



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad Medicina

**Análisis Bioinformático e Inducción, purificación y análisis de la
proteína OppA de *Yersinia pseudotuberculosis* YP III**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN BIOMEDICINA**

PRESENTA: MIRIAN BECERRIL RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS: D.C. LUIS JAVIER MARTÍNEZ MORALES.

Asesor Metodológico

DC. Lucía Soto Urzúa

PUEBLA, PUE.

Abril 2023

ÍNDICE

Antecedentes	2
Planteamiento del problema	11
Justificación	11
Hipótesis	11
Objetivo general	12
Objetivos específicos	12
Material y Métodos	12
Diseño de estudio	12
Logística	14
Bioética	14
Anexos	14
Bibliografía	15

Antecedentes

Antecedentes generales

En la familia del género *Yersinia* existen once especies, entre las cuales se pueden hallar cepas patógenas para los peces, algunas ambientales, y otras que son patógenas para los humanos (Hall et al., 2015). Crecen óptimamente a 28 °C.

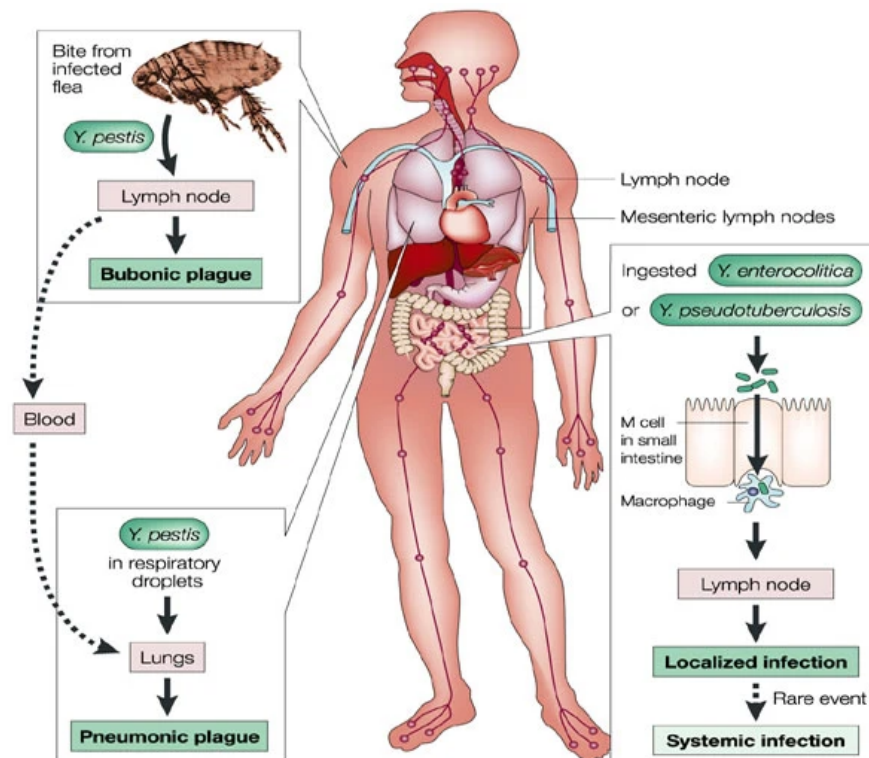


Fig 1. Ruta de infección de *Yersinia*. La peste neumónica se transmite de persona a persona a través de pulgas o por aerosoles generados artificialmente. *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis* se ingieren e ingresan al sistema linfático a través de las células M del intestino delgado (Wren 2003).

La peste es una enfermedad no erradicada y reemergente, tiene presencia en África, Asia y América. Los brotes más importantes de África se encuentran en Madagascar, la República Democrática del Congo y Uganda. En Asia, es China, Indonesia. En América, el foco principal está en Perú, seguido por Estados Unidos. (L'institute Pasteur, 2017).

Yersinia pestis, causante de la peste, tiene tres subgrupos reconocidos: *antiqua*, *mediaevalis* y *orientalis*; las cuales reciben su nombre por asociación a cada una

de las tres pandemias acontecidas históricamente, además de diferenciarse por su capacidad para fermentar glicerol y reducir el nitrato (Wren, 2013).

Tal parece ser que *Y. pestis*, es el sucesor evolucionado de *Y. pseudotuberculosis* (Wren, 2013). Dicha evolución se correlaciona con la adquisición de la capacidad de transmitirse a los humanos mediante la picadura de pulgas infectadas que viajan en el pelaje de las ratas. Ya dentro del cuerpo se suele diseminar a los ganglios linfáticos a través de los macrófagos, provocando inflamación, edema, hemorragia y dolor en el sitio dando la apariencia característica del bubón. Si la infección progresa a los pulmones, se desarrolla la peste neumónica, que es altamente infecciosa y rápidamente fatal (Wren, 2013).

La especie de *Y. enterocolitica* consta de sesenta serotipos, de los cuales, sólo once se han asociado con la enfermedad en humanos, y únicamente tres se consideran los agentes causantes de la yersiniosis en América, y varían según la geografía (Merrell et al., 2002).

Es una zoonosis muy común en el ganado, y los seres humanos se contagian tras el consumo de agua o alimentos contaminados (Wren, 2013). Después de la ingestión, las bacterias se alojan en el intestino delgado, desde donde se diseminan a las placas de Peyer, luego migran a los ganglios linfáticos mesentéricos y posteriormente al hígado y el bazo, donde inician la replicación (Lian et al., 1987). Después de la multiplicación, se produce una rápida inflamación, que da lugar a los síntomas asociados con la gastroenteritis (Lian et al., 1987).

Yersinia pseudotuberculosis es un cocobacilo Gram negativo, pequeño, pleomórfico, que se tiñe bipolarmente; no forma cápsula y es anaerobio facultativo. Las colonias son pequeñas, redondeadas, con centro elevado, finamente granulares, translúcidas, con bordes lisos y de amarillo opaco. En medios líquidos crece produciendo turbidez y sedimento. De acuerdo con la presencia de elementos de las islas de patogenicidad HPI (Fukushima et al., 2001). Se puede clasificar en 14 biotipos, de los cuales 5 son patógenos

incluyendo 1 que contiene una isla de patogenicidad cromosómica HPI completa e intacta (Tsubokura y Aleksić, 1995)

Se encuentra en muchas especies animales en las que puede causar una infección sintomática y, a veces, la muerte, especialmente en liebres y monos. Su reservorio principal se da en roedores, y se transmite al humano por consumo de alimentos contaminados (L'institute Pasteur, 2017). Provoca gastroenteritis aguda, linfadenitis mesentérica y enfermedades diarreicas caracterizadas por fiebre y dolor abdominal intenso (Lian et al., 1987).

Factores de virulencia

Se sabe que los genomas de *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* y *Y. pestis*, son 97% idénticos (Galindo et al., 2011). Las más alejadas filogenéticamente hablando de las tres serían *Y. enterocolitica* y *Y. pseudotuberculosis*, por lo que su grado de patogenicidad varía considerablemente; sin embargo, generan enfermedades parecidas; asimismo, comparten un sistema de secreción de tipo III, y moléculas de adhesión fundamentales para el establecimiento y progresión de la infección (L'institute Pasteur, 2017). La combinación de todas estas similitudes y diferencias podrían ser la causa de las distintas rutas de infección, tipos de infecciones y gravedad de la enfermedad.

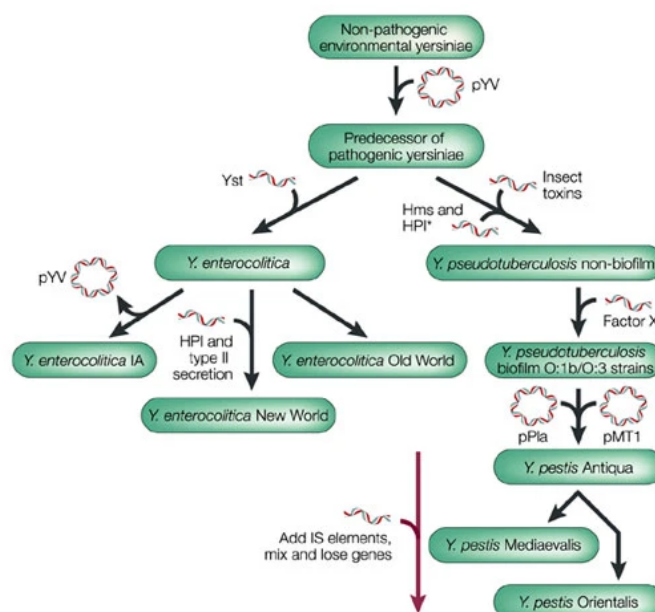


Fig 2. Modelo de la evolución de especies de *Yersinia*. Las *Yersinia*e no patógenas adquieren el plásmido de virulencia pYV., luego *Y. enterocolitica* diverge de *Y. pseudotuberculosis*, la cual adquiere la capacidad de parasitar insectos y formar biopelículas en los huéspedes para evolucionar a *Y. pestis* mediante la adquisición de los plásmidos pPla, pMT1 y HPI (Wren 2003).

Hay dos tipos de factores de virulencia que desempeñan un papel en la patogénesis del género *Yersinia* de naturaleza cromosómica o plasmídica. La isla cromosómica de alta patogenicidad (HPI), de adquisición más reciente, es uno de varios elementos que contribuyen al incremento en su virulencia con respecto a las cepas que le dieron origen (Pelludat et al., 1998). La HPI contiene cinco genes: *psn*, *irp1*, *irp2*, *ybtP* e *ybtQ* (Rakin et al., 1999), los cuales codifican para proteínas sintasas, reguladoras y transportadoras del sideróforo yersiniabactina, un compuesto secuestrador de hierro de bajo peso molecular (Gehring et al., 1988).

Los 3 principales plásmidos importantes para la virulencia son: pYV / YPT, pPst / pPCP1 y pMT1 / pFra (Chain et al., 2004). Los dos últimos fueron adquiridos horizontalmente, los cuales tienen un papel crucial en la aparición de la peste transmitida por pulgas (Sebbane et al., 2006 y 2009), ya que codifican para un activador del plasminógeno, la toxina murina y la pseudocápsula F1 (Pradel et al., 2014 y Chen et al., 2016). El restante pYV, es de aproximadamente 70 kpb, que aporta las actividades anti-fagocíticas e inmunosupresoras (Heise y Dersch, 2006 y Chen et al., 2016) también codifica para la invasina YadA y para un sistema de secreción tipo III (Cornelis et al., 1989 y Reinhardt et al., 2018), importantes para la colonización y translocación de efectores. (Galindo et al., 2011, Kirjavainen et al., 2013 y Amphlett, 2015).

