que *perA* en el plásmido EAF. Interesantemente a 7363 bases río arriba del *orfRS14145*, en sentido contrario de transcripción se encuentra codificado EutR. Este es un miembro de la familia AraC/XylS que induce la expresión del operón *eut* (por tanto, su propia expresión ya que *eutR* es el último gen de este operón). Este operón contiene los elementos necesarios para el metabolismo del etanolamina (Luzader et al., 2013; Roof and Roth, 1992). Esta vía se encuentra interrumpida en EPEC por el profago que contiene el *orfRS14140*. Interesantemente, en EHEC se ha encontrado que EutR también regula a LEE a través de la activación de *ler*, uniéndose a una secuencia consenso en su región promotora. Proceso independiente de la transcripción del operón *eut* ya que *eutR* tiene una expresión constitutiva que es suficiente para activar la expresión de *ler* (Luzader et al., 2013). Nosotros hemos encontrado río arriba del *orfRS14135*, una secuencia muy similar a la que es reconocida por EutR río arriba de *ler* en EHEC (dato no mostrado) por lo tanto, si el *orfRS14135* se expresa junto al *orfRS14140*, futuras investigaciones serían necesarias para saber si EutR activa su expresión y si existe una retroalimentación negativa.

En cuanto a la comparación de RS14140 con Aar, el miembro de la familia ANR mejor caracterizado, ambos comparten un 26.8% de identidad y 37.8% de similitud y tienen una estructura secundaria de tres hélices alfa. Pero mientras que Aar es insoluble, RS14140 no lo es ya se recupera perfectamente de la fracción soluble del extracto proteico. Referente a los aminoácidos esenciales para la función de Aar (Santiago et al., 2016), encontramos 9 de estos aminoácidos conservados y 4 similares en RS14140, esto nos sugiere que podrían ser importantes para su función en EPEC, sin embargo, se necesita mas estudios para comprobarlo.

También se realizó un alineamiento entre RS14140 de EPEC y miembros de la familia ANR de *E. coli* diarreogénicas incluyendo los de *C. rodentium* y *S. enterica* (Figura 14). Los porcentajes de similitud e identidad entre el ANR de EPEC y los de EAEC, ETEC, EHEC y EIEC oscilan entre 32-37% y 50-56% respectivamente aun estando EHEC y EIEC en la misma subfamilia que EPEC. Sin embargo, la cercanía con *C. rodentium* (94% identidad 94% similitud) y *S. enterica* (51% identidad 73% similitud) es muy notable y sumando a esto que su disposición en el genoma es muy

similar, podemos inferir que tienen un origen en común. El miembro de ANR de *C. rodentium* ya ha sido evaluado por Santiago et al. (2014). Este regula negativamente a RegA el principal miembro de la familia AraC/XylS en esta bacteria (Santiago et al., 2014). Por lo tanto, un efecto similar era esperado para RS14140.

Para comprobar si el *orfRS14140* se expresa en EPEC WT, se realizaron ensayos de RT-PCR punto final de ARN extraído de la cepa crecida en las condiciones de inducción y represión de los genes de virulencia, evaluando también la expresión de *perA* para comprobar si tenía un patrón de expresión con *orfRS14140* similar al que tienen *aar* y *aggR* (Santiago et al., 2014). Los resultados mostraron que el *orfRS14140* se expresa en las mismas condiciones que *perA*, pero con menor intensidad. Esta expresión es más o menos constante a lo largo de la curva de crecimiento por lo que podría tratarse de una expresión basal que, aunque no es muy alta, podría ser suficiente para estar modulando la actividad de PerA en un porcentaje discreto. Sin embargo, es realizar la mutante en este gen en EPEC, para comprobarlo. En contraste, en medio LB, aunque la expresión del *orfRS14140* no parece aumentar, si es mayor a la de *perA*, cuya expresión se reduce drásticamente. Esto podría ser importante ya que es posible que RS14140 se ocupe de atrapar la baja cantidad de PerA que se está produciendo en estas condiciones, aboliendo su función como activador de los factores de virulencia que regula. Pero el resultado más interesante se obtuvo al evaluar la expresión del *orfRS14140* en medio DMEM suplementado con 20 mM de sulfato de amonio; condiciones en las que los factores de virulencia, entre ellos PerA son reprimidos. En estas condiciones de cultivo observamos que el *orfRS14140* tiene una alta expresión en los momentos iniciales de la curva de crecimiento la cual disminuye gradualmente al paso de las horas. De acuerdo a estos resultados, estamos ante la posibilidad de haber encontrado uno de los elementos reguladores inducidos por amonio por lo menos en las fases tempranas de la curva de crecimiento ya que conforme pasan las horas al reducirse la expresión del *orfRS14140*, comienza a aumentar ligeramente la expresión de *perA*. Es importante hacer hincapié en lo que sucede en estas condiciones de crecimiento porque podría estarse activando un circuito de regulación entre RS14140, PerA y probablemente otros reguladores desconocidos hasta el