El sistema de secreción tipo 3 (T3SS), consta de un inyector que abarca las membranas bacterianas interna y externa, el cual transloca a las proteínas efectoras (Yops) a través de una aguja formada por YscF, que se acopla directamente a la célula huésped (Cornelis et al., 1989), gracias a que las proteínas YopB y YopD forman un poro en la membrana plasmática de la célula huésped; mientras que, las proteínas chaperonas citosólicas YscE e YscG

transportan las subunidades para el ensamblaje de toda la maquinaria (Cornelis et al., 1989 y 2002; Quinaud et al., 2005 y Trosky et al., 2008). El aumento gradual hasta 37 °C dentro del huésped induce la expresión de factores de virulencia para la invasión de células epiteliales, la regulación de la adherencia su establecimiento dentro de los ganglios linfáticos y la evasión inmunológica, tales como la proteína Ail / OmpX, el regulador de virulencia A (RovA), la *Yersinia*-proteína moduladora (YmoA) y la proteína estructurante nucleoide similar a histona (H-NS) (Revell y Miller, 2000), las citocinas AraC y LcrF (Chen et al., 2016), la síntesis del aparato de secreción de Ysc y la posterior translocación de su carga específica (Guo y Gross, 2014).

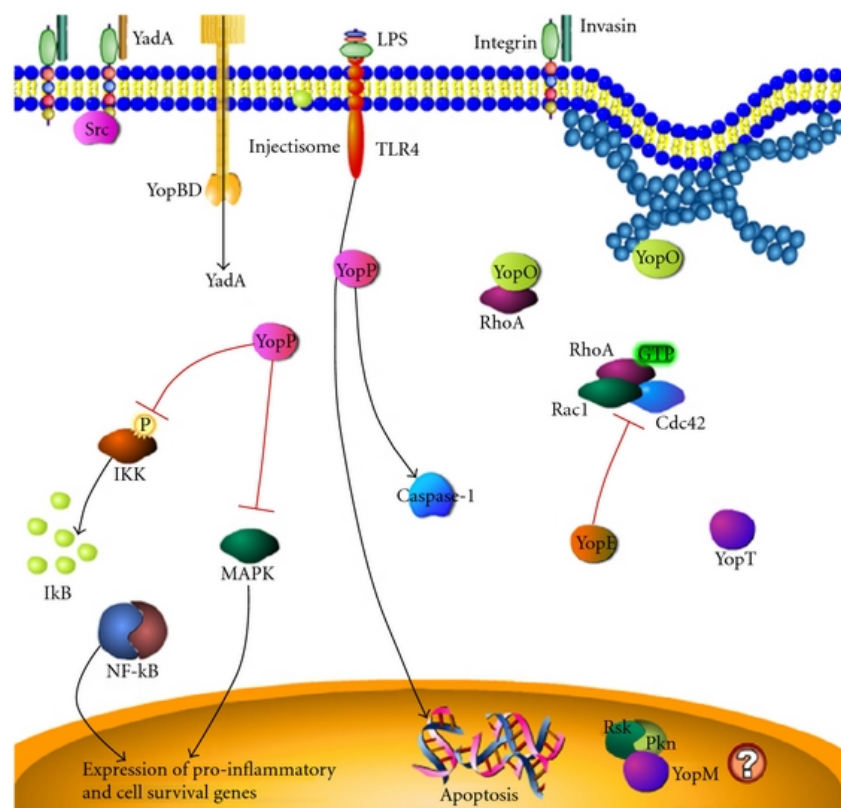


Fig 3. Mecanismos de acción de los efectores enteropatógenos Ysc T3SS (Yops) sobre la señalización y la supervivencia de la célula huésped. La invasina se une a las β 1-integrinas, y se realiza la inserción del inyectosoma T3SS. Luego, las Yops se translocan a través de la membrana plasmática del huésped y hacia el citoplasma, donde interactúan con el citoesqueleto y las moléculas de señalización de la célula huésped. (Galindo et al., 2011).

Proteínas de respuesta al estrés

La mayoría de los factores de estrés son desnaturalizantes proteicos, por lo que es natural pensar en la existencia de una contra respuesta a este tipo de estrés para corregir proteínas mal plegadas y asegurar su correcto funcionamiento dentro de la célula procurando la supervivencia. Dicha función es ejecutada por proteínas denominadas chaperonas moleculares, muchas de las cuales participan en la adaptación a la temperatura del ambiente, tanto temperaturas bajas, como altas. (Hemmingsen et al., 1988).

Mientras que las proteínas de choque frío (CSP) se sintetizan para superar los efectos nocivos de bajas temperaturas (Phadtare et al., 1999); las proteínas de choque térmico (HSP) están involucrados en una amplia gama de procesos celulares, como la degradación y plegamiento de proteínas desnaturalizadas, el tráfico intracelular, la modulación de las vías de señalización y la regulación de las respuestas inmunitarias (Craig, 1993).

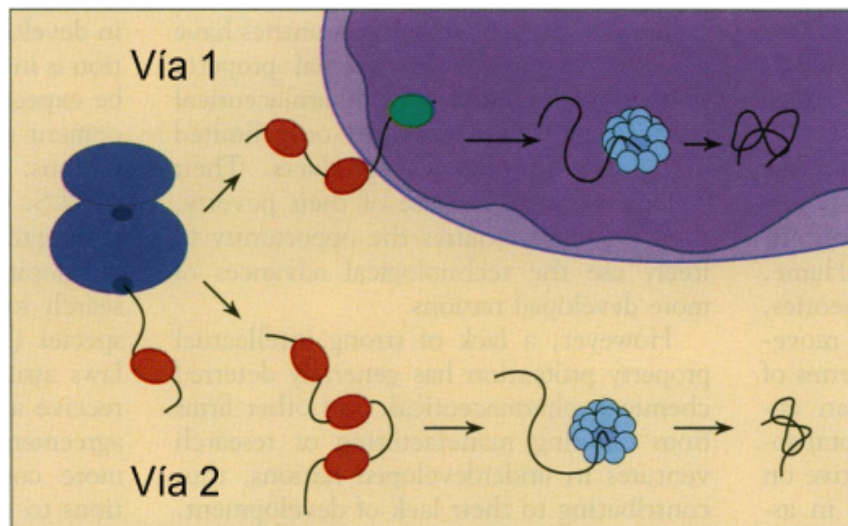


Fig 4. La Hsp 70 y la Hsp 60 en el plegamiento de proteínas. La Hsp70 citosólica (roja) se une a cadenas nascentes de RNA en los ribosomas. (Arriba Vía 1) Las proteínas importadas a las mitocondrias se unen a la Hsp70 mitocondrial (verde) al ingresar a la matriz y luego pasan a la Hsp60 (azul) donde tiene lugar el plegamiento. (Abajo Vía 2) Hsp60 (azul) puede ayudar a plegar proteínas citosólicas (Craig 1993).

Transportador ABC

Los transportadores de cassette con unión a ATP (ABC) constituyen una superfamilia de proteínas integrales de membrana responsables del desplazamiento de sustratos (Rees et al., 2009). Trasloca un amplio espectro de sustratos que incluyen aminoácidos, azúcares, iones y conjugados de metales pesados, péptidos, lípidos, polisacáridos, xenobióticos y fármacos quimioterapéuticos (Wu et al., 2019). Además de ser importadores o exportadores, se estima que están integrados en sistemas que participan en la reparación del ADN y el mantenimiento de los cromosomas (Rees et al., 2009).

La estructura de este tipo de transportadores está muy conservada en los organismos (Wu et al., 2019). Consta de subunidades periplásmicas, dos dominios transmembrana (TMD), y una ATPasa comprendida en dos dominios de unión a nucleótidos citosólicos (NBD) (Rees et al., 2009). Generalmente, dichos componentes se codifican como polipéptidos separados y se fusionan en proteínas multidominio (Linton y Higgins, 2007; Beek et al., 2014).

El transporte es un ciclo iniciado por la unión del sustrato a los TMD, que luego se transmite a los NBD, iniciando así la hidrólisis del ATP y permitiendo una rotación de los TMD. Al liberarse ADP se desestabiliza la conformación de dímero cerrado y posteriormente se restaura el ciclo regresando a su configuración de dímero abierto (Wu et al., 2019). Lógicamente, con la unión del sustrato al transportador debe iniciar el ciclo de transporte; de lo contrario, la unión y la hidrólisis del ATP se producirán independientemente del transporte y el ciclo será inútil (Linton y Higgins, 2007).

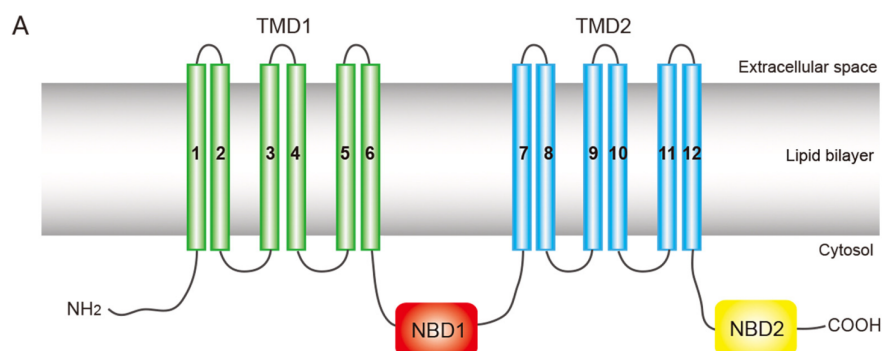


Fig 5. Estructura general de un transportador completo ABC. Casete de unión a ATP (ABC) y el modelo de interruptor de ATP para el mecanismo de transporte de los transportadores ABC (Wu et al., 2011).