momento. Se necesitan proponer y desarrollar más experimentos para comprobar si la presencia de amonio directamente induce la expresión del *orfRS14140* y conocer el papel de PerA en esto, si es que tiene alguno. Estos resultados indican que la cascada de regulación alrededor de RS14140 es aún más compleja de lo que se pensaba, sugiriendo aspectos a realizar en el futuro.

En cuanto a la regulación de la expresión del *orfRS14140*; con los resultados obtenidos hasta ahora, no podemos descartar que PerA tenga un rol importante así como AggR en la activación de *aar* (Morin et al., 2013), o algún otro regulador, probablemente un miembro de la familia AraC/XylS por ejemplo EutR como se mencionó anteriormente.

Para evaluar el efecto de RS14140 sobre PerA y los genes que regula, se clonó el *orfRS14140* en pBAD/myc-His A que es un vector con un promotor que se induce bajo la presencia de arabinosa y que tiene un estricto control de la expresión. No se usó la etiqueta de histidinas codificada en el pBAD que se encuentra después del epítipo *myc* ya que al ser RS14140 una proteína muy pequeña (77 aminoácidos), la adición de los 27 aminoácidos que contiene esta región, podrían haber afectado su función mediante impedimento estérico.

Una vez caracterizada la construcción pANREP, procedimos a transformarla en EPEC WT para evaluar el efecto de la sobreexpresión de RS14140 sobre los principales factores de virulencia. Se evaluó el efecto sobre el perfil de proteínas secretadas el cual se ve disminuido, por lo tanto, lo que indica un efecto negativo posiblemente sobre el SSTIII. Lo que se estableció mediante Western Blot, fue que RS14140 tiene un efecto antagonista sobre BfpA sugiriendo una inhibición de la producción de BFP, posiblemente al bloquear la actividad de PerA ya que es el activador directo de esta fimbria (Martinez-Laguna et al., 1999). También vimos un efecto similar sobre EspA lo cual nos indica que la producción de efectores de LEE también se ve afectado como ya se había comprobado con el perfil de proteínas secretadas. Con estos ensayos vimos el efecto sobre la producción de proteínas por lo tanto a nivel traduccional.

Una vez comprobado que RS14140 tiene un efecto de regulación negativa sobre BfpA, EspA y la secreción de proteínas, se procedió a realizar ensayos de RT-qPCR

sobreexpresando a RS14140 en EPEC WT. Se seleccionaron los genes de virulencia *perA*, *perC*, *bfpA*, *espB* y *escJ*. *perA* como nuestro principal objeto de estudio ya que codifica uno de los principales miembros de la familia AraC/XylS en EPEC y es un modelo de estudio en el grupo de trabajo del laboratorio, *perC* porque codifica un regulador de LEE en determinadas condiciones ambientales (Bustamante et al., 2011), *bfpA* para complementar lo visto en el Western Blot, *espB* y *escJ* (de LEE2 y LEE5 respectivamente) ya que codifican componentes del SSTIII una proteína translocadora y un componente del cuerpo basal respectivamente (Gaytan et al., 2016). Los resultados de este ensayo, mostraron una disminución considerable en la transcripción de todos los genes evaluados conforme aumentamos el porcentaje de arabinosa, pero lo más destacable es que efectivamente, hay una disminución considerable en la transcripción de *perA* lo cual explica directamente la disminución en la expresión de *perC* y *bfpA*. No obstante la disminución de *espB* y *escJ*, no se explica del todo por la disminución de *perC*, por lo menos no en las condiciones de cultivo empleadas en este trabajo ya que en este caso, el regulador que activa a Ler y por tanto a LEE es GrlA y no PerC (Bustamante et al., 2011). Por lo tanto, RS14140 podría estar actuando también sobre este miembro de la familia AraC/XylS. Esto ya se ha observado en EAEC al comprobar que Aar también interactúa con GadW miembro de la familia AraC/XylS involucrado en la resistencia a ambiente ácido, inhibiendo su función (Santiago et al., 2016). O bien, RS14140 podría unir directamente a Ler ya que este pertenece a la familia H-NS y la interacción de ANR con esta familia ya está comprobada (Santiago et al., 2017). Por lo tanto, son necesarios más experimentos para evaluar el efecto de RS14140 sobre otros miembros de la familia AraC/XylS y H-NS en EPEC.

El mecanismo mediante el cual actúa RS14140 sobre PerA es aún desconocido pero ya que no posee dominios de unión a ADN, se espera que sea mediante interacción proteína-proteína como se reportó para Aar (Santiago et al., 2016) debido a que varios de los aminoácidos importantes para la función de Aar se encuentran conservados en RS14140 (Santiago et al., 2014; Santiago et al., 2016). De los resultados obtenidos en este trabajo será relevante realizar ensayos de interacción proteína-proteína entre RS14140 y PerA para comprobar esta hipótesis.

El vector pBAD empleado en este trabajo, produce gran cantidad de proteínas recombinantes, sin embargo, se puede regular la producción de la proteína recombinante al inducir con diferentes porcentajes de arabinosa y por lo tanto el efecto de RS14140 producido en EPEC, lo cual es evidente en la RT-qPCR. También a diferencia de *E. coli* BL21 DE3, en EPEC WT la producción de RS14140 es mucho menor por lo que consideramos adecuado usar este vector en los ensayos.

Finalmente se elaboró un modelo en el cual se proponen las vías de regulación efectuadas por RS14140 basándonos en los resultados obtenidos hasta el momento de la elaboración de esta tesis y en la bibliografía revisada que se discuten en esta sección (Figura 20) que se irán dilucidando conforme se siga con este trabajo.