Los importadores ABC de Tipo I y II deben llevar a cabo un paso extra, ya que depende de proteínas de unión a sustrato (SBP) para la captura inicial del polímero (Beek et al., 2014). Como ejemplo de este tipo de transportadores tenemos al MalEFGK 2 de *E. coli*, uno de los importadores de Tipo I mejor caracterizados.

Las SBP son muy útiles para muchas bacterias, para la adquisición selectiva de compuestos y nutrientes específicos, debido a que cuentan con un sitio de unión al ligando de alta afinidad bien definido; además tienen la capacidad de adoptar conformaciones distintas, ya sea libres o unidas a ligandos, lo que les confiere una gran amplitud de movimiento para su adaptación a una variedad de sustratos.

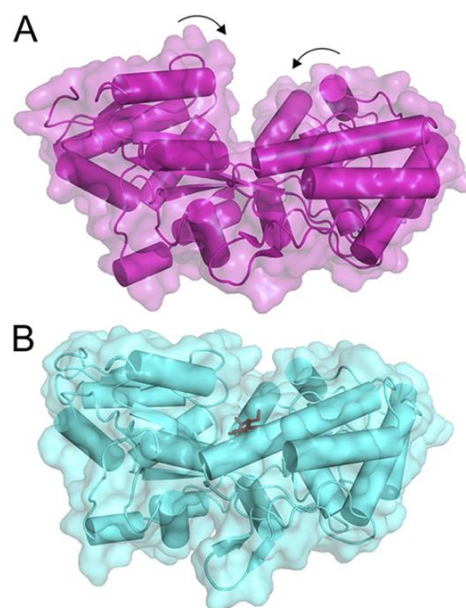


Fig 6. Reordenamientos en MBP tras la unión del sustrato. (A) En la forma sin sustrato (B) Tras la unión del sustrato cuando la cavidad se ocluye (Beek et al., 2014).

Los cambios conformacionales de las SBP pueden servir como un interruptor para iniciar el proceso de transporte, así como para favorecer la exclusión de sustratos no afines. Aunque las SBP tienen múltiples conformaciones distintas unidas a

ligando; los dominios transmembranales sólo pueden interactuar con algunas de sus conformaciones cerradas. La presencia de dos “pockets” de unión complementarios consecutivos, uno en la SBP y otro en el translocador, explica la especificidad del transporte ocurre a través de un mecanismo, en el que un sustrato puede ser rechazado incluso si ha sido ligado por la SBP (Boer et al., 2019).

Antecedentes específicos

Se conoce muy bien el proceso de “foldeo” o plegamiento que llevan a cabo las proteínas de choque térmico dentro del citoplasma. Sin embargo, este mecanismo de proteostasis interno, no es aplicable al que podría haber en el entorno extra citoplasmático, debido a que no hay ATP, es un entorno altamente oxidante además de que se encuentra separado del exterior por únicamente una fina membrana porosa, por lo que resulta especialmente susceptible a cambios en el exterior.

Recientemente ha surgido una nueva clase de proteínas periplásmicas con actividad de tipo chaperona (Duguay et al., 2004). La primera de estas proteínas que se identifica en *E. coli* es Skp, de la cual originalmente se pensó que era una proteína similar a las histonas; también las rotamasas, PpiD, SurA y FkpA, y la proteasa DegP / DsbG. Esto es un indicio de que algunas proteínas tienen una función doble, siendo que bajo estrés su traducción se encuentre estable o incluso elevada en comparación con otras (Sučec et al., 2021). Aunado a lo anterior, ninguna de las chaperonas moleculares citoplasmáticas clásicas como GroEL y DnaK, han sido identificadas en el periplasma, por lo que se han estudiado algunas proteínas de unión a sustrato periplásmico, ya que son abundantes en la zona y podrían presentar la característica de ser bifuncionales (Kim et al., 2021).

Se ha demostrado que algunas SBP tienen actividades de chaperona, como la proteína de unión a oligopéptidos OppA y la proteína de unión a maltosa MalE de *E. coli*, así como la proteína de unión a galactosa MglB de *Salmonella typhimurium* (Matsuzaki et al., 1998). Con esta información se plantea en el

presente trabajo entender la posible respuesta al estrés que tiene *Y. pseudotuberculosis* mediante la acción de tipo chaperona de la proteína receptora del sistema importador Opp.

OppA tiene preferencia por polipéptidos de más de 2 residuos, y aunque se puede unir con cadenas de hasta 35 residuos, sólo una conformación cerrada única del complejo SBP OppA es capaz de interaccionar con la porción translocadora de la permeasa de Opp. Es decir, múltiples conformaciones de SBP pueden activar el transporte, no todos los estados conformacionales de SBP parecen proporcionar la señal para facilitar el transporte (Doeven et al., 2004).

Se ha visto que el grupo α -amino del ligando está anclado con el residuo Asp de la SBP en posición 419 a través de una interacción de par iónico (Sleigh et al., 1997), mientras que otro estudio reveló que, su grupo α -carboxilato forma interacciones variadas mediadas por agua con residuos aminoacídicos del sitio de unión clave: Glu32, Val34, Tyr109, Asn246, Asn247, Arg404, His405, Arg413, Ala415, Trp416, Cys417, Asp419 y Thr438, siendo estos pertenecientes a la hendidura hidrofóbica cerca de la región (Escobar et al., 2020).

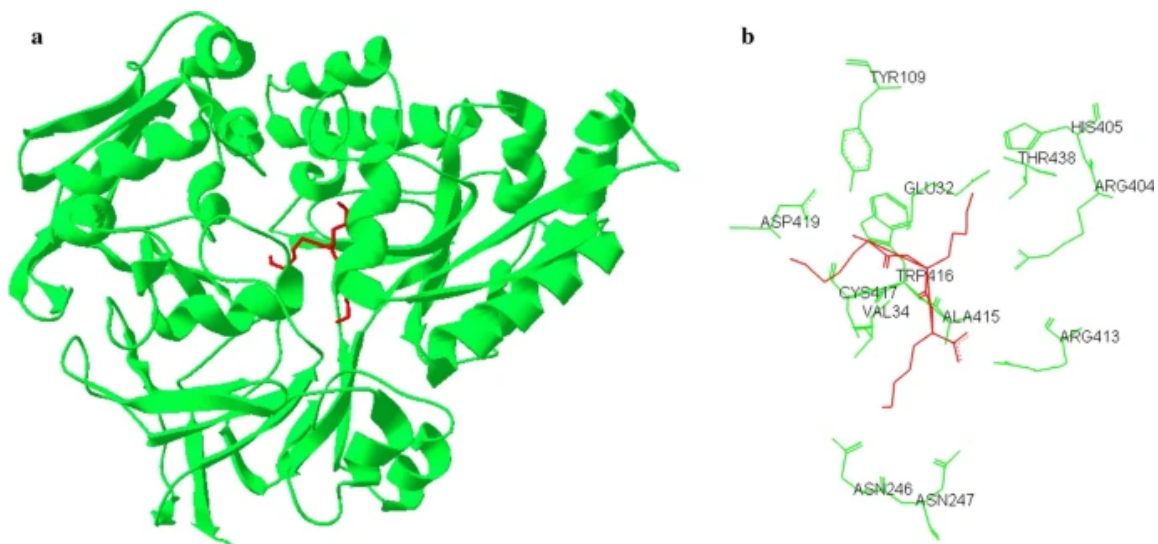


Fig 7. Proteína OppA de 45 kDa.. formada por dos lóbulos con unidades $\beta\alpha\beta$ estructurales secundarias y una bisagra flexible entre los dos lóbulos donde se encuentra la hendidura de unión

al sustrato. A) Estructura de la proteína OppA (verde) unida al péptido tri-lisina (rojo) dónde se encuentra la hendidura hidrofóbica de unión al sustrato. B) Los residuos clave etiquetados (Escobar et al., 2020).

La OppA de *Y. pseudotuberculosis* ha demostrado tener capacidad para replegar proteínas desnaturalizadas por clorhidrato de guanidina y urea. Al parecer, la hendidura hidrófoba de esta proteína periplásmica es una característica en común que tiene con las chaperonas verdaderas (GroEL y DnaK); aunque, de un tamaño más reducido, lo cual podría explicar sus limitaciones para esta actividad (Escobar et al., 2020).

Planteamiento del problema

La proteína periplásmica OppA de *Yersinia pseudotuberculosis* es parte esencial del sistema de transporte de oligopéptidos (Opp), pero también ha demostrado tener una actividad tipo chaperona, lo cual parece esencial en esta zona desprovista de otras chaperoninas renaturalizantes.

Justificación

Aún no es claro cómo ocurre el fenómeno de renaturalización de proteínas en el espacio periplásmico de bacterias Gram negativas. No obstante, se sabe que OppA tiene gran versatilidad de interacción con sustratos de diferentes longitudes dada por su región de bisagra flexible, la cual le permite un amplio rango de ángulo de apertura, es por eso que resulta importante realizar un análisis bioinformático y más ensayos experimentales que nos permitan dilucidar de forma más concreta la actividad de OppA.

Hipótesis

Bajo estrés térmico, los niveles de la proteína OppA de *Yersinia pseudotuberculosis* se mantienen estables, debido a que tiene actividad tipo chaperona y se une a las regiones hidrófobas que exponen las proteínas desnaturalizadas para apoyarlas en su refoldo.

Objetivo general

Analizar la actividad tipo chaperona de la proteína OppA de *Yersinia pseudotuberculosis*

Objetivos específicos

- Determinar las regiones de unión entre proteínas (OppA-ligando)
- Diseñar y optimizar los ligandos a utilizar
- Realizar los acoplamientos moleculares mediante programas bioinformáticos
- Analizar las interacciones del complejo ligando-receptor
- Purificar la proteína OppA
- Probar la función de chaperona de OppA con la enzima KpnI desnaturalizada

Material y Métodos

Para el estudio bioinformático:

Se buscará en la base de datos del Protein Data Bank las estructuras cristalinas de las proteínas a utilizar para determinar los sitios de posible contacto inicial, se realizarán acoplamientos proteína-proteína con los servidores en línea HDock y GRAMM-X (Yan et al., 2020; Tovchigrechko et al., 2006).