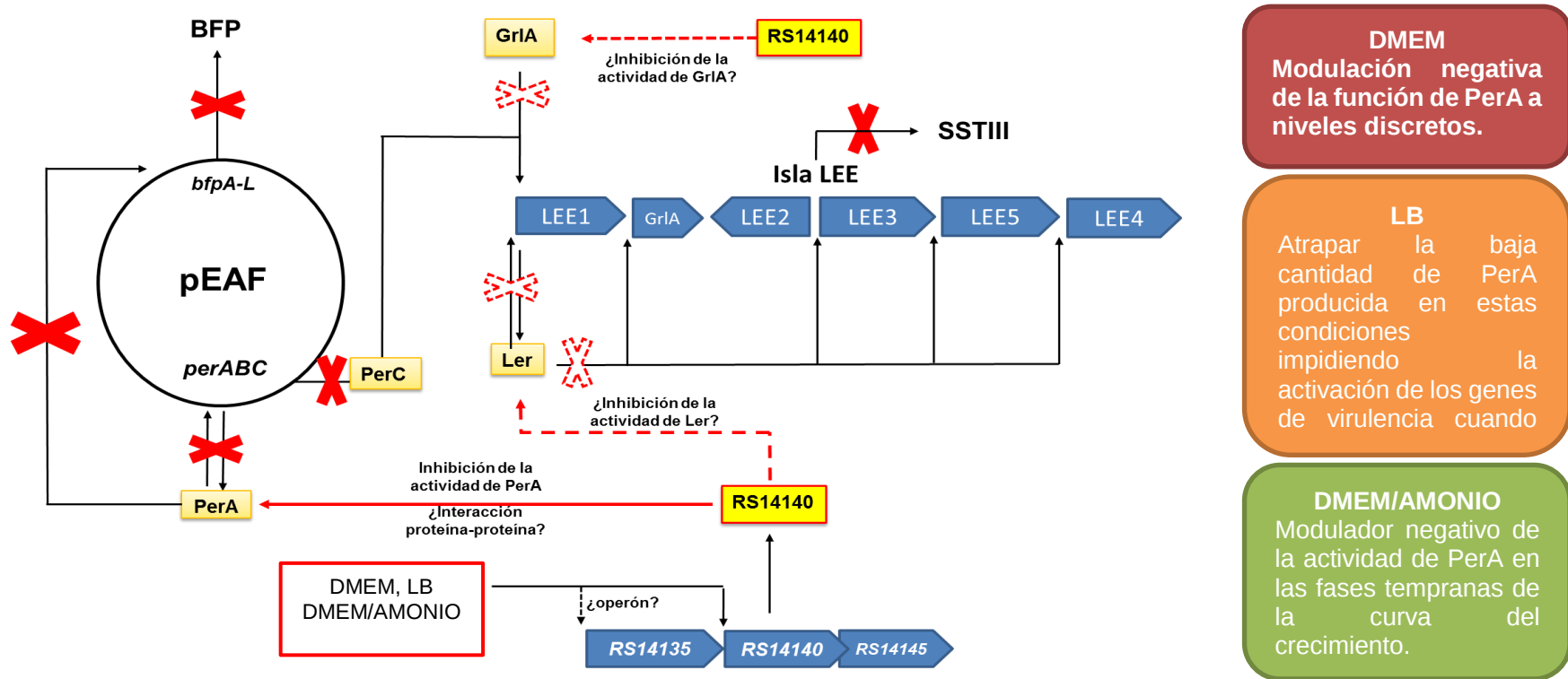


Figura 20. Modelo de la actividad de RS14140 en el mecanismo de regulación de los genes de virulencia de EPEC.

En este modelo se esquematizan los principales elementos reguladores del pEAF y LEE y el efecto regulador de RS14140 propuesto de acuerdo a los resultados de este trabajo y la bibliografía revisada. Las flechas negras indican regulación positiva, las flechas rojas indican regulación negativa de acuerdo a lo visto en este trabajo. Las flechas rojas discontinuas indican regulación negativa hipotética. Las cruces rojas indican las vías que se interrumpieron ya sea directa o indirectamente por RS14140 vistas en este trabajo y las cruces rojas en líneas discontinuas señalan que podrían ser interrumpidas por RS14140. En los recuadros de la derecha se lista la función de RS14140 propuestas para cada una de las condiciones evaluadas.