Nombre	Organismo	PDB	Referencia (DOI)
OppA	<i>Yersinia pestis</i>	2Z23	10.2210/pdb2z23/pdb
α -glucosidasa	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3aj7	10.2210/pdb3aj7/pdb
LDH-A	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	6P6U	10.2210/pdb6p6u/pdb
EcoRI	<i>Escherichia coli</i>	1ERI	10.2210/pdb1eri/pdb

THG	<i>Geotrichum candidum</i>	1TRH	10.2210/pdb1trh/pdb
-----	----------------------------	------	--

A partir de la localización de los sitios de interacción, con el programa UCSF-Chimera (Pettersen et al., 2004), se seleccionarán y obtendrán 5 ligandos de cada proteína modelo: MAL-12, LDH-A, *EcoRI* y THG. Para evaluar la interacción de los oligopéptidos obtenidos con la proteína OppA, se harán acoplamiento moleculares mediante AutoDock Vina (Trott et al., 2010).

El análisis de interacciones del complejo ligando-receptor y esquemas bidimensionales de complejos con estructura 3D se realizarán en el software de LigProt (Wallace et al., 1995).

Para el estudio experimental:

Nombre	Descripción	Referencia
BL21- pEXP-OppA	Cepa de <i>E. coli</i> con derivado de pEXP5-CT/TOPO contiene al gen <i>oppA</i> de <i>Y. pseudotuberculosis</i> YPIII	Escobar et al., 2020
<i>KpnI</i>	Enzima de digestión para ADN	Sigma-Aldrich®

La inducción de la expresión de las proteínas recombinantes será a partir de las cepas de *E. coli* BL21(pLys) con OppA, obtenidas de la colección del laboratorio de Fisiología Microbiana (Escobar, 2020). Se realizará la resiembra de ambas cepas en medio LB y se incubarán a 37 °C, con previo precultivo durante 14h, para posteriormente inocular 200 mL de caldo Luria Bertani, suplementado con ampicilina 100 ug/ml. Los 200 mL se pondrán en un matraz de medio litro y se incubará a 37 °C con agitación constante a 170 rpm. Cuando alcance una DO₆₀₀ de 0.5 se le adicionará IPTG (Invitrogen ®, USA) a una concentración final de 0.15 mM para inducir la expresión de la proteína OppA (Escobar, 2020). Se seguirá incubando hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 1.

Para obtener las células bacterianas el cultivo se centrifugará a 14 000 rpm, se recuperará la pastilla, la cual será lavada con PBS y congelada a -70 °C toda la noche. La pastilla se suspenderá en buffer de lisis (20 mM Tris, 0.5% glicerol, 0.1% β -mercaptoetanol (BME), 1 mg/mL de lisozima, pH 7.5), se incubará a 37 °C durante 30 minutos, y luego se sonificará a 40% de amplitud, 1.5 minutos, con pulsos de 8 segundos, y se repetirá hasta obtener una suspensión lo más clara posible, el lisado se centrifugará a 12 000 rpm por 15 minutos a 4°C.

Se realizará un corrimiento electroforético de proteínas totales por SDS-PAGE 10%. Se cuantificará la concentración de proteínas por medio de la técnica de tinción de proteínas en solución por la técnica de Bradford y se agregarán 30 μ g de proteínas totales a cada pozo, se terminarán de desnaturalizar en buffer de corrida y calentamiento a ebullición durante 7 minutos, se realizará la carga a los pozos y se iniciará el corrimiento electroforético a 70 volts hasta pasar la línea del gel concentrador, luego se subirá a 100 volts hasta finalizar el corrimiento. El gel será teñido durante 30 minutos con una solución de azul de Coomasie y posteriormente se dejará alrededor de 1h en solución de desteñido con cambios constantes hasta observar las bandas proteicas.

Posteriormente, el lisado será sometido a cromatografía de afinidad en condiciones nativas con la resina Ni-NTA (Invitrogen ®). A 1 ml de la suspensión de la resina al 50 % se añadirán 4 ml de tampón de unión 1X Ni-NTA y mezclando suavemente. Luego de que la resina se sedimentará y se retirarán los 4 ml del tampón. Se añadirán 4 ml del lisado aclarado y se mantendrá a 4 °C durante 60 min con agitación a 200 rpm. Posteriormente la mezcla se cargará a la columna. La columna se lavará con 8 ml de tampón de lavado. Por último, se eluirá la proteína con 2 ml de tampón de elución. Se recolectarán todas las fracciones resultantes para la correspondiente medición de concentración de proteínas por método de Bradford y subsiguiente análisis por SDS-PAGE de cada una.

También se realizará un segundo método de purificación por electroelución con el objetivo de obtener la mayor cantidad de proteína purificada posible. Para esto se realizará una electroforesis en gel de poliacrilamida al 10% y se teñirá un carril de

tal forma que se pueda localizar la proteína de interés para posteriormente alinear la tira teñida con la porción de gel no teñida, y cortar la sección del gel sin teñir que se alinee con la proteína teñida de interés. Luego se macerarán los extractos del gel para colocarlos en tubos eppendorf con 0,5-1 ml de tampón de elución (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,5) y se incubará en un agitador rotatorio a 4°C durante la noche. Al día siguiente se centrifugará a 12.000 rpm durante 15 min, y decantará el sobrenadante en un nuevo tubo de microcentrífuga. Se comprobará la purificación mediante un corrimiento electroforético en condiciones nativas.

Para realizar el ensayo enzimático con la finalidad de probar la capacidad de refoldo propuesta para OppA, se iniciará con la desnaturalización parcial mediante la aplicación de calor. Después se proseguirá con el protocolo proporcionado por el fabricante para la reacción de digestión (Sigma-Aldrich®), y se pondrá a interactuar con 40 µg de las proteínas tipo chaperona OppA. A la par se realizarán interacciones de la *KpnI* parcialmente desnaturalizada sin haber sido incubada con OppA como control negativo y *KpnI* completamente activa como control positivo. Todos se incubarán a 37 °C por 60 minutos, se agregará DNA y se reanudará la incubación durante 4 horas más. Los tubos con cada uno de los tratamientos serán homogeneizados, colocados en hielo y se tomará una muestra de 10 µL. Se procederá a medir la actividad de la nucleasa mediante el corte de una cadena de DNA plasmídico y su subsiguiente observación con un corrimiento en gel de agarosa al 1%

Diseño de estudio

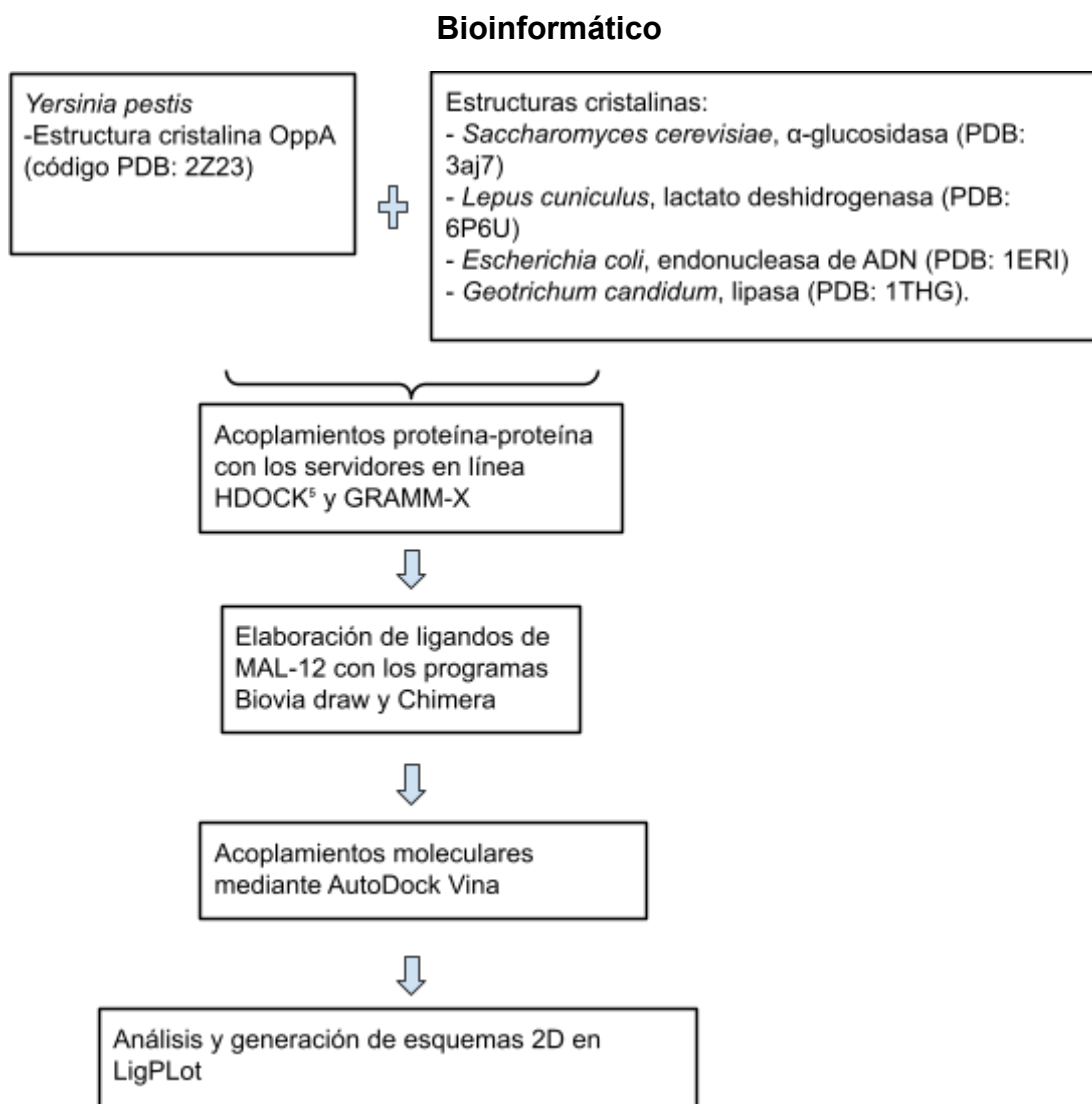
Parte bioinformática

- Acoplamiento proteína-proteína.
- Determinación de los posibles sitios de unión.
- Generación de ligandos de MAL-12.
- Acoplamiento moleculares.
- Análisis de interacciones del complejo ligando-receptor y generación de esquemas 2D.

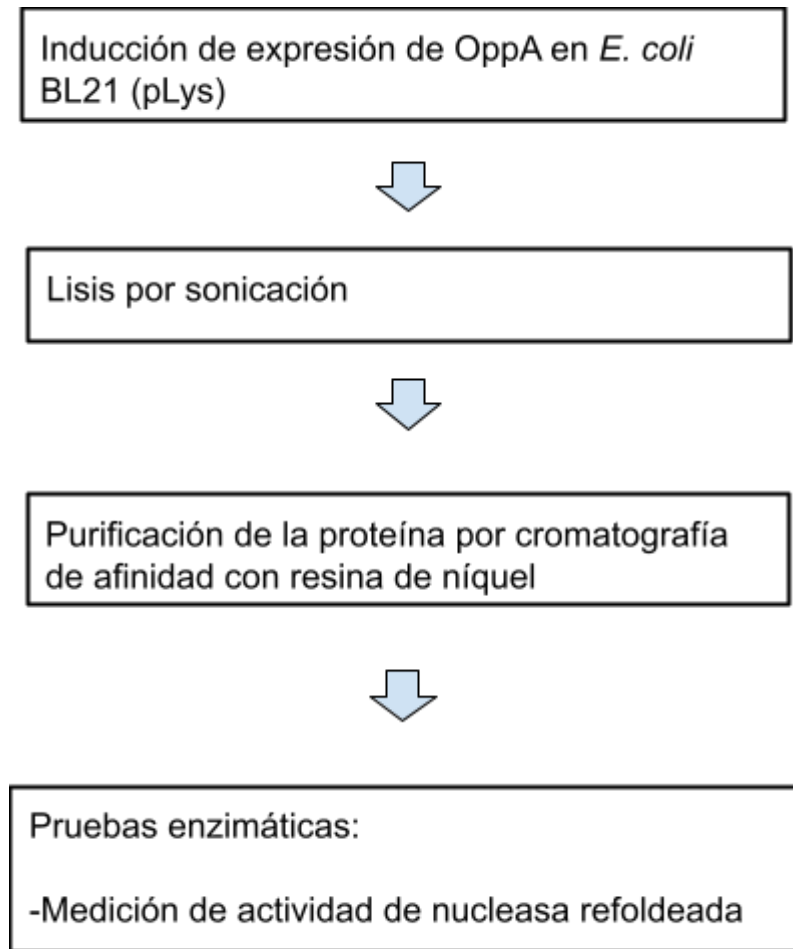
Parte experimental

- Inducción de la expresión de OppA de *Yersinia pseudotuberculosis*.
- Purificación de OppA de *Yersinia pseudotuberculosis* con columna de níquel
- Purificación de OppA de *Yersinia pseudotuberculosis* por electroelución
- Desnaturalización parcial de la endonucleasa *EcoRI*
- incubación de *EcoRI* parcialmente desnaturalizada con OppA activa.
- Probar la función de chaperona de la proteína OppA de *Y. pseudotuberculosis* sobre una proteína parcialmente desnaturalizada.

Esquema de trabajo



Práctico



Logística: NA

Bioética: NA

Resultados:

Bioinformático

Se obtuvieron las estructuras cristalográficas de cada enzima usada del banco de datos de proteínas en formato PDB. Se leyeron y modificaron con ayuda del programa Chimera 1.7, de manera que sólo quedarán los monómeros de cada una. Con eso se procedió a realizar el docking inicial con las proteínas completas para evaluar las posibles zonas de interacción de donde se extraerían los ligandos. Dichas zonas de mayor interacción resultaron ser las más hidrofóbicas, siendo los dominios con cadenas β -plegadas las predominantes. Se procedió a identificar los residuos de aminoácidos exactos de la interfase con la OppA y se

seleccionaron cinco ligandos procedentes de cada enzima de entre 5 a 9 residuos de aminoácidos.

En Autodock se realizó el ensayo de acoplamiento molecular, y se seleccionaron los modelos con mejores puntuaciones Vina resultantes de cada ligando, y posteriormente se generaron los archivos PDB de cada uno de los resultados para poder someterlos a análisis más detallado en el programa LigPlot para verificar las interacciones mediante esquemas 2D.

La gran mayoría de los ligandos se acoplaron bien a OppA y en todas las ocasiones estuvo presente al menos uno de los cuatro aminoácidos de interés. OppA tiene preferencia por los péptidos que tienen al menos un residuo aminoacídico hidrófobo. La OppA ha demostrado una gran especificidad y estabilidad con sus sustratos, la cual se debe a los puentes de hidrógeno entre el esqueleto del péptido y algunas otras, no tan comunes, interacciones laterales. Además, también pueden llegar a formarse puentes salinos con residuos con cadenas laterales ionizables como serina, histidina y tirosina, pero lo más común es que se formen entre el átomo aniónico de aspartato o en su defecto del glutamato, y el átomo catiónico de la lisina y/o de la arginina.

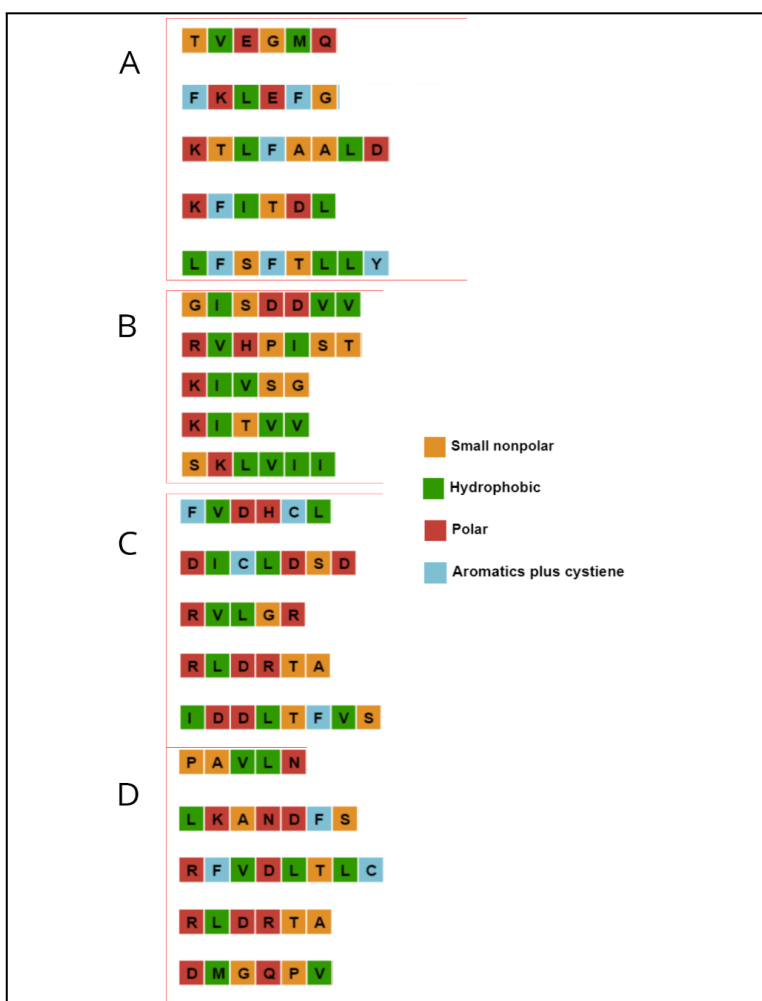


Figura 8. Esquema de las secuencias peptídicas de los ligandos. A) Secuencia de los 5 ligandos de Mal12. B) Secuencia de los 5 ligandos de LDH. C) Secuencia de los 5 ligandos de *EcoRI*. D) Secuencia de 5 ligandos de HTG. Los residuos aminoacídicos se encuentran en código de 1 letra y en color de acuerdo con su naturaleza.