9. CONCLUSIONES.

- El *orfRS14140* se encuentra en el cromosoma de EPEC cepa E2348/69, tiene un tamaño de 234 pb y se encuentra flanqueado por 2 genes putativos: *orfRS14135* de 645 pb y *orfRS14145* de 192 pb. Los tres genes están dispuestos en la misma orientación por lo que podrían estar formando un operón. Los 3 ORFs se encuentran junto a secuencias de un profago interrumpiendo el operón *eut*. La organización y orientación genética del *orfRS14140* en arreglo con los 2 genes putativos sin caracterizar es similar a la encontrada en las enterobacterias *Citrobacter rodentium* ICC168 y *Salmonella enterica* Oranienburg CFSAN039531.
- El *orfRS14140* codifica una proteína pequeña de 8.91 kDa que comparte 50 y 37% de similitud e identidad a nivel de aminoácidos con Aar, el miembro prototipo de la familia ANR. La estructura secundaria del RS14140 está conformada por tres hélices alfa principales y una cuarta pequeña. Dicha estructura es muy similar a la de Aar.
- Las condiciones de crecimiento de EPEC que favorecen la expresión del gen *RS14140* son medio DMEM y LB a 37°C donde se expresa en bajas cantidades desde etapas tempranas de la curva de crecimiento, disminuyendo ligeramente durante la fase estacionaria y durante las fases exponencial y estacionaria de la curva de crecimiento. De manera interesante, en DMEM suplementado con sulfato de amonio a 37°C (condiciones de represión de los genes de virulencia), el *orfRS14140* mostró una expresión mayor desde etapas tempranas de la curva de crecimiento de la bacteria y disminuyó de manera gradual al final de la misma.
- En multicopia, RS14140 modula negativamente la expresión de BfpA, EspA y las proteínas secretadas de EPEC. Asimismo, dicho efecto represor lo ejerce a nivel transcripcional sobre *bfpA*, *perA*, *perC*, *espA* y *escJ*. Esto sugiere que RS14140 reprime a los genes de virulencia que están bajo la regulación de PerA. Dicho efecto podría ocurrir mediante la interacción proteína-proteína con PerA.

- Es probable que RS14140 ejerza un efecto represor sobre los genes ubicados en la isla LEE a través de otros reguladores.

10. PERSPECTIVAS.

- Purificar a RS14140-6XH y realizar ensayos de interacción proteína-proteína con PerA y otros reguladores de virulencia.
- Mutar el gen *orfRS14140* en EPEC WT para evaluar su efecto y realizar la complementación en *trans* con un vector de bajo número de copias.
- Comprobar si el *orfRS14140* está formando un operón con *orfRS14135* y *orfRS14145*.
- Evaluar el efecto de la sobreexpresión de RS14140 en una cepa de EPEC atípica.
- Realizar RT-qPCR para evaluar el efecto de la sobreexpresión de RS14140 sobre otros miembros de la familia AraC/Xyls como GadX y EutR.
- Evaluar si RS14140 modula la expresión de H-NS en EPEC como lo visto en EAEC.
- Evaluar el efecto de RS14140 en una mutante en *perA* para comprobar si actúa sobre otros reguladores diferentes a *perA*.

11. BIBLIOGRAFÍA.

Abe, H., Miyahara, A., Oshima, T., Tashiro, K., Ogura, Y., Kuhara, S., Ogasawara, N., Hayashi, T., and Tobe, T. (2008). Global regulation by horizontally transferred regulators establishes the pathogenicity of *Escherichia coli*. *DNA Res* 15, 25-38.

Barnett Foster, D., Philpott, D., Abul-Milh, M., Huesca, M., Sherman, P.M., and Lingwood, C.A. (1999). Phosphatidylethanolamine recognition promotes enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* host cell attachment. *Microb Pathog* 27, 289-301.

Bustamante, V.H., Santana, F.J., Calva, E., and Puente, J.L. (2001). Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* 39, 664-678.

Bustamante, V.H., Villalba, M.I., Garcia-Angulo, V.A., Vazquez, A., Martinez, L.C., Jimenez, R., and Puente, J.L. (2011). PerC and GrlA independently regulate Ler expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 82, 398-415.

Chen, H.D., and Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* 29, 83-98.

Clarke, S.C., Haigh, R.D., Freestone, P.P., and Williams, P.H. (2003). Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* 16, 365-378.

Creasey, E.A., Delahay, R.M., Daniell, S.J., and Frankel, G. (2003). Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 149, 2093-2106.

Croxen, M.A., and Finlay, B.B. (2009). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8, 26-38.

Dean, P., and Kenny, B. (2009). The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr Opin Microbiol* 12, 101-109.

Dean, P., Maresca, M., and Kenny, B. (2005). EPEC's weapons of mass subversion. *Curr Opin Microbiol* 8, 28-34.