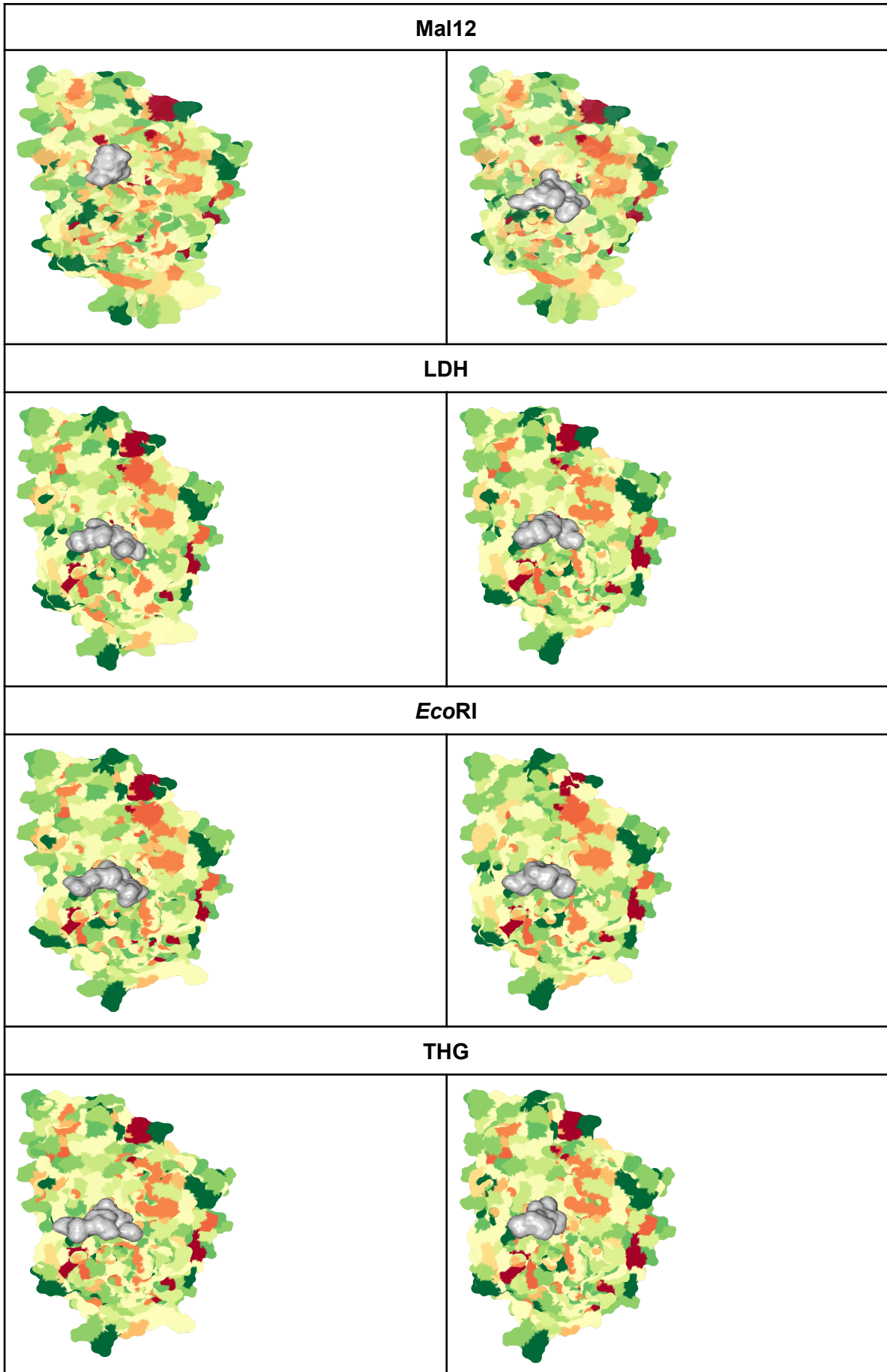
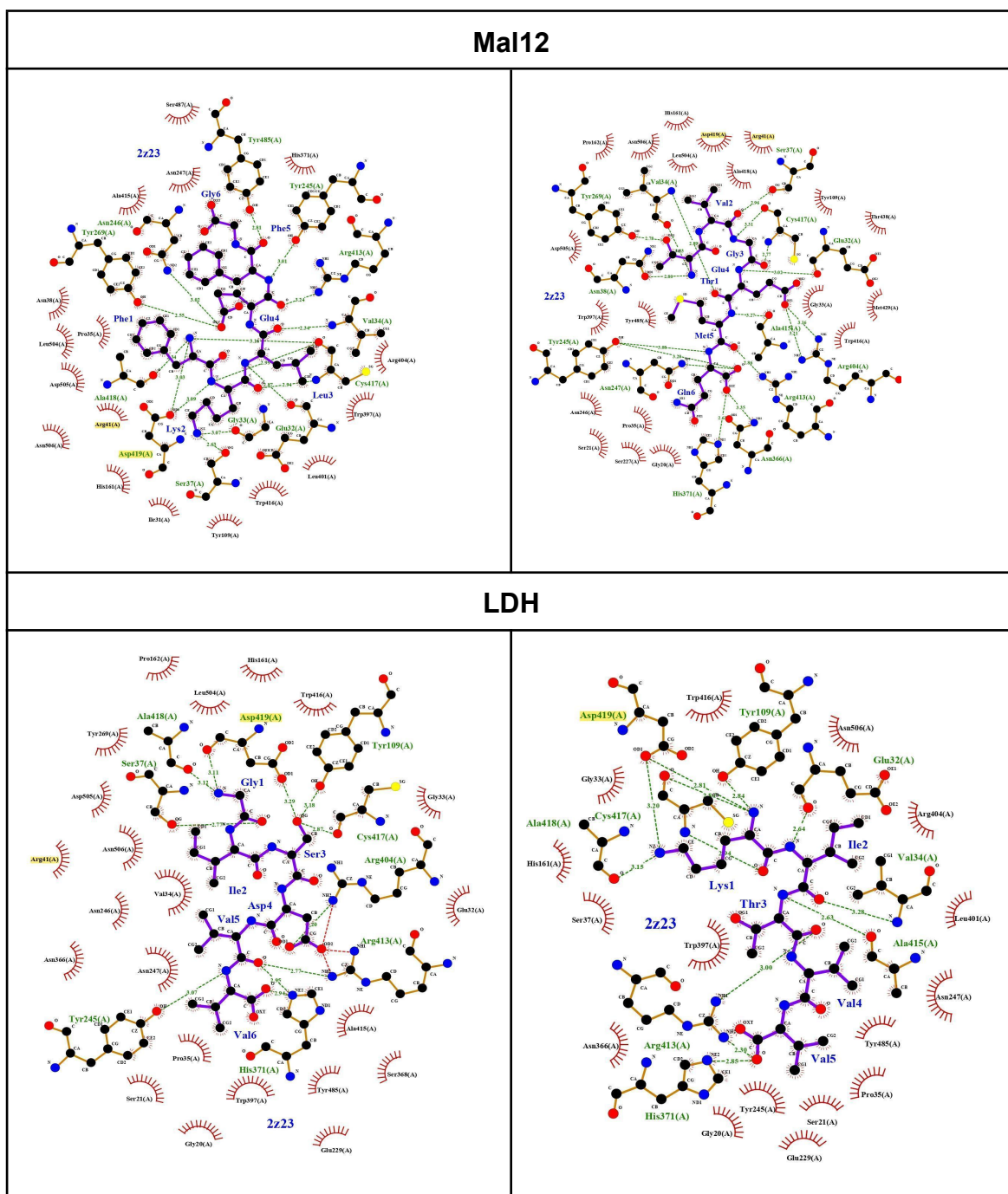


Figura 9. Esquema mostrando la posición que los ligandos adquieren en el pocket de OppA. Los colores indican la hidrofobicidad.

La conformación 5 de los ligandos 4 y 5; la conformación 2 y 4 de los ligandos 1 y 4; la conformación 1 de los ligandos 3 y 5; y la conformación 1 de los ligandos 2 y 4, extraídos de Mal12, LDH, *EcoRI* y HTG respectivamente, cuentan con el mejor rendimiento de entre los 5 inicialmente propuestos de cada proteína, ya que la correlación entre el Vina Score y el número de puentes de hidrógeno son favorables, siendo de -7.3, -9.4 / 15, 16; -8, -7.8 / 11 + 3 salinos, 12; -7, -9.6 / 12 + 3 salinos, 15 + 1 salino; -7.7, -8.2 / 13 + 2 salinos, 8; siguiendo el mismo orden.



Práctico

El ensayo de inducción de OppA se realizó siguiendo lo descrito en material y métodos, con la finalidad de obtener la mayor concentración de la proteína posible para su posterior purificación. Se fueron tomando alícuotas a cada hora a partir del inicio de la inducción, con lo cual se determinó usar la hora 5 de la inducción. Se obtuvo el extracto proteico por ultrasonificación y se cuantificó por método de Bradford. Se corrió un gel de poliacrilamida con una carga de 30 $\mu\text{g}/\text{ul}$ en cada pozo para rectificar el aumento en la proteína inducida.

Una vez que se comprobó que la proteína fue exitosamente inducida, se realizó la purificación, bajo condiciones nativas en columnas de níquel. Se recolectaron 18 fracciones y se corrieron en geles de poliacrilamida para confirmar que la proteína requerida se encontraba en parte de las últimas fracciones recogidas. Se utilizaron de la 14 a la 17 para los pasos siguientes. Como se necesitaba una gran concentración de OppA y la purificación con resina de níquel, se procedió a realizar un ensayo de electroelución con los extractos proteicos resultantes de la sonicación, la cual dio mejores resultados.

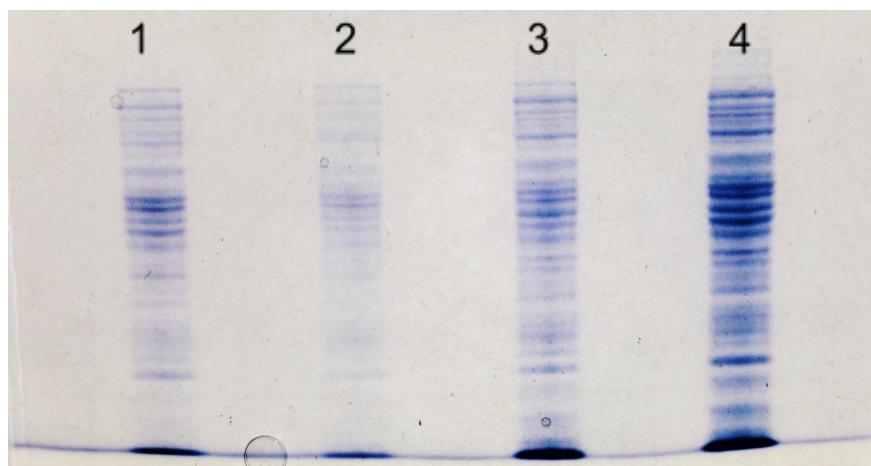


Figura 11. Gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. Los carriles 1 a la 4 muestran las proteínas resultantes de la lisis celular por sonicación. Se agregaron 30 μg de proteínas totales en cada carril.

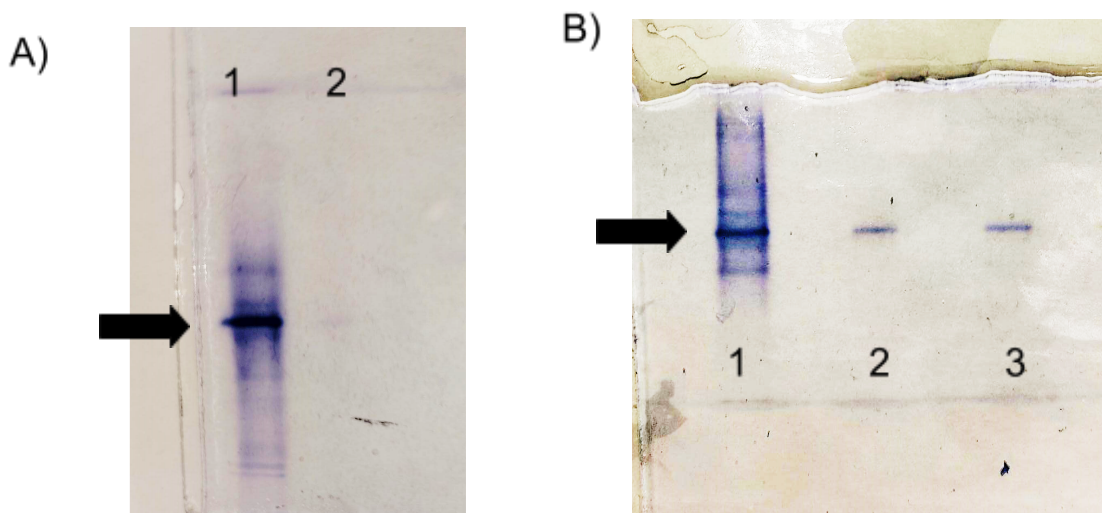


Figura 12. Geles de poliacrilamida en condiciones nativas. Las líneas en azul muestran la purificación de la proteína OppA. A) En el carril 1 contiene carga del extracto crudo de la inducción, en el carril 2 se observa muy tenuemente la proteína purificada por cromatografía de afinidad (flecha). B) En el carril 1 contiene carga del extracto crudo de la inducción, en los siguientes carriles 2 y 3 se aprecia claramente la proteína purificada por electroelución. Se agregaron 30 μg de proteínas en cada carril.

La prueba de actividad tipo chaperona de OppA se probó utilizando la enzima de restricción *KpnI*. Primero se verificó la correcta actividad de corte de *KpnI* siguiendo el protocolo del fabricante, y luego se pasó a su desnaturalización por calor; así como, con su renaturalización incubándola por 4h con OppA a 37 °C. Para realizar este ensayo se utilizaron concentraciones de 15, 30 y 60 μg de OppA. Aquí sólo se presenta el ensayo que presentó resultados positivos con 60 μg .

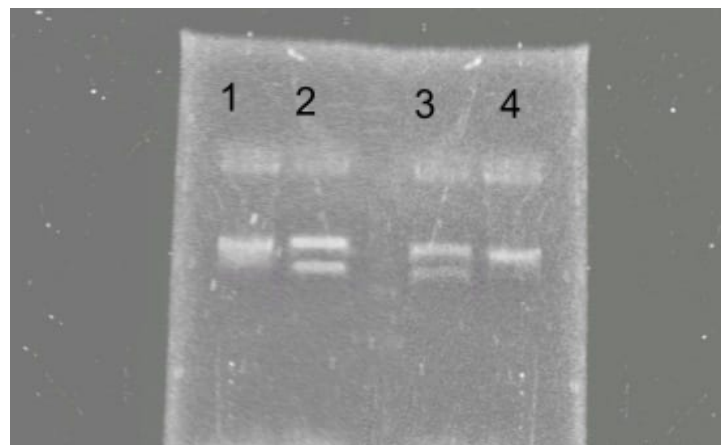


Figura 13. Gel de agarosa. Se muestra en cada carril la diferencia de actividad de la *KpnI* bajo diferentes condiciones. De izquierda a derecha: 1) DNA plasmídico, 2) Digestión de 5 μl DNA plasmídico con *KpnI* siguiendo el procedimiento habitual del fabricante, 3) Digestión de 5 μl DNA plasmídico con *KpnI* sometida a un proceso de desnaturalización e incubada con OppA por 1h, y 4) Digestión de 5 μl DNA plasmídico con *KpnI* sometida a un proceso de desnaturalización por calor.

Discusión

Para la parte bioinformática los candidatos de unión identificados indican que la especificidad peptídica de OppA no se limita a péptidos de 3 a 5 aminoácidos como se creía con anterioridad (Davies et al., 1999; Tame et al., 1995; Singh et al., 2020), y que OppA es capaz de formar interacciones con residuos positivos e hidrófobos, así como a péptidos más largos. En este sentido, lo anterior se relaciona al hecho de que las chaperonas son capaces de unirse a una amplia variedad de ligandos, aunque ciertamente se ha visto que cada una tiene predilección por determinadas moléculas (de Boer et al., 2019; Doeven et al., 2004).

De la misma manera, se ha visto que algunas otras SBP presentan una doble actividad de chaperona inducida por estrés, sin embargo, su conformación sigue siendo la misma (Goemans et al., 2013; Mas et al., 2019; Papadopoulos et al., 2022). En el caso de las proteínas de unión a sustrato, el polipéptido se pliega en la hendidura que hay entre sus dos dominios globulares, haciendo que la proteína SBP adquiera un ángulo particular de abertura dependiendo del ligando que resida en su interior, luego la SBP se uniría con la sección transmembrana del transportador, siempre y cuando el ángulo de apertura sea el correcto (Doeven et al., 2004; Linton et al., 2007). Lo anterior podría explicar una parte de la alternancia entre su actividad de SBP y de tipo chaperona, por lo que se intuye que pueden ser las propiedades estructurales o de secuencia de las proteínas que se encuentran desplegadas las que hacen que una SBP despierte su actividad tipo chaperona.

Se muestra evidencia de tipo bioinformático que propone que la proteína de unión a sustrato periplásmico OppA de *Y. pseudotuberculosis*, tiene una función similar a la de chaperonas participando en el refoldo de proteínas parcialmente desnaturalizadas, reconociendo a su proteína cliente debido a las secuencias que se dejan al descubierto al perder su conformación nativa.

Los 8 ligandos presentados pertenecen a zonas hidrofóbicas de las enzimas correspondientes, principalmente de estructuras tipo beta plegada, las cuales suelen tener la característica de encontrarse enterradas en la proteína y generar interacciones hidrófobas internas para proporcionar estabilidad a la proteína y evitar que las interacciones de su parte hidrofílica generen su desdoblamiento (Craig, 1993).

Sólo el residuo 419 de los estudiados bajo el conocimiento de los resultados de la investigación realizada en 2020 por Escobar, apareció reiteradamente generando puentes de hidrógeno con el péptido ligando, por lo tanto, parece que los otros tres residuos, 420 y el par 41-42, podrían estar más directamente relacionados con una función dentro de la estructura e interacción de OppA.

Los resultados sugieren que los aminoácidos hidrofóbicos enterrados en las estructuras mayoritariamente hidrofílicas de las SBP se unen relativamente fuerte a residuos también de naturaleza hidrófoba de proteínas no nativas, generando parches de interacción estable e inespecífica entre las proteínas de unión y las proteínas desplegadas (Becerril et al., 2023).

Algo más que destacar es que otras SBP se inducen por la presencia de un inductor específico; en contraste, OppA se expresa constitutivamente en cantidades considerables, esto aunado a que es termoestable, como el resto de las SBP, señalaría que este tipo de proteínas podrían tener un papel destacado

como chaperonas (Richarme et al., 1997). Además, la DppA de *E. coli* ha evidenciado unirse a la proteína permanentemente desplegada R-CMLA, en un porcentaje similar que la DnaK (Richarme et al., 1997). Con lo anterior resulta evidente hay que considerar que, al menos, OppA de *Y. pseudotuberculosis* comparte la característica de unión con proteínas desplegadas que tienen las chaperonas, fungiendo como amortiguador para prevenir la agregación de proteínas con estructuras no nativas durante un choque térmico.

En el ensayo de renaturalización de *KpnI*, realizado mediante la incubación de la enzima previamente desnaturalizada por calor con OppA nativa durante 4 horas a 37 °C, se observó que cierta fracción de la enzima de restricción recuperaba la actividad, visto en las imágenes de las bandas en los geles de agarosa. Aunque no fuese una recuperación total esto era de esperarse, puesto que se conoce que las proteínas citoplasmáticas con actividad de chaperonas tienen normalmente una actividad menor que las proteínas chaperonas clásicas (Jakob et al., 1992).

De igual manera en las pruebas enzimáticas realizadas con anterioridad con la alfa glucosidasa y la lactato deshidrogenasa muestran resultados similares a los expuestos en este estudio, con respecto a la disminución de la actividad de las enzimas renaturalizadas con respecto a la que no fueron expuestas a ningún tratamiento desnaturalizante, así como a la recuperación parcial de su actividad luego de ser incubadas con OppA, dicha recuperación muy parecida a la obtenida cuando fueron puestas en contacto con la chaperona profesional HtrA (Escobar et al., 2020).

Conclusiones

- OppA podría ser capaz de discernir entre una proteína desnaturalizada y aquella que mantiene su conformación tridimensional, debido a los motivos hidrofóbicos que se descubren al perder su conformación nativa.
- La interacción dentro del pocket de OppA se ve favorecida energéticamente debido a la formación de un alto número de puentes de hidrógeno con aquellas zonas hidrofóbicas.
- La gran mayoría de los aminoácidos de las cadenas ligando generan más de una interacción molecular con OppA.
- El residuo 419 parece ser importante dentro de estas uniones y no para el proceso activo del refoldo, mientras que el par 41 - 42 podría estar más vinculado a otra función dentro de la región bisagra de OppA.
- La mayor afinidad con la enzima OppA obtenida fue con la conformación 1 del ligando 5 de *EcoRI*, que tuvo una energía de enlace de -9.6, 16

puentes de hidrógeno y 1 enlace salino, con un promedio de 2.9 Å de distancia con la estructura de OppA.

- OppA tiene capacidad de unión con secuencias de más de 5 aminoácidos que tienen por lo menos un residuo de naturaleza hidrofóbica.
- Se purificó exitosamente la proteína OppA de *Yersinia pseudotuberculosis* en condiciones nativas.
- La *KpnI* desnaturalizada sí muestra una perceptible diferencia de actividad con respecto a la *KpnI* incubada con OppA.
- Con lo anterior se puede decir que OppA parece tener la habilidad de ayudar en el refoldo de *KpnI*.

Perspectivas

Aunque los datos de puntuación vina es fundamental para iniciar un estudio en una molécula, otras propiedades como el tamaño del péptido, secuencia aminoacídica y naturaleza del residuo, distancia y número de enlaces son importantes en el momento de definir las posibles interacciones entre proteínas y ligandos, por lo cual se deberían realizar más estudios bioinformáticos para dilucidar las interacciones moleculares entre proteínas receptoras y ligandos. Probar la proteína OppA de *Yersinia pseudotuberculosis* nativa con otras proteínas en condiciones desnaturalizantes.