Deng, W., Puente, J.L., Gruenheid, S., Li, Y., Vallance, B.A., Vazquez, A., Barba, J., Ibarra, J.A., O'Donnell, P., Metalnikov, P., *et al.* (2004). Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 3597-3602.

Donnenberg, M.S. (2013). *Escherichia coli* Pathotypes and Principles of Pathogenesis, Vol 2 (Elsevier).

Donnenberg, M.S., Giron, J.A., Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1992). A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol Microbiol* 6, 3427-3437.

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

Gallegos, M.T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., and Ramos, J.L. (1997). Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 393-410.

Gaytan, M.O., Martinez-Santos, V.I., Soto, E., and Gonzalez-Pedrajo, B. (2016). Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol* 6, 129.

Gomes, T.A., Blake, P.A., and 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, 266-269.

Gomez-Duarte, O.G., and Kaper, J.B. (1995). A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 63, 1767-1776.

Goosney, D.L., DeVinney, R., Pfuetzner, R.A., Frey, E.A., Strynadka, N.C., and Finlay, B.B. (2000). Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actinin. *Curr Biol* 10, 735-738.

Gruenheid, S., DeVinney, R., Bladt, F., Goosney, D., Gelkop, S., Gish, G.D., Pawson, T., and Finlay, B.B. (2001). Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nat Cell Biol* 3, 856-859.

Hill, M.J., and Drasar, B.S. (1975). The normal colonic bacterial flora. *Gut* 16, 318-323.

Ibarra, J.A., Villalba, M.I., and 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, 2835-2847.

Iizumi, Y., Sagara, H., Kabe, Y., Azuma, M., Kume, K., Ogawa, M., Nagai, T., Gillespie, P.G., Sasakawa, C., and Handa, H. (2007). The enteropathogenic *E. coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. *Cell Host Microbe* 2, 383-392.

Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 123-140.

Kelly D. Stone, H.-Z.Z., Lisa K., and Donnenberg, C.a.M.S. (1996). A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus *Molecular Microbiology* 20, 13.

Kenny, B. (1999). Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol Microbiol* 31, 1229-1241.

Kenny, B., Abe, A., Stein, M., and Finlay, B.B. (1997a). Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* 65, 2606-2612.

Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A., and Finlay, B.B. (1997b). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91, 511-520.

Khursigara, C., Abul-Milh, M., Lau, B., Giron, J.A., Lingwood, C.A., and Barnett Foster, D.E. (2001). Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence factor bundle-forming pilus has a binding specificity for phosphatidylethanolamine. *Infect Immun* 69, 6573-6579.

Lanata, C.F., Fischer-Walker, C.L., Olascoaga, A.C., Torres, C.X., Aryee, M.J., and Black, R.E. (2013). Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One* 8, e72788.

Lara, F.G. (2019). Búsqueda de proteína (s) que interactúen con el activador PerA de *Escherichia coli* enteropatógena. (Benemérita universidad autónoma de Puebla).

Luzader, D.H., Clark, D.E., Gonyar, L.A., and Kendall, M.M. (2013). EutR is a direct regulator of genes that contribute to metabolism and virulence in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* 195, 4947-4953.

Martinez-Laguna, Y., Calva, E., and 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, 153-166.

Morin, N., Santiago, A.E., Ernst, R.K., Guillot, S.J., and Nataro, J.P. (2013). Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 81, 122-132.

Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11, 142-201.

Ochoa, T.J., and Contreras, C.A. (2011). Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Curr Opin Infect Dis* 24, 478-483.

Porter, M.E., Mitchell, P., Roe, A.J., Free, A., Smith, D.G., and 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, 1117-1133.

Puente, J.L., Bieber, D., Ramer, S.W., Murray, W., and Schoolnik, G.K. (1996). The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol* 20, 87-100.

Rendon, M.A., Saldana, Z., Erdem, A.L., Monteiro-Neto, V., Vazquez, A., Kaper, J.B., Puente, J.L., and Giron, 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, 10637-10642.

Roof, D.M., and Roth, J.R. (1992). Autogenous regulation of ethanolamine utilization by a transcriptional activator of the *eut* operon in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* 174, 6634-6643.

Roxas, J.L., Monasky, R.C., Roxas, B.A.P., Agellon, A.B., Mansoor, A., Kaper, J.B., Vedantam, G., and Viswanathan, V.K. Enteropathogenic *Escherichia coli* EspH-Mediated Rho GTPase Inhibition Results in Desmosomal Perturbations. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 6, 163-180.

Roxas, J.L., Wilbur, J.S., Zhang, X., Martinez, G., Vedantam, G., and Viswanathan, V.K. The enteropathogenic *Escherichia coli*-secreted protein EspZ inhibits host cell apoptosis. *Infect Immun* 80, 3850-3857.

Saldana, Z., Erdem, A.L., Schuller, S., Okeke, I.N., Lucas, M., Sivananthan, A., Phillips, A.D., Kaper, J.B., Puente, J.L., and Giron, 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, 3451-3461.

Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Santiago, A.E., Ruiz-Perez, F., Jo, N.Y., Vijayakumar, V., Gong, M.Q., and Nataro, J.P. (2014). A large family of antivirulence regulators modulates the effects of transcriptional activators in Gram-negative pathogenic bacteria. *PLoS Pathog* 10, e1004153.

Santiago, A.E., Yan, M.B., Hazen, T.H., Sauder, B., Meza-Segura, M., Rasko, D.A., Kendall, M.M., Ruiz-Perez, F., and Nataro, J.P. (2017). The AraC Negative Regulator family modulates the activity of histone-like proteins in pathogenic bacteria. *PLoS Pathog* 13, e1006545.

Santiago, A.E., Yan, M.B., Tran, M., Wright, N., Luzader, D.H., Kendall, M.M., Ruiz-Perez, F., and Nataro, J.P. (2016). A large family of anti-activators accompanying XylS/AraC family regulatory proteins. *Mol Microbiol* 101, 314-332.

Shin, S., Castanie-Cornet, M.P., Foster, J.W., Crawford, J.A., Brinkley, C., and 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*, 1133-1150.

Solovyev, V., and Salamov, A. (2011). Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. *Metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies*, 61-78.

Thomas, M.S., and Wigneshweraraj, S. (2014). Regulation of virulence gene expression. *Virulence* *5*, 832-834.

Ugalde-Silva, P., Gonzalez-Lugo, O., and Navarro-Garcia, F. Tight Junction Disruption Induced by Type 3 Secretion System Effectors Injected by Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol* *6*, 87.

UNICEF (2018). Diarrhoeal disease.

Uversky, V. (2019). Intrinsically Disordered Proteins and Their “Mysterious” (Meta)Physics. *Frontiers in Physics* *7*, 10.

WHO (2017). Diarrhoeal disease.

Wiwanitkit, V. (2011). *Escherichia coli* infections.

Wong, A.R., Raymond, B., Collins, J.W., Crepin, V.F., and Frankel, G. The enteropathogenic *E. coli* effector EspH promotes actin pedestal formation and elongation via WASP-interacting protein (WIP). *Cell Microbiol* *14*, 1051-1070.

Woodcock, D.M., Crowther, P.J., Doherty, J., Jefferson, S., DeCruz, E., Noyer-Weidner, M., Smith, S.S., Michael, M.Z., and Graham, M.W. (1989). Quantitative evaluation of *Escherichia coli* host strains for tolerance to cytosine methylation in plasmid and phage recombinants. *Nucleic Acids Res* *17*, 3469-3478.