Bibliografía

Amphlett A. Far East Scarlet-like fever: A review of the epidemiology, symptomatology, and role of superantigenic toxin: *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen A. Open Forum Infect Dis [Internet]. 2016;3(1):ofv202. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/ofid/ofv202>

Chain PSG, Carniel E, Larimer FW, Lamerdin J, Stoutland PO, Regala WM, et al. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2004;101(38):13826–31. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0404012101>

Chen S, Thompson KM, Francis MS. Environmental regulation of *Yersinia* pathophysiology. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2016;6:25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2016.00025>

Cornelis GR, Biot T, Lambert de Rouvroit C, Michiels T, Mulder B, Sluiters C, et al. The *Yersinia* yop regulon. Mol Microbiol [Internet]. 1989;3(10):1455–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00129.x>

Cornelis GR. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors: Send in the effectors. J Cell Biol [Internet]. 2002;158(3):401–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200205077>

Craig EA. Chaperones: helpers along the pathways to protein folding. Science [Internet]. 1993;260(5116):1902–3. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/science.8100364>

de Boer M, Gouridis G, Vietrov R, Begg SL, Schuurman-Wolters GK, Husada F, et al. Conformational and dynamical plasticity in substrate-binding proteins underlies selective transport in ABC importers [Internet]. bioRxiv. 2019. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1101/537308>

Doeven MK, Abele R, Tampé R, Poolman B. The binding specificity of OppA determines the selectivity of the oligopeptide ATP-binding cassette transporter. J Biol Chem [Internet]. 2004;279(31):32301–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M404343200>

Escobar Garduño E, Scior T, Soto Urzúa L, Martínez Morales LJ. Identification of residues for chaperone-like activity of OppA protein in *Yersinia pseudotuberculosis*. AMB Express [Internet]. 2020;10(1):153. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13568-020-01090-8>

Fukushima H, Matsuda Y, Seki R, Tsubokura M, Takeda N, Shubin FN, et al. Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia pseudotuberculosis*-derived mitogen, and the high-pathogenicity island among *Yersinia pseudotuberculosis* strains. J Clin Microbiol [Internet]. 2001;39(10):3541–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.39.10.3541-3547.2001>

Galindo CL, Rosenzweig JA, Kirtley ML, Chopra AK. Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. J Pathog [Internet]. 2011;2011:182051. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4061/2011/182051>

Gehring AM, DeMoll E, Fetherston JD, Mori I, Mayhew GF, Blattner FR, et al. Iron acquisition in plague: modular logic in enzymatic biogenesis of yersiniabactin by *Yersinia pestis*. Chem Biol [Internet]. 1998;5(10):573–86. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s1074-5521\(98\)90115-6](http://dx.doi.org/10.1016/s1074-5521(98)90115-6)

Grochulski P, Cygler M. Two conformational states of *Candida rugosa* lipase [Internet]. Worldwide Protein Data Bank; 1994. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2210/pdb1trh/pdb>

Guo MS, Gross CA. Stress-induced remodeling of the bacterial proteome. Curr Biol [Internet]. 2014;24(10):R424-34. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2014.03.023>

Hall M, Chattaway MA, Reuter S, Savin C, Strauch E, Carniel E, et al. Use of whole-genus genome sequence data to develop a multilocus sequence typing tool that accurately identifies *Yersinia* isolates to the species and subspecies levels. J Clin Microbiol [Internet]. 2015;53(1):35–42. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.02395-14>

Heise T, Dersch P. Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 2006;103(9):3375–80. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0507749103>

Hemmingsen SM, Woolford C, van der Vies SM, Tilly K, Dennis DT, Georgopoulos CP, et al. Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. Nature [Internet]. 1988;333(6171):330–4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/333330a0>

Kim Y, Grable JC, Love R, Greene PJ, Rosenberg JM. X-ray structure of the DNA-*EcoRI* endonuclease-DNA recognition complex: The recognition network and the integration of recognition and cleavage [Internet]. Worldwide Protein Data Bank; 1995. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2210/pdb1eri/pdb>

Kirjavainen V, Jarva H, Biedzka-Sarek M, Blom AM, Skurnik M, Meri S. *Yersinia enterocolitica* serum resistance proteins YadA and ail bind the complement regulator C4b-binding protein. PLoS Pathog [Internet]. 2008;4(8):e1000140. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1000140>

Les infections à *Yersinia* [Internet]. Institut Pasteur. 2016 [citado el 4 de enero de 2023]. Disponible en: <https://www.pasteur.fr/fr/sante-publique/cnr/les-cnr/peste-autres-yersinioses/infections-yersinia>

Lian CJ, Hwang WS, Kelly JK, Pai CH. Invasiveness of *Yersinia enterocolitica* lacking the virulence plasmid: an in-vivo study. J Med Microbiol [Internet]. 1987;24(3):219–26. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1099/00222615-24-3-219>

Linton KJ, Higgins CF. Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control. Pflugers Arch [Internet]. 2007;453(5):555–67. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-006-0126-x>

Matsuzaki M, Kiso Y, Yamamoto I, Satoh T. Isolation of a periplasmic molecular chaperone-like protein of *Rhodobacter sphaeroides* f. sp. *denitrificans* that is homologous to the dipeptide transport protein DppA of *Escherichia coli*. J Bacteriol [Internet]. 1998;180(10):2718–22. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/JB.180.10.2718-2722.1998>

McPherson A. Crystal structure of monoclinic rabbit muscle lactate dehydrogenase with four tetramers as the asymmetric unit [Internet]. Worldwide Protein Data Bank; 2020. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2210/pdb6p6u/pdb>

Merrell DS, Butler SM, Qadri F, Dolganov NA, Alam A, Cohen MB, et al. Host-induced epidemic spread of the cholera bacterium. Nature [Internet]. 2002;417(6889):642–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature00778>

Pelludat C, Rakin A, Jacobi CA, Schubert S, Heesemann J. The yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica*: organization and siderophore-dependent regulation. J Bacteriol [Internet]. 1998;180(3):538–46. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/JB.180.3.538-546.1998>

Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. J Comput Chem [Internet]. 2004;25(13):1605–12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.20084>

Phadtare S, Alsina J, Inouye M. Cold-shock response and cold-shock proteins. Curr Opin Microbiol [Internet]. 1999;2(2):175–80. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274\(99\)80031-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-5274(99)80031-9)

Pradel E, Lemaître N, Merchez M, Ricard I, Reboul A, Dewitte A, S Florent. New insights into how *Yersinia pestis* adapts to its mammalian host during bubonic plague. PLoS Pathog [Internet]. 2014;10(3):e1004029. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1004029>

Quinaud M, Chabert J, Faudry E, Neumann E, Lemaire D, Pastor A, et al. The PscE-PscF-PscG complex controls type III secretion needle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa*. J Biol Chem [Internet]. 2005;280(43):36293–300. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M508089200>

Rakin A, Noelting C, Schubert S, Heesemann J. Common and specific characteristics of the high-pathogenicity island of *Yersinia enterocolitica*. Infect Immun [Internet]. 1999;67(10):5265–74. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.67.10.5265-5274.1999>

Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2009;10(3):218–27. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2646>

Reinhardt M, Hammerl JA, Kunz K, Barac A, Nöckler K, Hertwig S. *Yersinia pseudotuberculosis* prevalence and diversity in wild boars in northeast Germany. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 2018;84(18). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.00675-18>

Revell PA, Miller VL. A chromosomally encoded regulator is required for expression of the *Yersinia enterocolitica* *inv* gene and for virulence: *Y. enterocolitica* regulator of *inv* and virulence. *Mol Microbiol* [Internet]. 2000;35(3):677–85. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01740.x>

Sebbane F, Jarrett C, Gardner D, Long D, Hinnebusch BJ. The *Yersinia pestis* *caf1M1A1* fimbrial capsule operon promotes transmission by flea bite in a mouse model of bubonic plague. *Infect Immun* [Internet]. 2009;77(3):1222–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00950-08>

Sebbane F, Jarrett CO, Gardner D, Long D, Hinnebusch BJ. Role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006;103(14):5526–30. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0509544103>

Sleigh SH, Tame JR, Dodson EJ, Wilkinson AJ. Peptide binding in OppA, the crystal structures of the periplasmic oligopeptide binding protein in the unliganded form and in complex with lysyllysine. *Biochemistry* [Internet]. 1997;36(32):9747–58. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/bi970457u>

ter Beek J, Guskov A, Slotboom DJ. Structural diversity of ABC transporters. *J Gen Physiol* [Internet]. 2014;143(4):419–35. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1085/jgp.201411164>

Tovchigrechko A, Vakser IA. GRAMM-X public web server for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2006;34(Web Server issue):W310–4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkl206>

Trosky JE, Liverman ADB, Orth K. *Yersinia* outer proteins: Yops. *Cell Microbiol* [Internet]. 2008;10(3):557–65. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.01109.x>

46. Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* [Internet]. 2010;31(2):455–61. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/jcc.21334>

Tsubokura M, Aleksić S. A simplified antigenic scheme for serotyping of *Yersinia pseudotuberculosis*: phenotypic characterization of reference strains and preparation of O and H factor sera. *Contrib Microbiol Immunol*. 1995;13:99–105.

Wallace AC, Laskowski RA, Thornton JM. LIGPLOT: a program to generate schematic diagrams of protein-ligand interactions. *Protein Eng Des Sel* [Internet]. 1995;8(2):127–34. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/protein/8.2.127>

Wren BW. The yersiniae—a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2003;1(1):55–64. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro730>

Wu C, Chakrabarty S, Jin M, Liu K, Xiao Y. Insect ATP-binding cassette (ABC) transporters: Roles in xenobiotic detoxification and Bt insecticidal activity. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2019;20(11):2829. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms20112829>

Yamamoto K, Miyake H, Kusunoki M, Osaki S. Crystal structures of isomaltase from *Saccharomyces cerevisiae* and in complex with its competitive inhibitor maltose: Crystal structure of isomaltase. *FEBS J* [Internet]. 2010;277(20):4205–14. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07810.x>

Yan Y, Tao H, He J, Huang S-Y. The HDock server for integrated protein-protein docking. *Nat Protoc* [Internet]. 2020;15(5):1829–52. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41596-020-0312-x>

57. Kim H, Wu K, Lee C. Stress-responsive periplasmic chaperones in bacteria. *Front Mol Biosci* [Internet]. 2021;8:678697. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2021.678697>

58. Becerril Ramírez M, Soto Urzúa L, Martínez Martínez MA, Martínez Morales LJ. Computational analysis of the ligand-binding sites of the molecular chaperone OppA from *Yersinia pseudotuberculosis*. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2023;24(4):4023. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms24044023>