12. ANEXOS.

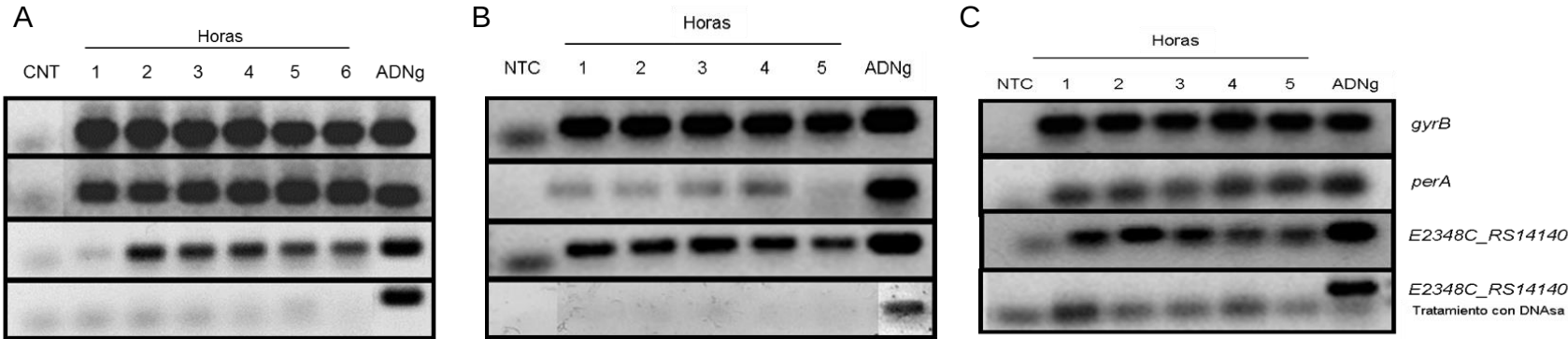


Figura A1. Expresión del *orfRS14140* en diferentes condiciones de crecimiento de EPEC WT (repetición).

A. DMEM, B. LB y C. DMEM/Amonio.

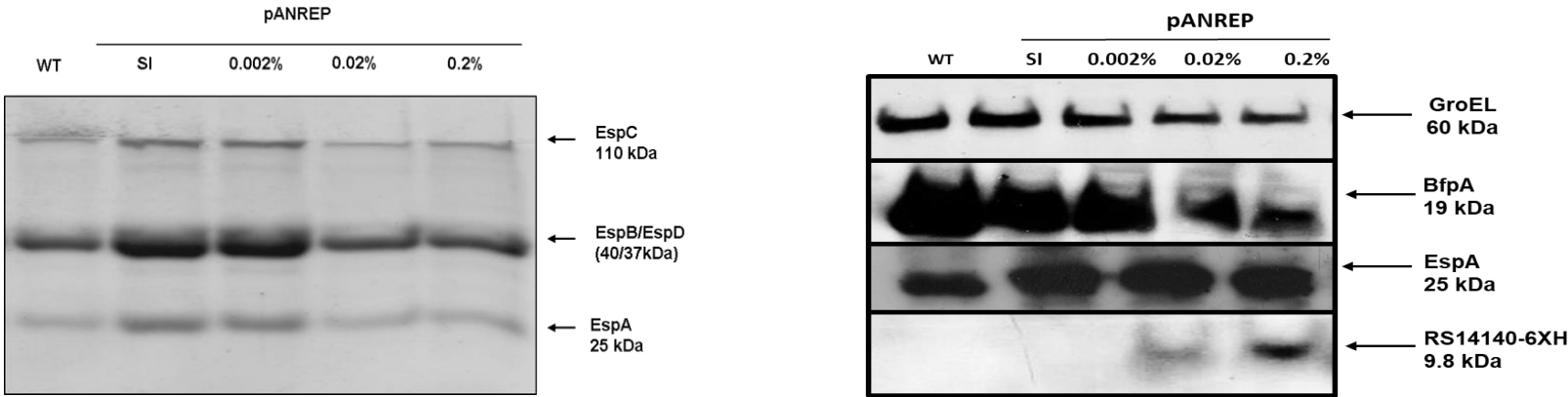


Figura A2. Efecto de RS14140 sobre el perfil de proteínas secretadas de EPEC (repetición).

Figura A3. Efecto de RS14140 sobre la expresión de BfpA y EspA en EPEC (repetición).